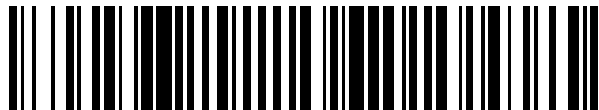


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 569**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10252043 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2356983**

54 Título: **Circulación de los componentes durante la homogeneización de las emulsiones**

30 Prioridad:

**03.12.2009 US 283518 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.05.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**RUECKL, HARALD;  
SCHEFFCZIK, HANNO y  
SANTRY, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 402 569 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**

Circulación de los componentes durante la homogeneización de las emulsiones

**5 CAMPO TÉCNICO**

**[0001]** La presente invención está en el campo de la fabricación de emulsiones de aceite en agua adyuvantes para vacunas en emulsión por homogeneización.

**10 ANTECEDENTES DE LATÉCNICA**

**[0002]** 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). También puede incluir iones de citrato por ejemplo 10 mM de tampón de citrato de sodio. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente un 5% de escualeno, aproximadamente un 0,5% de Tween 80 y aproximadamente un 0,5% de Span 85. El adyuvante y su producción se describen con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 4, el capítulo 12 de la referencia 5 y el capítulo 19 de la referencia 6.

**[0003]** Como se describe en la referencia 7, el MF59 se fabrica a escala comercial mediante la dispersión de Span 85 en la fase de escualeno y Tween 80 en la fase acuosa, seguida de la mezcla a alta velocidad para formar una emulsión gruesa. Esta emulsión gruesa se pasa repetidamente a través de un microfluidizador para producir una emulsión con un tamaño uniforme de gotas de aceite. Como se describe en la referencia 6, la emulsión microfluidizada se filtra a través de una membrana de 0,22 mm con el fin de eliminar las gotas grandes de aceite, 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 en escualeno de la emulsión final se puede medir como se describe en la referencia 8.

**[0004]** Las emulsiones de aceite en agua contienen gotas de aceite. Las gotas de aceite más grandes incluidas en estas emulsiones pueden actuar como sitios de nucleación para la agregación, lo que conduce a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento.

**[0005]** La referencia 8a describe un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua con escualeno que incluye el paso de los componentes de la emulsión varias veces a través de un homogeneizador simple con el fin de reducir el tamaño de las gotas de aceite.

**[0006]** Es un propósito de la invención proporcionar métodos adicionales y mejorados para la producción de emulsiones microfluidizadas de aceite en agua (tales como MF59), especialmente métodos que son adecuados para uso a escala comercial y que proporcionan una homogeneización y microfluidización mejoradas para proporcionar emulsiones con un menor número de partículas grandes.

**40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

**[0007]** La invención proporciona un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua con escualeno, incluyendo el método la etapa de (i) formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota de aceite usando un homogeneizador, en la que la primera emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la emulsión primero a través de un homogeneizador tal como se describe en la reivindicación 1.

**[0008]** La invención también proporciona un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye escualeno, incluyendo el método la etapa de: (b) microfluidización de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota de aceite para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, en la que la segunda emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión por transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un recipiente de la primera emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización a un recipiente de la segunda emulsión, y luego a través de un segundo dispositivo de microfluidización, en la que los dispositivos de microfluidización primero y segundo son el mismo.

**[0009]** Opcionalmente, el método de la presente invención incluye una etapa anterior de (a) formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota de aceite.

**[0010]** Opcionalmente, el método de la presente invención incluye la etapa de (c) filtración de la segunda emulsión.

**[0011]** Como se describe con más detalle a continuación, la primera emulsión puede tener un tamaño medio de gota de aceite de 5000nm o menos, por ejemplo, un tamaño medio de entre 300 nm y 800 nm. El número de gotas de aceite en la primera emulsión con un tamaño > 1,2 mm puede ser de 5 x 1.011 / ml o menos, tal como se describe a continuación. Gotas de aceite con un tamaño > 1,2 mm no es recomendable, ya que puede causar la inestabilidad de la emulsión debido a la aglomeración y coalescencia de las gotas [14].

5 [0012] Después de la formación, la primera emulsión se puede someter entonces a al menos un proceso de microfluidización para formar la segunda emulsión que tiene un tamaño medio reducido de gota de aceite. Como se describe a continuación, el tamaño medio de gota de aceite de la segunda emulsión es de 500 nm o menos. El número de gotas de aceite en la segunda emulsión con un tamaño de > 1,2 mm puede ser de  $5 \times 10^{10}$  / ml o menos, tal como se describe a continuación. Para lograr estas características puede requerirse el proceso de los componentes de la emulsión a través del dispositivo de microfluidización varias veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, o 7 veces.

10 [0013] La segunda emulsión puede entonces filtrarse, por ejemplo, a través de una membrana hidrofílica de polietersulfona, para dar una emulsión de aceite en agua que puede ser adecuada para su uso como adyuvante de vacuna. El tamaño medio de gota de aceite de la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración puede ser de 220 nm o menos, por ejemplo, entre 135-175 nm, entre 145-165 nm, o aproximadamente 155 nm. El número de gotas de aceite que tienen un tamaño de >1,2 mm presentes en la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración puede ser de  $5 \times 10^8$  /ml o menos, por ejemplo  $5 \times 10^7$ /ml o menos,  $5 \times 10^6$ /ml o menos,  $2 \times 10^6$  / ml o menos, o  $5 \times 10^5$  / ml o menos.

15 [0014] La emulsión final de aceite en agua formada después de la filtración puede tener al menos  $10^2$  veces menos gotas de aceite con un tamaño de > 1,2 mm en comparación con la primera emulsión, e de manera ideal al menos  $10^3$  veces menos (por ejemplo,  $10^4$  veces menos).

20 [0015] En algunas realizaciones, más de un ciclo de los pasos (i) y (ii) se usa antes del paso (iii). De manera similar, se pueden utilizar múltiples repeticiones de los pasos individuales (i) y (ii).

25 [0016] En general, el método se realiza entre 20-60 °C, e idealmente a  $40 \pm 5$  °C. Aunque los componentes de la emulsión primera y segunda pueden ser relativamente estables incluso a temperaturas más altas, se puede dar la descomposición térmica de algunos componentes y son recomendables las temperaturas bajas.

### **Componentes de la emulsión**

30 [0017] El tamaño medio de gota de aceite (es decir, el diámetro medio en número de gotas de aceite de la emulsión) se puede medir usando una técnica de dispersión de luz dinámica, como se describe en la referencia 13. Un ejemplo de máquina de medición por dispersión de luz dinámica es la Analizadora del Tamaño de Partículas Submicron Nicomp 380 (de Particle Sizing Systems).

35 [0018] El número de partículas que tienen un tamaño > 1,2 mm se puede medir usando un contador de partículas, como el Accusizer™ 770 (de Particle Sizing Systems).

40 [0019] Los métodos de la invención se usan para la fabricación de emulsiones de aceite en agua. Estas emulsiones incluyen tres ingredientes básicos: un aceite; un componente acuoso, y un tensioactivo.

[0020] Debido a que las emulsiones están destinadas al uso farmacéutico entonces el aceite será habitualmente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

45 [0021] El aceite utilizado puede incluir escualeno, un aceite de hígado de tiburón, que es un terpenoide ramificado e insaturado ( $C_{30}H_{50}$ ;  $(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2-]_2$ ; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2-,6,10,14,18,22 tetracosahexaeno, CAS RN 7683-64-9). El escualeno se recomienda de manera especial para el uso en la presente invención.

50 [0022] El aceite de la presente invención puede incluir una mezcla (o combinación) de aceites, por ejemplo, incluyendo escualeno y al menos un aceite adicional.

55 [0023] En lugar de (o además de) el uso de escualeno, una emulsión de escualeno puede incluir aceites, incluidos los procedente, por ejemplo, de una fuente animal (como el pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, de soja, de coco, y de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifica los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba se puede utilizar, por ejemplo, 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 accesible, pero el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares también se pueden utilizar. 6-10 carbono ésteres de ácidos grasos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se produzcan de forma natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales de partida apropiados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto pueden utilizarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

65

5 [0024] La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser fácilmente recuperados. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena (por ejemplo, esperma de ballena) ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente como terpenoides. El escualeno, el análogo saturado del escualeno, también se puede utilizar. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están fácilmente disponibles en fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica.

10 [0025] Los demás aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluya un tocoferol, cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , o  $\epsilon$  se puede utilizar, pero se recomiendan los tocoferoles  $\alpha$ . D- $\alpha$ -tocoferol y DL- $\alpha$ -tocoferol se pueden utilizar. Un  $\alpha$ -tocoferol recomendable es el DL- $\alpha$ -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 se utiliza una sal de este tocoferol, la sal recomendable es el succinato. Una combinación de aceite que incluya escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- $\alpha$ -tocoferol) se puede utilizar.

20 [0026] El componente acuoso puede ser agua potable (por ejemplo, w.f.i.) o puede incluir otros componentes, por ejemplo, solutos. Como ejemplo, se pueden incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones habituales incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Los tampones se incluirán habitualmente en el rango de 5-20mm.

25 [0027] El tensioactivo es preferiblemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Los tensioactivos se pueden clasificar por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo), donde un EHL en el intervalo de 1-10 generalmente significa que el tensioactivo es más soluble en aceite que en agua, y un EHL en el intervalo de 10-20 es más soluble en agua que en aceite. Las emulsiones incluyen preferiblemente al menos un tensioactivo que tiene un EHL de al menos 10 por ejemplo, al menos 15, o preferiblemente al menos 16.

30 [0028] La invención se puede usar con tensioactivos que incluyan, pero no se limiten a: tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente conocidos como), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), que se vende bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque lineal EO/PO; octoxinolos, que pueden variar en el número de repetición de grupos etoxi(oxi-1,2-etanodilo), con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipoli-etoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)poli-etoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); polioxietileno éteres grasos derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol lun-olauril éter (Brij 30); polioxietileno-9-lauril éter, y ésteres de sorbitán (comúnmente conocido como SPANs), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monooleato de sorbitán. Los tensioactivos recomendados para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

40 [0029] 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. También es adecuada la combinación de un éster de sorbitán polioxietileno tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipoli-etoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil incluye laureth 9 más un éster de sorbitán de polioxietileno y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden incluir un tensioactivo con un valor EHL en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, Tween 80, con un EHL de 15,0) y un tensioactivo con un valor EHL en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, Span 85, con un EHL de 1,8).

### **Formación de la primera emulsión**

50 [0030] Antes de la etapa de microfluidización, los componentes de la emulsión se mezclan para formar una primera emulsión de acuerdo con el método descrito en la reivindicación 1.

55 [0031] Las gotas de aceite de la primera emulsión puede tener un tamaño medio 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.

[0032] En la primera emulsión, el número de gotas de aceite con un tamaño de  $> 1,2 \mu\text{m}$  puede ser de  $5 \times 10^{11}/\text{ml}$  o menos, por ejemplo  $5 \times 10^{10}/\text{ml}$  o menos, o  $5 \times 10^9/\text{ml}$  o menos.

60 [0033] La primera emulsión se puede entonces microfluidizar para formar una segunda emulsión que tiene un menor tamaño medio de gota aceite que la primera emulsión y/o menos gotas de aceite con tamaño  $> 1,2 \mu\text{m}$ .

65 [0034] El tamaño medio de gota de aceite de la primera emulsión se consigue 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 rotor-estator (1).

**[0035]** Los homogeneizadores pueden operar de manera vertical y/o horizontal. Para mayor comodidad en un entorno comercial, se recomiendan los homogeneizadores en línea.

5 **[0036]** Los componentes se introducen en un homogeneizador rotor-estator y se encuentran con un rotor de rotación rápida que contiene ranuras o agujeros. Los componentes son lanzados hacia fuera por centrifugación en una a la manera de una bomba y pasan a través de las ranuras/agujeros. En algunas realizaciones, el homogeneizador incluye múltiples combinaciones de rotores y estatores, por ejemplo, una organización concéntrica de anillos de dientes de peine, como se muestra por las características (3) y (4); (5) y (6); y (7) y (8) en la Figura 1 y en la Figura 2. Los rotores en los homogeneizadores útiles a gran escala pueden tener anillos de dientes de peine en el extremo de un impulsor multi-hoja de orientación horizontal (por ejemplo, característica (9) en la figura 1) alineados en próxima resistencia para emparejar los dientes en un revestimiento estático. La primera emulsión se forma a través de una combinación de turbulencia, cavitación y cizallamiento mecánico que ocurre dentro de la brecha entre el rotor y el estator. Los componentes se introducen de manera útil en una dirección paralela al eje del rotor.

10  
15  
20 **[0037]** 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 rotación como del diámetro del rotor. Es útil una velocidad periférica de al menos  $10 \text{ ms}^{-1}$ , y de manera ideal, una velocidad superior, por ejemplo  $> 20 \text{ ms}^{-1}$ ,  $> 30 \text{ ms}^{-1}$ ,  $> 40 \text{ ms}^{-1}$ , etc. Una velocidad periférica de  $40 \text{ ms}^{-1}$  puede alcanzarse fácilmente a 10.000 rpm con un homogeneizador pequeño o a velocidades de rotación inferiores (por ejemplo, 2.000 rpm) con un homogeneizador más grande. Los homogeneizadores adecuados de alta cizalla están comercialmente disponibles.

25 **[0038]** Para la fabricación a escala comercial, el homogeneizador debería tener una velocidad de flujo de al menos 300 l/hr por ejemplo,  $> 400 \text{ l/h}$ ,  $> 500 \text{ l/h}$ ,  $> 600 \text{ l/h}$ ,  $> 700 \text{ l/h}$ ,  $> 800 \text{ l/h}$ ,  $> 900 \text{ l/h}$ ,  $> 1000 \text{ l/h}$ ,  $> 2000 \text{ l/h}$ ,  $> 5000 \text{ l/hr}$ , o incluso  $> 10000 \text{ l/hr}$ . Los homogeneizadores adecuados de alta capacidad están comercialmente disponibles.

**[0039]** Un homogeneizador recomendado proporciona una velocidad de cizallamiento de entre  $3 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , por ejemplo, entre  $3 \times 10^5$  y  $7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , entre  $4 \times 10^5$  y  $6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , por ejemplo, aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ .

30 **[0040]** Aunque los homogeneizadores de rotor-estator generan relativamente poco calor durante el funcionamiento, el homogeneizador puede enfriarse durante el uso. De forma ideal, la temperatura de la primera emulsión se mantiene por debajo de los  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante la homogeneización, por ejemplo, por debajo de los  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

35 **[0041]** 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 circular (por ejemplo, como se muestra por la característica (11) en la Figura 1). En particular, la primera emulsión se puede formar mediante la circulación de los componentes de la primera emulsión varias veces a través de un homogeneizador (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 veces etc.) Sin embargo, la realización de muchos ciclos puede no ser recomendable ya que puede producir re-coalescencia como se describe en la referencia 14. De ese modo, el tamaño de las gotas de aceite puede monitorearse si la circulación del homogeneizador se utiliza para verificar que se alcanza un tamaño de gota deseado y/o que no se está produciendo re-coalescencia.

45 **[0042]** La circulación a través del homogeneizador es ventajosa porque puede reducir el tamaño medio de las gotas de aceite en la primera emulsión. La circulación es también recomendable porque puede reducir el número de gotas de aceite con un tamaño de  $> 1,2 \text{ mm}$  en la primera emulsión. Estas reducciones en el tamaño medio de gota y el número de gotas con  $> 1,2 \text{ mm}$  en la primera emulsión pueden proporcionar ventajas en el proceso de cascada. En particular, la circulación de los componentes de la primera emulsión a través del homogeneizador puede conducir a un proceso de microfluidización mejorado que puede resultar entonces en un número reducido de gotas de aceite con  $> 1,2 \text{ mm}$  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 conducir a menos pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.

55 **[0043]** Dos tipos particulares de circulación se denominan aquí como "tipo I" y "tipo II". La circulación Tipo I se ilustra en la Figura 5, mientras que la circulación tipo II se ilustra en la Figura 6.

60 **[0044]** Una circulación tipo I consiste en la transferencia de los componentes de la emulsión entre un recipiente de mezcla previa y un homogeneizador. El recipiente de mezcla previa puede ser de 50 a 500 L de tamaño, por ejemplo, de 100 a 400 L, de 100 a 300 L, de 200 a 300 L, de 250 L o de 280 L. El recipiente de mezcla previa puede estar fabricado en acero inoxidable. La circulación de tipo I puede continuar durante 10 a 60 minutos, por ejemplo 10 a 40 minutos o 20 minutos.

65 **[0045]** La circulación de los componentes de la primera emulsión incluye una circulación de tipo II de la transferencia de los componentes de la primera emulsión desde un recipiente de primera mezcla previa, a través de un primer homogeneizador a un recipiente de segunda mezcla previa (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el

- recipiente de primera mezcla previa), y luego a través de un segundo homogeneizador. El segundo homogeneizador será generalmente el mismo que el primer homogeneizador, pero en algunas disposiciones, los homogeneizadores primero y segundo son diferentes. Tras el paso de los componentes de la primera emulsión a través del segundo homogeneizador, los componentes de la emulsión primera pueden ser transferidos de nuevo al recipiente de primera mezcla previa, por ejemplo si se va a repetir el proceso de circulación de tipo II. Así, los componentes de la emulsión pueden viajar en una ruta de figura de ocho entre los recipientes de primera y segunda mezcla previa a través de un único homogeneizador (véase la Figura 6). La circulación de tipo II puede llevarse a cabo una sola vez o varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 veces, etc.
- 5
- 10 **[0046]** 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 pasan a través del homogeneizador. El vaciado del recipiente de primera mezcla previa significa que el contenido completo de la emulsión ha pasado a través del homogeneizador, al recipiente de segunda mezcla previa. Del mismo modo, el contenido del recipiente de segunda mezcla previa puede vaciarse, de nuevo asegurándose que todo pasa a través del homogeneizador. Así, la disposición de tipo II puede asegurar de forma conveniente que todos los componentes de la emulsión se homogeneiza por lo menos dos veces, lo cual puede reducir tanto el tamaño medio de las gotas de aceite como el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de  $> 1,2$  mm en la primera emulsión. De ese modo, un tipo ideal de circulación tipo II implica vaciar el recipiente de primera mezcla previa y pasar sustancialmente todo su contenido a través del homogeneizador al recipiente de segunda mezcla previa, seguido por el vaciado del recipiente de segunda mezcla previa y volver a pasar sustancialmente todo su contenido a través del homogeneizador de nuevo al recipiente (vacío) de primera mezcla previa. Así, todas las partículas pasan a través del homogeneizador al menos dos veces, lo cual es difícil de lograr la circulación de tipo I.
- 15
- 20
- 25 **[0047]** En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de 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 de  $> 1,2$  mm en la primera emulsión. Esta combinación puede incluir cualquier orden de circulación de tipo I y II, por ejemplo, de tipo I seguido de tipo II, tipo II seguido de tipo I, tipo I seguido de tipo I seguido de tipo I de nuevo, etc. En una realización, la combinación incluye 20 minutos de circulación de tipo I seguida por una sola circulación de tipo II, es decir, la transferencia de los componentes circulados de la primera emulsión desde un recipiente de primera mezcla previa, a través de un primer homogeneizador a un recipiente de segunda mezcla previa, y luego una vez a través de un segundo homogeneizador.
- 30
- 35 **[0048]** Los recipientes de mezcla previa primera y segunda pueden mantenerse bajo un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno, de hasta 0,5 bares. 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.
- 40 **[0049]** Como se mencionó 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 individualmente pero, en algunas formas de realización, varios componentes se pueden combinar antes de esta mezcla. Por ejemplo, si la emulsión incluye un tensioactivo con un EHL inferior a 10, entonces este tensioactivo puede combinarse con un aceite antes de la mezcla. De manera similar, si la emulsión incluye un tensioactivo con un EHL superior a 10, entonces este tensioactivo puede combinarse 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.
- 45
- 50 **[0050]** Los métodos de la invención se pueden utilizar a gran escala. De ese modo, un método puede implicar la preparación de una primera emulsión, cuyo volumen es mayor de 1 litro por ejemplo,  $> 5$  litros,  $> 10$  litros,  $> 20$  litros,  $> 50$  litros,  $> 100$  litros,  $> 250$  litros, etc.
- 55 **[0051]** Después de su formación, la primera emulsión puede microfluidizarse, o se puede almacenar a la espera de microfluidización.
- 60 **[0052]** En algunas realizaciones, en particular aquellas en las que se utilizan múltiples ciclos de los pasos (i) y (ii), la entrada para el homogeneizador será la salida de un microfluidizador, de tal manera que la primera emulsión se microfluidiza y luego se somete de nuevo a homogeneización.
- Microfluidización**
- 60 **[0053]** Después de su formación, la primera emulsión se puede microfluidizar con el fin de reducir su tamaño medio de gota de aceite y/o para reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de  $> 1,2$  mm.
- 65 **[0054]** Los instrumentos de microfluidización reducen el tamaño medio de las gotas de aceite mediante la propulsión de corrientes de componentes de entrada a través de canales geoméricamente fijados a alta presión y alta velocidad. La presión a la entrada de la cámara de interacción (también llamada "primera presión") puede ser

sustancialmente constante (es decir,  $\pm 15\%$ ; por ejemplo,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 2\%$ ) durante por lo menos un 85% del tiempo durante el cual los componentes se alimentan en el microfluidizador, por ejemplo, al menos un 87%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99% o el 100% del tiempo durante el cual se alimenta la emulsión en el microfluidizador.

5 **[0055]** En una realización, la primera presión es de 1300 bares  $\pm 15\%$  (18 kPSI  $\pm 15\%$ ), es decir, entre 1100 y 1500 bares entre 15 kPSI y 21 kPSI) para un 85% del tiempo durante el cual 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 un 85% del tiempo, mientras que en la Figura 3B la presión permanece de manera continua y sustancialmente constante.

10 **[0056]** Un aparato de microfluidización incluye habitualmente al menos una bomba intensificadora (preferiblemente dos bombas, que pueden ser simultáneas) y una cámara de interacción. La bomba intensificadora, que de manera ideal se impulsa de forma electro-hidráulica, proporciona alta presión (es decir, la primera presión) para forzar una emulsión en y a través de la cámara de interacción. La naturaleza simultánea de las bombas intensificadoras se puede utilizar para proporcionar la presión sustancialmente constante de la emulsión mencionada anteriormente, lo que significa que las gotas de la emulsión están todas expuestas sustancialmente al mismo nivel de fuerzas de cizallamiento durante la microfluidización.

15 **[0057]** 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 pueden 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 con un tamaño de  $> 1,2$  mm presentes en la segunda emulsión se puede reducir. Además, el tamaño medio de gota de aceite de la segunda emulsión puede reducirse cuando se utiliza una presión sustancialmente constante. La reducción en el tamaño medio de gota de aceite y en el número de gotas de aceite con un tamaño  $> 1,2$  mm en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento mejorado de filtración. El rendimiento de filtración mejorado puede conducir a menos pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión es MF59.

20 **[0058]** La cámara de interacción puede contener varios, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc., de los canales de geometría fija a la que pasa la emulsión. La emulsión entra en la cámara de interacción a través de una línea de entrada que puede tener un diámetro de entre 200 y 250  $\mu\text{m}$ . La emulsión se divide en corrientes de medida cuando entra en la cámara de interacción y, a alta presión, acelera a alta velocidad. A medida que pasa a través de los canales, las fuerzas producidas por la alta presión pueden actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión y reducir la cantidad de gotas de aceite con un tamaño de 1,2 mm. Estas fuerzas pueden incluir: fuerzas de cizallamiento, a través de la deformación de la corriente de emulsión que se producen por el contacto con las paredes del canal; las fuerzas de impacto, por medio de colisiones que ocurren cuando las corrientes de emulsión de alta velocidad chocan unas con otras, y las fuerzas de cavitación, a través de formación y colapso de las cavidades dentro de la corriente. La cámara de interacción por lo general no incluye partes móviles. Puede incluir superficies de canales de cerámica (alúmina, por ejemplo) o diamante (diamante policristalino, por ejemplo). Otras superficies pueden estar hechas de acero inoxidable.

25 **[0059]** La geometría fija de la pluralidad de canales en la cámara de interacción puede ser geometría tipo "Y" o geometría de tipo "Z".

30 **[0060]** En una cámara de interacción de geometría de tipo Y, un flujo único de entrada de emulsión se divide en corrientes de emulsión primera y segunda, que después se recombinan en un flujo de salida de emulsión única. Antes de la recombinación, cada una de las corrientes de emulsión primera y segunda puede ser dividida de forma independiente en una primera y segunda pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de subcorrientes. Cuando las corrientes de emulsión se recombinan, las corrientes de emulsión primera y segunda (o sus subcorrientes) fluyen perfectamente en direcciones sustancialmente opuestas (por ejemplo, las corrientes de emulsión primera y segunda, o sus subcorrientes, fluyen sustancialmente en el mismo plano ( $\pm 20^\circ$ ) y la dirección de flujo de la corriente de la primera emulsión es  $180 \pm 20^\circ$  diferente de la dirección de flujo de la corriente de la segunda emulsión). Las fuerzas producidas cuando las corrientes de emulsión se recombinan puede actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de  $> 1,2$  mm.

35 **[0061]** En una cámara de interacción de geometría de tipo Z la corriente de emulsión pasa alrededor de una varias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) esquinas en ángulo sustancialmente recto (es decir,  $90 \pm 20^\circ$ ). La Figura 4 ilustra una cámara de interacción con geometría de 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 puede dividirse en una varias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) subcorrientes y entonces se recombinan en una sola salida de corriente de emulsión (por ejemplo, como se muestra en la Figura 4, con cuatro subcorrientes (32)). La división y después la recombinación (31) puede suceder en cualquier punto entre la entrada y la salida. Las fuerzas que se producen cuando la emulsión contacta con las paredes del canal a medida que pasa alrededor de las esquinas pueden actuar

para reducir el tamaño de la emulsión de gotas de aceite y reducir el número de gotas de aceite que con un tamaño > 1,2 mm. Un ejemplo de una cámara de interacción de tipo Z es la cámara de interacción E230Z de Microfluidics.

5 **[0062]** En una realización, la corriente de emulsión pasa alrededor de dos esquinas en ángulo sustancialmente recto. En el punto cuando la corriente de emulsión de entrada pasa alrededor de la primera esquina en ángulo sustancialmente recto, se divide en cinco subcorrientes. En el punto en el que las corrientes pasan alrededor de la segunda esquina sustancialmente en ángulo recto, se recombinan en una única corriente de emulsión de salida.

10 **[0063]** En la técnica anterior ha sido habitual el uso de cámaras de tipo Y de interacción para emulsiones de aceite en agua, como las de la presente invención. Sin embargo, hemos descubierto que es ventajoso usar una cámara de interacción de geometría de canal de tipo Z para emulsiones de aceite en agua, porque esto puede conducir a una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de > 1,2 mm presentes en la segunda emulsión en comparación con una cámara de interacción de geometría de tipo Y. La reducción en el número de gotas de aceite con un tamaño > 1,2 mm en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede conducir a menos pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión es MF59.

15 **[0064]** Un aparato de microfluidización recomendable opera a una presión de entre 170 y 2750 bares (aproximadamente de 2500 psi a 40000 psi), por ejemplo aproximadamente a 345 bares, a unos 690 bares, aproximadamente a 1380 bares, a unos 2.070 bares, etc.

20 **[0065]** Un aparato de microfluidización recomendable 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

25 **[0066]** Un aparato de microfluidización recomendable tiene una cámara de interacción que proporciona una velocidad de cizallamiento de más de  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  por ejemplo,  $> 2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $> 5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $> 10^7 \text{ s}^{-1}$ , etc.

30 **[0067]** 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.

35 **[0068]** El dispositivo de microfluidización puede incluir un módulo de procesamiento auxiliar (APM), que incluya al menos un canal. El APM contribuye a la reducción en el tamaño medio de las 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 mencionó anteriormente, los componentes de la emulsión se introducen en la cámara de interacción por la bomba intensificadora bajo una primera presión. Los componentes de la emulsión generalmente salen del APM a una segunda presión que es inferior a la primera presión (presión atmosférica, por ejemplo). En general, entre un 80 y un 95% de diferencia de presión entre la primera y la segunda presión a través de la cámara de interacción (por ejemplo, de  $P_1$  a  $P_4$  en la Figura 4) y de 5 a 20% de diferencia de presión entre la primera y la segunda caída de presión a través del 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 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 presión, 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.

45 **[0069]** El APM generalmente no incluye partes móviles. Puede incluir superficies de los canales de cerámica (alúmina, por ejemplo) o de diamante (diamante policristalino, por ejemplo). Otras superficies pueden estar hechas de acero inoxidable.

50 **[0070]** El APM se coloca generalmente aguas abajo en relación a la cámara de interacción y también se puede colocar de forma secuencial a la cámara de interacción. En la técnica anterior, las medidas de protección correspondientes se colocan generalmente aguas abajo de las cámaras de interacción que incluye 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 previa los APM generalmente se sitúan aguas arriba de las cámaras de interacción que incluyen canales de tipo Z para reducir el tamaño de los 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 las APM aguas abajo de una cámara de interacción que incluye varios canales de tipo Z es ventajoso en la presente invención, ya que puede conducir a una mayor reducción en el tamaño medio de las gotas de aceite y una mayor reducción en el número de gotas de aceite con un tamaño de > 1,2 mm presentes en la segunda emulsión. Como se discutió anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite con un tamaño > 1,2 mm en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento mejorado de filtración. El rendimiento de filtración mejorado puede conducir a menos pérdidas de 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 aguas abajo es que puede conducir a una disminución más lenta de la presión después de la cámara de interacción. La disminución más lenta de la presión puede conducir a un aumento en la estabilidad del producto, porque hay menos gas encerrado en la emulsión.



- 5 [0071] Un APM contiene por lo menos un canal de geometría fija al que pasa la emulsión. El APM puede contener varios, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc, canales de geometría fija a los que pasa la emulsión. El canal o canales de la APM puede ser lineal o no lineal. Los canales no lineales adecuados son de geometría tipo "Z" o "Y", que son los mismos que los descritos anteriormente para la cámara de interacción. En una realización, el canal, o canales, de la APM son de geometría tipo Z. Varios canales de tipo Z dividen la emulsión en corrientes a medida que entran en el APM.
- 10 [0072] En contraste con las recomendaciones del fabricante, el uso de un APM que incluya varios canales de geometría fija es recomendable en comparación con un único canal APM de geometría fija, ya que puede conducir a una mayor reducción en el número de gotas de aceite con un tamaño de  $> 1,2$  mm presentes en la segunda emulsión. Como se discutió anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite con un tamaño de  $> 1,2$  mm en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento mejorado de filtración. El rendimiento de filtración mejorado puede conducir a menos pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.
- 15 [0073] Un aparato de microfluidización genera calor durante el funcionamiento, lo que puede elevar la temperatura de una emulsión en 15-20 °C con respecto a la primera emulsión. De manera ventajosa, 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. Así salida de una cámara de interacción y / o una salida de APM puede alimentar a un mecanismo de enfriamiento, tal como un intercambiador de calor o serpentín de refrigeración. La distancia entre la salida y el mecanismo de enfriamiento debe mantenerse lo más corta posible para acortar el tiempo global mediante la reducción de los retrasos de refrigeración. En una realización, la distancia entre la salida del microfluidizador y el mecanismo de enfriamiento es de entre 20-30cm. Un mecanismo de refrigeración es particularmente útil cuando una emulsión se somete a pasos múltiples de microfluidización, para prevenir el sobrecalentamiento de la emulsión.
- 20 [0074] El resultado de la microfluidización es una emulsión de aceite en agua, la segunda emulsión, en la que el tamaño medio de las 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 el 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 con un tamaño de  $> 1,2$  mm es  $5 \times 10^{10}$ /ml o menos, por ejemplo  $5 \times 10^9$ /ml o menos,  $5 \times 10^8$ /ml o menos, o  $2 \times 10^8$ /ml o menos.
- 25 [0075] La entrada inicial para la microfluidización puede ser la primera emulsión. En algunas realizaciones, sin embargo, la emulsión microfluidizada se somete de nuevo a microfluidización, de tal manera que suceden múltiples rondas de microfluidización. De manera particular, la segunda emulsión puede formarse mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización varias veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces, etc. La segunda emulsión se puede formar mediante la circulación de los componentes de la emulsión a través de un segundo dispositivo de microfluidización de 4 a 7 veces.
- 30 [0076] La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede incluir una circulación tipo I de transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un recipiente de la primera emulsión (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el recipiente de primera mezcla previa) y el dispositivo de microfluidización.
- 35 [0077] La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede incluir una circulación de tipo II de transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un recipiente de la primera emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización a un recipiente de la segunda emulsión (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el recipiente de primera mezcla previa), y luego a través de un segundo dispositivo de microfluidización.
- 40 [0078] El segundo dispositivo de microfluidización puede ser el mismo que el primer dispositivo de microfluidización. Alternativamente, el segundo dispositivo de microfluidización puede ser diferente que el primer dispositivo de microfluidización.
- 45 [0079] El recipiente de la primera emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la primera mezcla previa. Alternativamente, el recipiente de la primera emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la segunda mezcla previa.
- 50 [0080] El recipiente de la segunda emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la primera mezcla previa. Alternativamente, el recipiente de la segunda emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la segunda mezcla previa.
- 55 [0081] El recipiente de la primera emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la primera mezcla previa y el recipiente de la segunda emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la segunda mezcla previa.
- 60
- 65

Alternativamente, el recipiente de la primera emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la segunda mezcla previa ya que el recipiente de la segunda emulsión puede ser el mismo que el recipiente de la primera mezcla previa.

5 [0082] Como alternativa, los recipientes de la emulsión primera y segunda pueden ser diferentes a los recipientes de la primera y segunda mezcla previa.

10 [0083] Tras el paso de los componentes de la segunda emulsión a través del segundo dispositivo de microfluidización, los componentes de la segunda emulsión pueden ser transferidos de nuevo al recipiente de la primera emulsión, por ejemplo si el proceso de circulación de tipo II se va a repetir. La circulación de tipo II se puede llevar a cabo una sola vez o varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 veces, etc.

15 [0084] La circulación de tipo II es ventajosa ya que asegura que todos los componentes de la segunda emulsión han pasado por el dispositivo de microfluidización al menos 2 veces, lo que reduce el tamaño medio de las gotas de aceite y el número de gotas de aceite con un tamaño de  $> 1,2$  mm en la segunda emulsión.

[0085] Una combinación de circulación de tipo I y circulación de tipo II se puede usar durante la microfluidización. Esta combinación puede incluir cualquier orden de circulación 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 de tipo I de nuevo, etc

20 [0086] Los recipientes de emulsión primera y segunda pueden mantenerse bajo un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno, de hasta 0,5 bares. 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 [0087] Los métodos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Así, un método puede implicar la microfluidización a un volumen superior a 1 litro por ejemplo,  $> 5$  litros,  $> 10$  litros,  $> 20$  litros,  $> 50$  litros,  $> 100$  litros,  $> 250$  litros, etc.

### 30 *Filtración*

[0088] Después de la microfluidización, la segunda emulsión puede filtrarse. Esta filtración elimina las gotas de aceite de gran tamaño que han sobrevivido a los procedimientos de homogeneización y microfluidización. Aunque pequeñas en términos de número, 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 se puede lograr la esterilización de filtro.

40 [0089] La membrana de filtración especialmente adecuado para la esterilización de filtro depende de las características del fluido de la segunda emulsión y el 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 basada en escualeno.

45 [0090] 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 de  $> 1$  mm, mientras que se permita el paso de las gotas de  $< 200$  nm. Un filtro de 0,2 mm o 0,22 mm es ideal, y también puede lograr la esterilización de filtro.

50 [0091] La emulsión puede prefiltrarse por ejemplo a través de un filtro de 0,45 mm. La prefiltración y filtración se puede lograr en un solo paso mediante el uso de filtros conocidos de doble capa que incluyan 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, de manera ideal, un tamaño de poro de  $> 0,3$  mm, como por ejemplo entre 0,3 y 2mm, entre 0,3 y 1 mm, o entre 0,4 y 0,8mm, o entre 0,5 y 0,7mm. Un tamaño de poro de  $< 0,75$  mm en la primera capa es recomendable. Así, la primera capa puede tener un tamaño de poro de 0,6 mm o 0,45 mm, por ejemplo. La segunda capa tiene, de manera ideal, un tamaño de poro que menor de un 75% (y, preferiblemente, menos de la mitad de) que el tamaño de poro de la primera capa, por ejemplo, entre un 25 y un 70% o entre un 25 y un 49% del tamaño de poro de la primera capa, por ejemplo entre un 30 y un 45%, como por ejemplo 1/3 o 4/9, del tamaño de poro de la primera capa. Así, la segunda capa puede tener un tamaño de poro de  $< 0,3$  mm, como por ejemplo entre 0.15 y 0.28mm o entre 0.18 y 0.24mm por ejemplo, 0,2 mm o 0,22 mm. En un ejemplo, la primera capa de membrana con poros de mayor tamaño proporciona un filtro de 0,45 mm, mientras que la segunda capa de membrana con poros más pequeños proporciona un filtro de 0,22 mm.

65 [0092] La membrana de filtración y/o la membrana de prefiltración pueden ser asimétricas. Una membrana asimétrica aquella en la que el tamaño de poro varía de un lado de la membrana al otro por ejemplo en 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 denominarse como "superficie de poro grueso", mientras que el otro lado de la membrana asimétrica puede

denominarse como "superficie de poro fino". En un filtro de doble capa, una o (de manera ideal) ambas capas pueden ser asimétricas.

5 **[0093]** La membrana de filtración puede ser porosa u homogénea. Una membrana homogénea es por lo general una película densa que va desde 10 hasta 200 mm. 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 porosa, ambas capas pueden ser homogéneas, o puede haber una capa porosa y una capa homogénea. Un filtro recomendable de doble capa es aquel en el que ambas capas son porosas.

10 **[0094]** En una realización, la segunda emulsión se filtra previamente a través de una membrana asimétrica, porosa e hidrófila y después se filtra a través de otra membrana asimétrica porosa e hidrófila que tiene poros más pequeños que la membrana de prefiltración. Esto puede utilizar un filtro de doble capa.

15 **[0095]** El filtro de membrana pueden ser esterilizados en autoclave antes de su uso para asegurarse de que es estéril.

20 **[0096]** Las membranas de filtración se hacen típicamente de materiales de soporte poliméricos tales como PTFE (poli-tetra-fluoro-etil-eno), PES (polietersulfona), PVP (polivinilpirrolidona), PVDF (fluoruro de polivinilideno), nylons (poliamidas), PP (polipropileno), celulosas (incluyendo ésteres de celulosa), PEEK (poliéter-éter), nitrocelulosa, etc. Estos tienen diferentes características, con algunos soportes 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 tratados con otros materiales (tales como otros polímeros, grafito, silicona, etc) para recubrir 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 (de manera ideal) del mismo material.

25

30 **[0097]** Un filtro ideal para uso con la invención tiene una superficie hidrófila, en contraste con la enseñanza de las referencias 9-12 que sostiene 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 uso con la invención es una membrana hidrofílica de polietersulfona. Varios métodos diferentes son conocidos para transformar las membranas hidrofóbicas PES en membranas hidrófilas PES. A menudo se consigue por recubrimiento de la membrana con un polímero hidrófilo. Para proporcionar la fijación permanente del polímero hidrófilo a la PES, una capa de recubrimiento hidrófilo se somete, por lo general, a una reacción de reticulación o de injerto. La referencia 15 describe un procedimiento para la modificación de las propiedades superficiales de un polímero hidrófobo que tiene extremos de cadena funcionalizables, incluyendo la puesta en contacto del polímero con una solución de un resto de enlace para formar un enlace covalente, y luego la puesta en contacto del polímero hidrófobo llevado a reacción con una solución de un agente de modificación. La referencia 16 describe un método de hidrofiliación de membrana PES por recubrimiento directo de membrana, que implica la humectación previa con alcohol, seguida de 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 entonces 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 17 y 18 describen un recubrimiento de membrana PES por inmersión en una solución acuosa de polímero hidrofílico (óxido de polialquileno) y al menos un monómero polifuncional (reticulante) y, a continuación, la polimerización de un monómero para proporcionar un revestimiento hidrófilo no extraíble. La referencia 19 describe la hidrofiliación de membrana PES por una reacción de injerto en la que una membrana PES se somete a tratamiento de plasma de helio a baja temperatura seguido por injerto de monómero hidrófilo N-vinil-2-pirrolidona (NVP) sobre la superficie de la membrana. Tales procesos adicionales se describen en las referencias 20 a 26.

35

40

45

50 **[0098]** En los métodos que no dependen del recubrimiento, la PES puede disolverse en un disolvente, mezclada con un aditivo hidrófilo soluble, y después la solución mezclada se utiliza para moldear una membrana hidrófila, por ejemplo, por precipitación o mediante el inicio de la co-polimerización. Dichos métodos se describen en las referencias 27 a 33. Por ejemplo, la referencia 33 describe un método de preparación de una membrana hidrofílica de carga modificada que tiene extraíbles de baja membrana y permite la recuperación rápida de resistividad de agua ultrapura, que tiene una estructura de red de polímero reticulada e interpenetrantes formada por realización de una solución de polímero con una mezcla de PES, PVP, polietilenimina, y éter diglicidil alifático, formando una película fina de la solución, y la precipitando la película como una membrana. Un proceso similar se describe en la referencia 34.

55

60

**[0099]** Los enfoques híbridos se pueden utilizar, en los que los aditivos hidrófilos están presentes durante la formación de la membrana y también se añaden más tarde como revestimiento, por ejemplo, véase la referencia 35.

65 **[0100]** La hidrofiliación de membrana PES también se puede lograr por tratamiento con plasmas de baja temperatura. La referencia 36 describe la modificación hidrófila de membrana PES por el tratamiento de plasma CO<sup>2</sup> con bajas temperaturas.

**[0101]** La hidrofiliación de membrana PES también se puede lograr por oxidación, como se describe en la referencia 37. Este método implica la humectación previa de una membrana PES hidrófoba en un líquido que tiene una tensión superficial baja, exponiendo la membrana PES húmeda a una solución acuosa de oxidante y, a calentándola a continuación.

**[0102]** La inversión de fases también se puede utilizar, tal como se describe en la referencia 38.

**[0103]** Una membrana 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 descubierto para dar una membrana hidrofiliada PES que se contamina fácilmente (especialmente cuando se utiliza una emulsión de escualeno) y también libera formaldehído de manera poco recomendable, durante el tratamiento en autoclave.

**[0104]** Un filtro de doble capa preferido tiene una primera membrana hidrófila PES y una segunda membrana hidrófila PES.

**[0105]** Las membranas hidrófilas conocidas incluyen Bioassure (de Cuno); EverLUX™ polietersulfona; Stylux™ polietersulfona (ambos de Meissner); membranas Millex GV, Millex HP, Millipak 60, Millipak 200 y Durapore CVGL01TP3 (de Millipore); Membrana Fluorodyne EX™ EDF, Supor™ EAV; Supor™ EBV, Supor™ EKV (todas de Pall); Sartopore™ (de Sartorius); membrana PES hidrófila de Sterlitech y membrana PES WFPES de Wolftechnik.

**[0106]** 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.

**[0107]** Es ventajoso llevar a cabo la etapa de filtración dentro de un periodo de 24 horas, por ejemplo dentro de un periodo de 18 horas, de 12 horas, de 6 horas, de 2 horas, 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 que el filtro se obstruya, como se menciona en la referencia 39.

**[0108]** Los métodos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Así, un método 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***

**[0109]** El resultado de la microfluidización y de la filtración es una emulsión de aceite en agua en la que el tamaño medio de las gotas de aceite puede ser menor que 220 nm, por ejemplo,  $155 \pm 20$  nm,  $155 \pm 10$  nm o  $155 \pm 5$  nm, y en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño > 1,2 mm puede ser de  $5 \times 10^8$ /ml o menos, por ejemplo  $5 \times 10^7$ /ml o menos,  $5 \times 10^6$ /ml o menos,  $2 \times 10^6$ /ml o menos, o  $5 \times 10^5$  / ml o menos.

**[0110]** El tamaño medio de gota de aceite de las emulsiones descritas en este documento (incluyendo las emulsiones primera y segunda) es por lo general de no menos de 50 nm.

**[0111]** Los métodos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Así, un método 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

**[0112]** Una vez que la emulsión de aceite en agua se ha formado, puede transferirse a botellas de vidrio estériles. Las botellas de vidrio pueden ser de 5 l, 8 l, o 10 l. Alternativamente, el aceite en agua puede transferirse a una bolsa estéril flexible (bolsa flexible). La bolsa flexible puede ser de 50 l, 100 l o 250 l. Además, la bolsa flexible puede estar provista de 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 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.

**[0113]** Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final es de entre 2 y 20%, por ejemplo aproximadamente el 10%. Un contenido en escualeno de aproximadamente 5% o aproximadamente 10% es particularmente útil. Un contenido en escualeno (w/v) de entre 30-50mg/ml es útil, por ejemplo, entre 35-45mg/ml, 36-42mg/ml, 38-40mg/ml, etc.

**[0114]** 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 (w / v) de entre 4-6mg/ml es útil por ejemplo, entre 4.1-5.3mg/ml. Un contenido de trioleato de sorbitán (w/v) de entre 4-6mg/ml es útil por ejemplo, entre 4.1-5.3mg/ml.

**[0115]** El proceso es particularmente útil para preparar cualquiera de las siguientes emulsiones de aceite en agua:

- Una emulsión que incluye 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 por ejemplo, iones de citrato, por ejemplo 10 mM de tampón de citrato de sodio.

- Emulsiones que contienen escualeno, un a-tocoferol (idealmente DL-a-tocoferol) y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener (en peso) 2-10% de escualeno, 2-10% de a-tocoferol y 0,3 a 3% de polisorbato 80 por ejemplo, 4,3% de escualeno, 4,7% de a-tocoferol, y 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 puede estar presentes en una relación de volumen de alrededor de 5:2, o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión tal se puede hacer por disolución de polisorbato 80 en PBS para dar una solución al 2%, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL-a-tocoferol y 5 ml de escualeno), y microfluidizando la mezcla a continuación. La emulsión resultante puede tener gotas submicrónicas de aceite, 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 también puede incluir un monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3 D-MPL '). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que incluya escualeno, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de a-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo 750mg/ml de polisorbato 80, 110mg/ml de Triton X-100 y 100mg/ml de succinato de a-tocoferol) y estas concentraciones deberán incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede también incluir un 3d-MPL. La emulsión puede también incluir una saponina, tal como QS21. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que incluye escualeno, un disolvente acuoso, un polioxietileno alquil éter agente tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, polioxietileno (12) cetostearyl 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 también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa), y/o un alquilpoliglicósido. También puede incluir un agonista de TLR4, como uno cuya estructura química no incluya un anillo de azúcar [41]. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.

**[0116]** Las composiciones de estas emulsiones, expresadas anteriormente en términos de porcentaje, pueden ser modificadas por dilución o concentración (por ejemplo por un número entero, como 2 o 3 o por una fracción, tal como 2/3 o 3/4), en las que sus coeficientes no cambian. Por ejemplo, un MF59 concentrado 2 veces tendría aproximadamente un 10% de escualeno, aproximadamente un 1% de polisorbato 80 y aproximadamente un 1% de trioleato de sorbitán. Las formas concentradas pueden diluirse (por ejemplo, con una solución de antígeno) para dar una concentración final deseada de la emulsión. Las emulsiones de la invención se almacenan de manera ideal a entre 2 °C y 8 °C. No debe congelarse. Lo ideal es mantenerlas alejadas de una fuente de luz directa. En particular, las emulsiones y vacunas de la invención que contienen escualeno deben protegerse para evitar la descomposición fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones de la invención se almacenan, entonces se hará preferiblemente en una atmósfera inerte, por ejemplo, N<sub>2</sub> o argón.

### **Vacunas**

**[0117]** Aunque es posible administrar adyuvantes en emulsión de aceite en agua 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 un antígeno puede tener lugar extemporáneamente, en el momento de uso, o puede tener lugar durante la fabricación de la vacuna, antes del llenado. Los métodos de la invención se pueden aplicar en ambas situaciones.

**[0118]** Así pues, un método de la invención puede incluir una etapa de proceso adicional de la mezcla de la emulsión con un componente antigénico. Como alternativa, puede incluir una etapa adicional de envasado del adyuvante en un kit como componente del kit junto con un componente antigénico.

5 [0119] 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 mezclarse. Cuando la mezcla tiene lugar durante la fabricación, los volúmenes de antígeno a granel y la emulsión que se mezclan será habitualmente mayor que 1 litro por ejemplo, > 5 litros, > 10 litros, >20 litros, > 50 litros, >100 litros, > 250 litros, etc. donde la mezcla tiene lugar en el punto de uso a continuación, los volúmenes que se mezclan normalmente serán menores que 1 mililitro por ejemplo, <0,6 ml, <0,5 ml, <0,4 ml, <0,3 ml, <0,2 ml, etc. En ambos casos, es habitual que los volúmenes sustancialmente iguales de la emulsión y la solución de antígeno para 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, se puede usar un exceso de emulsión o un exceso de antígeno [42]. Cuando se utiliza un volumen en exceso de un componente, el exceso será generalmente de al menos 1,5:1 por ejemplo, >2:1, > 2,5:1, > 3:1, > 4:1, > 5:1, etc.

15 [0120] Cuando se presentan antígeno y adyuvante 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 eliminación de los contenidos de un vial y la adición de ellos al otro vial, o por separado eliminando los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.

20 [0121] En otra disposición, uno de los componentes del kit está en una jeringuilla y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringuilla se puede utilizar (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el vial a mezclar, y la mezcla se puede retirar con la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla se pueden administrar a un paciente, normalmente a través de una nueva aguja estéril. El envasado de un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla separada para la administración al paciente.

25 [0122] En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero por separado en la misma jeringuilla, por ejemplo, una jeringuilla de doble cámara, tales como las descritos en las referencias 43-50 etc. Cuando la jeringuilla se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezcla. Esta disposición evita la necesidad de una etapa separada de mezcla en el momento de uso.

30 [0123] El contenido de los diversos componentes del generalmente estará 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 la administración a un paciente. Un componente liofilizado se encuentra habitualmente dentro de un vial en lugar de una jeringuilla. Los componentes secos pueden incluir estabilizantes tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Una posible disposición usa una emulsión de componente líquido en una jeringuilla precargada y un componente antígeno liofilizado en un vial.

35 [0124] Si las vacunas contienen componentes adicionales a la emulsión y al antígeno, entonces estos componentes adicionales pueden incluirse en uno de estos dos componentes del kit, o pueden ser parte de un tercer componente del kit.

40 [0125] Los recipientes adecuados para vacunas mixtas de la invención, o para los componentes individuales del kit, incluyen viales y jeringuillas desechables. Estos recipientes deben ser estériles.

45 [0126] Cuando una composición / componente se encuentra en un vial, el vial se hace preferiblemente de un cristal o de un material plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de que la composición se añada al mismo. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón sin látex, y la se recomienda 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 de 10 dosis. En una realización, un vial incluye 10 x 0,25 ml dosis de emulsión. Los viales recomendables están hechos de vidrio incoloro.

50 [0127] Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre Luer) adaptado de tal manera que una jeringuilla precargada pueda insertarse en la tapa, el contenido de la jeringuilla pueda ser expulsado en el vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en el mismo), y el contenido del vial pueda ser retirado de nuevo en la jeringuilla. Después de retirar la jeringuilla 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 que eliminarse antes de que se pueda acceder al tapón.

55 [0128] Cuando una composición/componente se envasa en una jeringuilla, la jeringuilla no tendrá normalmente una aguja unida a ella, aunque se puede administrar una aguja separada con la jeringuilla para el montaje y el uso. Se recomiendan las agujas de seguridad. Las agujas típicas son las de 1 pulgada de calibre 23, las de 1 pulgada de calibre 25 y las de 5/8 pulgadas de calibre 25. Las jeringuillas pueden estar provistas de etiquetas despegables en

las que se puede imprimir el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos impresos, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo de la jeringuilla tiene preferiblemente un tapón para evitar que el sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener un tapón y/o émbolo de látex de caucho. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringuilla 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 hecho preferiblemente de un caucho de butilo. Si la jeringuilla y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja estará preferentemente provista de un escudo de caucho de butilo.

**[0129]** La emulsión se puede diluir con un tampón antes de su envasado en un vial o una jeringuilla. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato; un tampón de histidina, o un tampón de citrato. La dilución puede reducir la concentración de componentes del adyuvante, conservando su ejemplo proporciones relativas para proporcionar un adyuvante "medio-fuerte".

**[0130]** Los recipientes pueden marcarse para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar la administración a los niños. Por ejemplo, una jeringuilla que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre un volumen de 0,25 ml.

**[0131]** Cuando un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial) se utiliza, a continuación, se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

**[0132]** Se pueden utilizar antígenos 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 gripe, 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*, *Bacillus anthracis*, virus de Epstein Barr, virus del papiloma humano, etc. Por ejemplo:

- Antígenos del virus influenza. Estos pueden tomar la forma de un virus vivo o de un virus inactivado. Cuando se utiliza un virus inactivado, la vacuna puede incluir virión entero, virión dividido o antígenos de superficie purificados (incluida la hemaglutinina y, normalmente, incluyendo también 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, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. La vacuna puede incluir antígenos de una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus influenza, incluyendo el virus de la gripe A y/o B, por ejemplo, una vacuna monovalente A/H5NI o A/H1N1, o una vacuna trivalente A/H1N1+A/H3N2+B. El virus de la gripe puede ser una cepa recombinante, y puede haberse obtenido por técnicas de genética inversa [por ejemplo, 51-55]. Así, 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, con los segmentos HA y N de una cepa de vacuna, un reordenamiento 6:2). Los virus utilizados como fuente de los antígenos pueden cultivarse bien en huevos (por ejemplo, huevos de gallina embrionados) o en un cultivo celular. Cuando se usa el cultivo celular, el sustrato celular será habitualmente una línea celular de mamífero, tales como MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Preferido líneas celulares de mamífero para los virus de influenza crecimiento incluyen: células MDCK [56-59], derivado de Madin Darby de riñón canino, 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, de manera ventajosa, estará libre de proteínas de huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, lo que reduce la alergenicidad. Las dosis unitarias de vacuna se normalizan habitualmente por referencia al contenido de hemaglutinina (HA), que normalmente se mide mediante SRID. Las vacunas existentes contienen habitualmente de aproximadamente 15 mg de HA por cepa, aunque se pueden utilizar dosis más bajas, particularmente cuando se usa un adyuvante. Las dosis fraccionarias tales como © (es decir, 7,5 mg de HA por cepa), V y V se han utilizado [64,65], al tener dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9x [66,67]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 mg de HA por cepa de influenza, preferiblemente entre 0,1 y 50 mg por ejemplo, 0,1-20mg, 0,1-15mg, 0,1-10mg, 0,1-7.5mg, 0,5-5mg, 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.

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

- Antígenos de superficie del virus de la hepatitis B. Este antígeno se obtiene preferiblemente mediante métodos 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 no es glicosilado. Puede estar en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro medio de aproximadamente 20 nm), incluyendo una matriz lipídica que incluye fosfolípidos. A diferencia de las

partículas de HBsAg nativas, las partículas expresadas de levadura pueden incluir fosfatidilinositol. El 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 de tipo astacina) y/o una hemoglobinasa aspártica (Ac-APR-1), que puede expresarse en un sistema de baculovirus/células insecto como una proteína secretada [68, 69].

• Antígenos del virus herpes simplex (HSV). Un antígeno del HSV preferido para usar con la invención es la glicoproteína de fgD. Se prefiere el uso de gD de una cepa de HSV-2 ('gD2' antígeno). La composición puede usar una forma de gD en la que la región de la membrana C-terminal de anclaje ha sido eliminada [70] por ejemplo, un gD truncado que incluye 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 madura de 283 aminoácidos. La delección del ancla permite que la proteína se prepare en forma soluble.

• Antígenos del virus del papiloma humano (VPH). Los antígenos de VPH preferidos para usar con la invención son las proteínas de la cápside L1, que se pueden ensamblar para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLPs). Las VLPs pueden producirse por expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S. cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en células de *Spodoptera*, tales como *S. frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para las células de levadura, los vectores plasmídicos pueden portar el gen L1, para células de insectos, los vectores de baculovirus pueden portar el gen L1. Más preferiblemente, la composición incluye VLPs de L1 tanto de las cepas HPV-16 como de HPV-18. Esta combinación bivalente se ha demostrado como altamente efectiva [71]. Además de las cepas HPV-16 y HPV-18, también es posible incluir VLPs de L1 de las cepas HPV-6 y HPV-11. El uso de cepas de VPH oncogénicas también es posible. Una vacuna puede incluir entre 20-60mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 40mg/ml) de L1 por cepa de VPH.

• Antígenos de ántrax. El ántrax es causado por *Bacillus anthracis*. Los antígenos *B.anthraxis* adecuados incluyen componentes A (factor letal (FL) y factor de edema (FE)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (AP). Los antígenos pueden desintoxicarse de manera opcional. Más detalles se pueden encontrar en las referencias [72 a 74].

• Antígenos *S. aureus*. Se conocen varios antígenos *S. aureus*. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de cepa de tipo 5 y/o 8) y proteínas (por ejemplo, IsdB, Hla, etc.) Los antígenos capsulares de sacárido están idealmente conjugados en una proteína portadora.

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

• Antígenos del cáncer. Se conocen varios antígenos específicos de tumores. La invención se puede usar con antígenos que provocan una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.

**[0133]** Una solución del antígeno normalmente se mezcla con la emulsión, por ejemplo, en una relación en volumen de 1:1. Esta mezcla puede realizarse por un fabricante de la vacuna, antes de su llenado, o puede realizarse en el momento del uso, por un profesional sanitario.

### **Las composiciones farmacéuticas**

**0134]** Las composiciones realizadas usando los métodos de la invención son farmacéuticamente aceptables. Se pueden incluir componentes adicionales a la emulsión y al antígeno opcional.

**[0135]** La composición puede incluir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se recomienda, sin embargo, que la vacuna deba estar sustancialmente libre de (es decir, con menos de 5mg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [75,76]. Las vacunas y componentes que no contienen mercurio son más recomendables.

**[0136]** El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más habitualmente entre 6,0 y 8,0 p.ej. entre 6,5 y 7,5. Un proceso de la invención puede por tanto incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna antes de su envasado.

**[0137]** La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo, con un contenido de <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, <0,1 UE por dosis. La composición está de manera preferente libre de gluten.



[0138] La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunidades – gubernamentales (es decir, un "multidosis" kit). La inclusión de un conservante se prefiere en las disposiciones multidosis.

5 [0139] Las vacunas se administran habitualmente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque una dosis media (es decir, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños.

***El uso médico de la vacuna***

10 [0140] La invención proporciona kits y composiciones preparadas usando los métodos de la invención. Las composiciones preparadas de acuerdo con los métodos de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y para uso en el aumento de una respuesta inmune en un paciente, que incluye la etapa de administración de dicha composición al paciente.

15 [0141] La invención también proporciona estos kits y composiciones para uso como medicamentos.

[0142] La invención también proporciona 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.

20 [0143] La respuesta inmune planteada por estos métodos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectores.

25 [0144] Las composiciones se pueden administrar de diversas maneras. La vía de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [77-79], oral [80], intradérmica [81,82], transcutánea, transdérmica [83], etc.

30 [0145] Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. El paciente puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o por lo menos 55 años. El paciente puede ser mayores (por ejemplo, > 50 años de edad, preferiblemente > 65 años), jóvenes (por ejemplo, <5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicios armados y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, y personas que viajan al extranjero. Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, y puede ser utilizada de manera más general en la población.

35 [0146] Las vacunas de la invención pueden administrarse a los pacientes de manera sustancial al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) otras vacunas.

***Procesos intermedios***

40 [0147] La invención también proporciona un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye la 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.

45 [0148] La invención también proporciona un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye la filtración de una segunda emulsión, es decir, una emulsión microfluidificada. La emulsión que se microfluidiza tiene las características descritas anteriormente.

50 [0149] La invención también proporciona un método para la fabricación de una vacuna, que incluye la combinación de una emulsión con un antígeno, en el que la emulsión tiene las características descritas anteriormente.

***Las realizaciones específicas***

55 [0150] Las realizaciones específicas de la presente invención incluyen:

- Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye escualeno, comprendiendo las etapas de (i) formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota de aceite; (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrofílica.

- Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye las etapas de (i) formación de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite de 5000 nm o menos, (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrofílica.

- 5 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye las etapas de (i) formación de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite, (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrofílica de polietersulfona.
- 10 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluya escualeno, comprendiendo el método la etapa de (i) formación de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite usando un homogeneizador, en el que la primera emulsión se forma mediante la circulación varias veces de los componentes de la primera emulsión a través de un homogeneizador.
- 15 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que contenga escualeno, incluyendo el método la etapa de (b) microfluidización de una primera emulsión de aceite que tiene un primer tamaño medio de gota para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, en el que la segunda emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión por transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un recipiente de la primera emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización a un segundo recipiente de emulsión, y luego a través de un segundo dispositivo de microfluidización, en el que los dispositivos de microfluidización primero y segundo son el mismo.
- 20 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye: el paso de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización incluye una cámara de interacción que contiene varios canales de tipo Z y un módulo de procesamiento auxiliar que incluye al menos un canal; en el que el módulo de procesamiento auxiliar está situado aguas abajo de la cámara de interacción.
- 25 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye la etapa de paso de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización incluye una cámara de interacción y un módulo de procesamiento auxiliar que contiene varios canales.
- 30 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye la etapa de paso de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, en el que el dispositivo de microfluidización incluye 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 por lo menos el 85% del tiempo durante el cual se alimenta la emulsión en el microfluidizador.
- 35 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que incluye la etapa de paso de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, en el que el dispositivo de microfluidización incluye 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 por lo menos el 85% del tiempo durante el cual se alimenta la emulsión en el microfluidizador.
- 40 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye la etapa de formación de una emulsión que tiene un primer tamaño medio de gota 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 bares.
- 45 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende la etapa de paso de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, en el que la formación de la segunda emulsión se lleva a cabo bajo un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno, por ejemplo, a una presión de hasta 0,5 bares.
- 50 • Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que incluye las etapas de (i) formación de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite; (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite, (iii) la filtración de la segunda emulsión; (iv) la transferencia de la emulsión de aceite en agua a una bolsa estéril flexible.
- 55
- 60

#### **General**

- 65 [0151] El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "consistente en", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ejemplo, X + Y.

[0152] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

5 [0153] El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

[0154] A menos que se indique específicamente, un procedimiento que incluye una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Así, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

10 [0155] Cuando los materiales animales (sobre todo bovinos) se utilizan en el cultivo de células, obtenerse de fuentes que son libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y, en particular, libre de encefalopatía bovina espongiforme (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0156]

20 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 pueden ser utilizados en dicho homogeneizador.

La figura 3 muestra dos perfiles de presión para un modo de bomba intensificador simultáneo.

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

25 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". Se muestran la dirección y el orden de los movimientos de fluido. 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.

## 30 MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.

### *Ejemplo 1:*

35 [0157] Los componentes de la emulsión: escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y tampón de citrato de sodio se introdujeron en un homogeneizador en línea, de alta velocidad, rotor/estator (IKA de Super Dispax Reactor DRS 2000/5). Los volúmenes de partida de la emulsión de 280l y 250l se utilizaron y la velocidad del homogeneizador se fijó en  $5000 \pm 1000$  rpm. La temperatura de la emulsión durante la homogeneización se mantuvo por debajo de  $60^\circ\text{C}$ .

40 [0158] Se llevaron a cabo tres ejecuciones de prueba. En la primera prueba de funcionamiento, 280l de los componentes de la emulsión se sometieron a circulación de tipo I, entre el homogeneizador y un recipiente de la primera mezcla previa, durante 20 minutos, seguido por una única circulación de tipo II, la transferencia de los componentes de la primera emulsión desde un recipiente de acero inoxidable de la primera mezcla previa, a través del homogeneizador a un recipiente de acero inoxidable de la segunda mezcla previa, y luego de nuevo a través del homogeneizador.

45 En la segunda prueba, 280l de los componentes de la emulsión se sometieron a la circulación de tipo I, entre el homogeneizador y un recipiente de la primera mezcla previa de acero inoxidable, durante 5 minutos, seguido de 5 circulaciones de tipo II, transfiriendo los componentes de la primera emulsión de un recipiente de acero inoxidable de la primera mezcla previa, a través del homogeneizador a un recipiente de acero inoxidable de la segunda mezcla previa, y luego de nuevo a través del homogeneizador al recipiente de acero inoxidable de la primera mezcla previa.

50 En la tercera realización de la prueba, 250l de los componentes de la emulsión se sometieron a la circulación de tipo I, entre el homogeneizador y un recipiente de la primera mezcla previa de acero inoxidable, durante 20 minutos, seguido por una única circulación de tipo II, transfiriendo los componentes de la primera emulsión a un recipiente de acero inoxidable de la primera mezcla previa, a través del homogeneizador a un recipiente de acero inoxidable de la segunda mezcla previa, y luego de nuevo a través del homogeneizador al

55 recipiente de acero inoxidable de la primera mezcla previa.

[0159] La primera emulsión se homogeneizó hasta que tuvo un tamaño medio de gota de aceite de  $1200\text{ nm}$  o menos y un número de gotas de aceite con un tamaño  $> 1,2\text{ mm}$  de  $5 \times 10^9/\text{ml}$  o menos.

60 [0160] La primera emulsión fue entonces sometida a microfluidización para formar una segunda emulsión. La emulsión se pasó a través del dispositivo de microfluidización cinco veces. El dispositivo de microfluidización se accionó a entre aproximadamente 600 y 800 bares (es decir, entre aproximadamente 9000 y 12000 psi) y la emulsión se mantuvo a una temperatura de  $40 \pm 5^\circ\text{C}$  durante la microfluidización mediante el uso de un mecanismo de refrigeración.

65 [0161] La segunda emulsión se filtró estéril.

[0162] El tamaño medio de las gotas de aceite en las emulsiones filtradas en cada ejecución de prueba cumplió con la especificación para un adyuvante MF59.

5 [0163] Otros parámetros de las emulsiones durante las ejecuciones de prueba primera, segunda y tercera se pueden encontrar en la Tabla 1.

Tabla 1

10

Parámetro	Unidad	Primera ejecución	Segunda ejecución	Tercera ejecución
Número de gotas de aceite con un 1,2 mm en la segunda emulsión	/ml	43.7 x 10 <sup>6</sup>	56.4 x 10 <sup>6</sup>	45.1 x 10 <sup>6</sup>
Número de gotas de aceite con un > 1,2 mm después de la filtración	/ml	0.2 x 10 <sup>6</sup>	0.6 x 10 <sup>6</sup>	0.5 x 10 <sup>6</sup>

15 [0164] Los resultados de las tres pruebas de funcionamiento son excelentes. Sin embargo, los resultados de la Tabla 1 muestran que la prueba de ejecución 1 produjo la mayor reducción de porcentaje (99,5%) en el número de partículas con un 1,2 mm en la emulsión después de la filtración en comparación con el número presente en la segunda emulsión. Por lo tanto, el mejor modelo de circulación de homogeneización es alrededor de 20 minutos de circulación de tipo I seguidos por una circulación de tipo II.

**Ejemplo 2:**

25 [0165] En experimentos posteriores, una primera emulsión se formó por circulación de tipo I (Figura 5) o tipo II (Figura 6). En cinco ejecuciones separadas el número medio de partículas grandes por ml fue el siguiente:

30

	Medio	Coefficiente de variación
Tipo I	1.70 x 10 <sup>9</sup>	0.23
Tipo II	1.04 x 10 <sup>9</sup>	0.13

35 [0166] Por lo tanto la circulación de tipo II resulta en un menor número de gotas grandes y menos variación de lote a lote.

**REFERENCIAS**

40 [0167]

[1] WO90/14837.  
 [2] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.  
 [3] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.  
 45 [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.  
 50 [7] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines 6(5):699-710.  
 [8] EP-B-2029170  
 [8a] EP 1 574 210 A2  
 [9] Baudner et al. (2009) Pharm Res. 26(6):1477-85.  
 [10] Dupuis et al. (1999) Vaccine 18:434-9.  
 55 [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. Scharl), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.  
 [14] Jafari et al (2008) Food Hydrocolloids 22:1191-1202  
 60 [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.  
 65 [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  
 5 [25] US-4,673,504  
 [26] EP-A-0221046.  
 [27] US-4,943,374  
 [28] US-6,071,406  
 [29] US-4,705,753  
 10 [30] US-5,178,765  
 [31] US-6,495,043  
 [32] US-6,039,872  
 [33] US-5,277,812  
 [34] US-5,531,893.  
 [35] US-4,964,990  
 15 [36] Wavhal & Fisher (2002) *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 40:2473-88.  
 [37] WO2006/044463.  
 [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.  
 20 [41] WO2007/080308.  
 [42] WO2007/052155.  
 [43] WO2005/089837.  
 [44] US 6,692,468.  
 [45] WO00/07647.  
 25 [46] WO99/17820.  
 [47] US 5,971,953.  
 [48] US 4,060,082.  
 [49] EP-A-0520618.  
 [50] W098/01174.  
 30 [51] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.  
 [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.  
 35 [56] WO97/37000.  
 [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.  
 40 [61] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.  
 [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.  
 45 [66] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 [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.  
 50 [71] Harper et al. (2004) *Lancet* 364(9447):1757-65.  
 [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.  
 55 [76] WO02/097072.  
 [77] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.  
 [78] Zurbruggen 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.  
 60 [81] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.  
 [82] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.  
 [83] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua adyuvante de vacuna con escualeno, incluyendo el método la etapa de: (i) formación de una primera emulsión con un primer tamaño medio de gota de aceite usando un homogeneizador, en el que la primera emulsión se forma mediante la transferencia de sus componentes a partir de un primer recipiente a un segundo recipiente a través de un homogeneizador, y devolviéndolos entonces desde el segundo recipiente al primer recipiente a través del mismo homogeneizador, en el que sustancialmente todos los componentes de la emulsión desde el primer recipiente se pasan a través el homogeneizador al segundo recipiente, y luego sustancialmente todos los componentes de la emulsión del segundo recipiente se pasan a través del homogeneizador de nuevo al primer recipiente.
- 10 2. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (i) incluye dos o más ciclos de transferencia de componentes de la primera emulsión desde el primer recipiente al segundo recipiente, y viceversa.
- 15 3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el homogeneizador es un homogeneizador mecánico y los componentes de la primera emulsión se combinan en un recipiente de mezclado antes de introducirse en el homogeneizador.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que el homogeneizador es un homogeneizador rotor-estator.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que los recipientes primero y segundo se mantienen bajo un gas inerte.
- 25 6. El método de cualquier reivindicación precedente, que incluye: (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gota de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que el homogeneizador es un homogeneizador rotor-estator y en el que la microfluidización se produce en una cámara de interacción que no tiene partes móviles.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el homogeneizador proporciona una velocidad de cizallamiento de hasta  $1 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ , y en el que la microfluidización se produce en una cámara de interacción que proporciona una velocidad de cizallamiento  $> 2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ .
- 35 9. El método de cualquier reivindicación precedente, que incluya: (iii) la filtración de la segunda emulsión.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que durante la etapa (ii), la segunda emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión varias veces a través de un dispositivo de microfluidización.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en el que la segunda emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización tres veces.
- 45 12. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la circulación de los componentes de la emulsión segunda incluye la transferencia de los componentes de la segunda emulsión entre un recipiente de la primera emulsión y un dispositivo de microfluidización.
- 50 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la circulación de los componentes de la segunda emulsión incluye la transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un recipiente de la primera emulsión, a través de un dispositivo de microfluidización a un recipiente de la segunda emulsión, y luego de nuevo a través del dispositivo de microfluidización.
- 55 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que los recipientes de emulsión primera y segunda se mantienen bajo un gas inerte.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer tamaño medio de gota de aceite es de 5000 nm o menor.
- 60 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de  $> 1,2 \text{ mm}$  en la primera emulsión es  $5 \times 10^{11}/\text{ml}$  o menos.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, en el que el segundo tamaño medio de gota de aceite es de 500 nm o menos.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de  $> 1,2$  mm en la segunda emulsión es  $5 \times 10^{10}$ /ml o menos.
19. Un método para preparar una composición de vacuna, que incluye la preparación de una emulsión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y la combinación de la emulsión con un antígeno.
- 5
20. Un método para preparar un kit de vacuna que incluya la preparación de una emulsión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y envasar la emulsión en un kit como componente del kit junto con un componente antigénico.
- 10
21. El método de la reivindicación 20, en el que los componentes del kit están en viales separados, por ejemplo, en el que los viales son de vidrio de borosilicato.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el adyuvante es un adyuvante a granel y el método comprende extraer dosis unitarias del adyuvante a granel para el envasado como los componentes del kit.
- 15
23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, donde el antígeno es un antígeno del virus de la gripe, por ejemplo, en el que la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna que incluye aproximadamente 15 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 3.8mg, aproximadamente 1.9mg, o aproximadamente 1,5 mg de hemaglutinina por cepa de virus de la gripe.
- 20

Figura 1

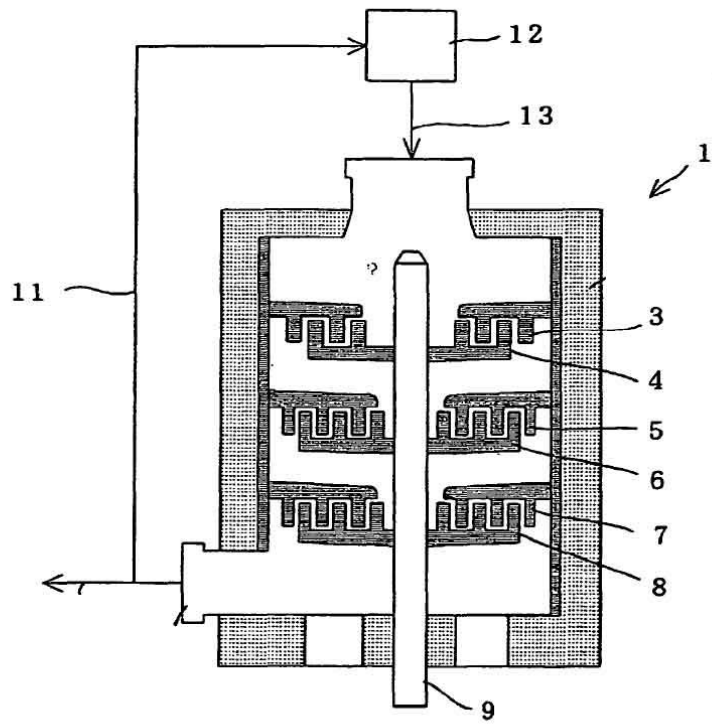


Figura 2

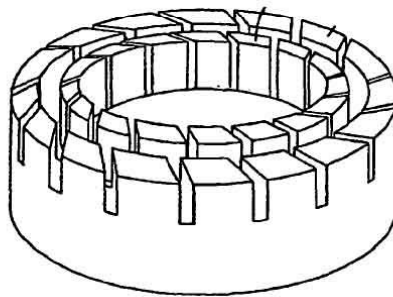




Figura 3

Figura 3A

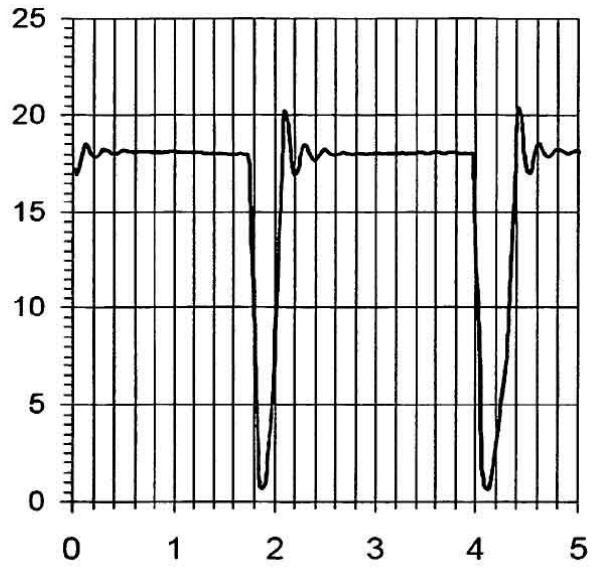


Figura 3B

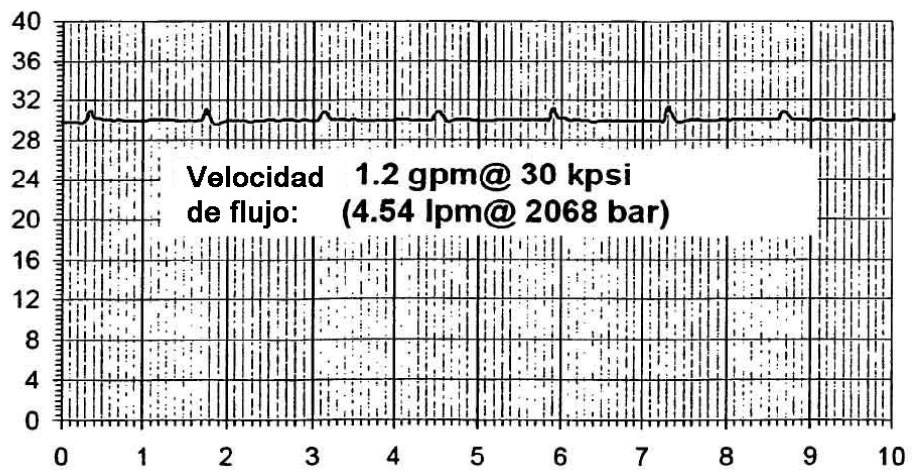


Figura 4

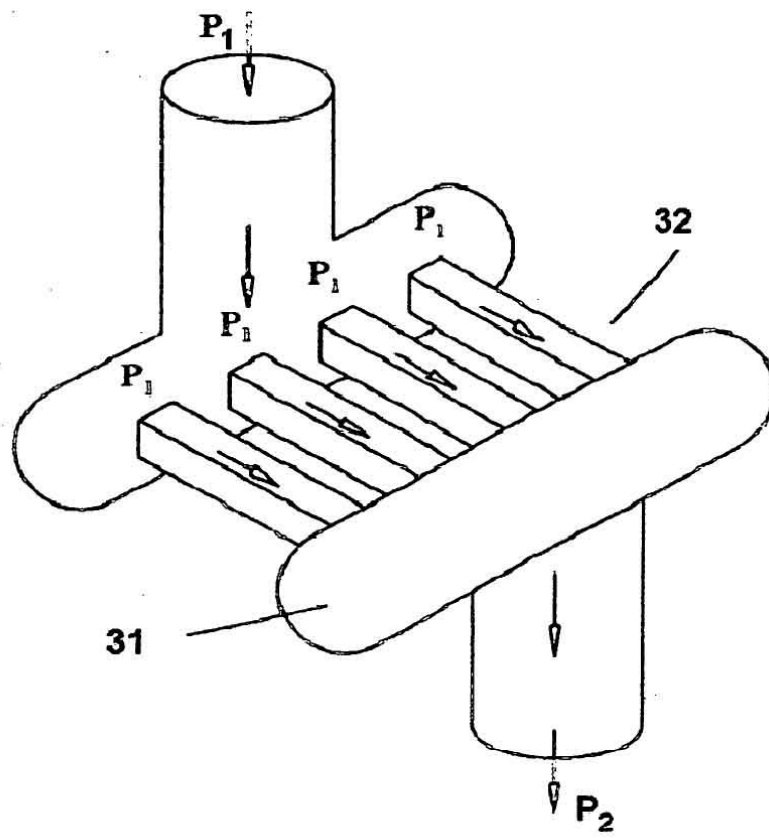


Figura 5

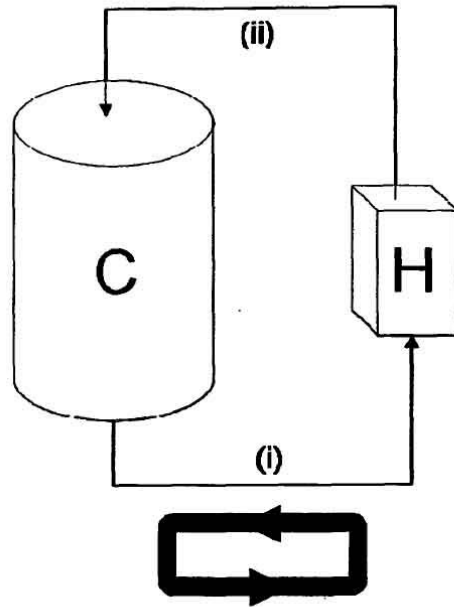


Figura 6

