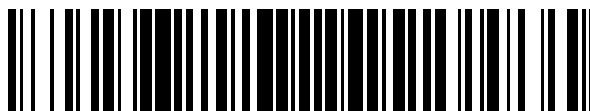


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 230**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**B01F 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10812802 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2506833**

54 Título: **Organización cámaras de interacción y de presión de retorno para la microfluidización**

30 Prioridad:

**03.12.2009 US 283548 P**

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

**16.07.2014**

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 2 477 230 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****Organización cámaras de interacción y de presión de retorno para la microfluidización****5 CAMPO TECNICO**

La invención pertenece al campo de la fabricación de adyuvantes de emulsiones de aceite-en-agua para vacunas por microfluidización.

**10 ANTECEDENTES DE LA TECNICA**

El adyuvante de vacunas conocido como 'MF59' [1-3] es una emulsión de aceite-en-agua submicrónica 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 alrededor del 5% de escualeno, alrededor del 0,5% de Tween 80 y alrededor de 0,5% de Span 85. El adyuvante y su producción se describen con más detalle en el Capítulo 10 de la referencia 4, capítulo 12 de la referencia 5 y capítulo 19 de la referencia 6.

Como se describe en la referencia 7, el MF59 se fabrica a escala comercial dispersando Span 85 en la fase de escualeno y Tween 80 en la fase acuosa, seguido por mezclado a alta velocidad para formar una emulsión gruesa. Esta emulsión gruesa se pasa después repetidamente a través de un microfluidizador para producir una emulsión que tiene un tamaño de gotita de aceite uniforme. Como se describe en la referencia 6, la emulsión microfluidizada es después filtrada a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier gotita de aceite grande, y el tamaño de gotita medio de la emulsión resultante permanece inalterado durante al menos 3 años a 4<sup>o</sup> C. El contenido de escualeno de la emulsión final se puede medir como se describe en la referencia 8.

Las emulsiones de aceite-en-agua contienen gotitas de aceite. Las gotitas de aceite más grandes contenidas en estas emulsiones pueden actuar como sitios de nucleación para la agregación, llevando a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento. Un método para preparar nanoemulsiones se describe en la referencia 84.

Es un objeto de la invención el proporcionar métodos adicionales y mejorados para la producción de emulsiones de aceite-en-agua microfluidizadas (como el MF59), en particular métodos que son adecuados para el uso a una escala comercial y que proporcionan microfluidización mejorada para proporcionar emulsiones con menos partículas grandes.

**DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La invención proporciona un aparato de microfluidización como se define en la reivindicación 1.

Se puede introducir una primera emulsión en la cámara de interacción a una primera presión y una segunda emulsión puede salir del módulo de procesamiento auxiliar a una segunda presión que es más baja que la primera presión. En una realización, entre el 80 y el 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de un 5 a un 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través del módulo de procesamiento auxiliar.

La presente invención también proporciona un método para la fabricación de una emulsión de aceite-en-agua que comprende el paso de pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño de gotita de aceite medio a través de un aparato de microfluidización como se define en la presente.

La primera emulsión puede o (i) ser introducida en la cámara de interacción a una primera presión y la segunda emulsión puede salir del módulo de procesamiento auxiliar a una segunda presión que es más baja que la primera presión; o la primera emulsión puede (ii) ser introducida en el módulo de procesamiento auxiliar a una primera presión y la segunda emulsión puede salir de la cámara de interacción a una segunda presión que es más baja que la primera presión. En una realización, entre el 80 y el 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de un 5 a un 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través del módulo de procesamiento auxiliar.

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

Después de la formación, la primera emulsión puede ser entonces sometida a al menos un paso de microfluidización para formar la segunda emulsión que tiene un tamaño de gotita de aceite medio reducido. Como se

describe a continuación, el tamaño de gotita de aceite medio de la segunda emulsión es de 500 nm o menos. El número de gotitas de aceite en la segunda emulsión que tiene un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  puede ser de  $5 \times 10^{10}$  /ml o menos, como se describe a continuación. Para conseguir estas características puede ser necesario pasar los componentes de la emulsión a través del dispositivo de microfluidización una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 veces.

La segunda emulsión puede entonces ser filtrada, por ejemplo a través de una membrana de polietersulfona hidrófila, para dar una emulsión de aceite-en-agua que puede ser adecuada para su uso como un adyuvante de vacunas. El tamaño de gotita de aceite medio 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 alrededor de 155 nm. El número de gotitas de aceite que tienen un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$  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.

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

En general, el método se realiza a entre  $20-60^\circ \text{C}$ , e idealmente a  $40 \pm 5^\circ \text{C}$ . Aunque los componentes de la primera y segunda emulsión pueden ser relativamente estables incluso a temperaturas más altas, puede todavía ocurrir la descomposición térmica de algunos componentes y por lo tanto se prefieren temperaturas más bajas.

### **Componentes de la emulsión**

El tamaño de gotita de aceite medio (es decir el número del diámetro medio de las gotitas 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 un máquina de medición de dispersión de la luz dinámica es la Nicomp 380 Submicron Particle Size Analyzer (de Particle Sizing Systems).

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

Los métodos de la invención se usan para la fabricación de emulsiones de aceite-en-agua. Estas emulsiones incluyen tres ingredientes centrales: un aceite; un componente acuoso; y un surfactante.

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

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

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

En lugar de (o además de) usar escualeno una emulsión puede comprender aceite(s) incluyendo aquellos de, por ejemplo una fuente animal (como un pez) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco, y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo obtenido de haba de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereal como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanediol, aunque no son de origen natural en aceites de semillas, se pueden preparar por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales de partida apropiados de aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de leche mamífera son metabolizables y por lo tanto se pueden usar. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser recuperados fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de hígado de tiburón y aceite de ballena como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente. Un número de aceites de cadena ramificada son sintetizados bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y son generalmente referidos como terpenoides. También se puede usar el escualano, el análogo saturado del escualeno. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden ser obtenidos por métodos conocidos en la técnica.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\xi$ , pero se prefieren los  $\alpha$ -tocoferoles. Se pueden usar tanto el D- $\alpha$ -tocoferol como el DL- $\alpha$ -tocoferol. Un  $\alpha$ -tocoferol preferido es el DL- $\alpha$ -tocoferol. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo sales y/o isómeros diferentes. Las sales incluyen sales orgánicas como succinato, acetato, nicotinato, etc. Si se va a usar una sal de este tocoferol, la sal preferida es el succinato. Se puede usar una combinación de aceite que incluye escualeno y un tocoferol (por ejemplo DL-  $\alpha$ -tocoferol).

El componente acuoso puede ser agua corriente (por ejemplo w.f.i.) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo sales de citrato o fosfato, como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris, un tampón de borato; un tampón de succinato, un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Los tampones estarán incluidos típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

El surfactante es preferiblemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Los surfactantes pueden ser clasificados por su 'HLB' (equilibrio hidrófilo/lipófilo), cuando un HLB está en el intervalo de 1-10 generalmente significa que el surfactante es más soluble en aceite que en agua, y un HLB den el intervalo de 10-20 es más soluble en agua que en aceite. Las emulsiones preferiblemente comprenden al menos un surfactante que tiene un HLB de al menos 10, por ejemplo al menos 15, o preferiblemente al menos 16.

La invención puede ser usada con surfactantes incluyendo, pero no limitado a: surfactantes de ésteres de polioxietileno sorbitán (referidos comúnmente como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX™, como copolímeros de bloque EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetidos, con el octoxinol-9 (Triton X-100, o t- octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos como la fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como surfactantes Brij) como el éter de trietilenglicol monolauril (Brij 30); éter de polioxietileno-9-lauril; y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPANs, como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los surfactantes preferidos para incluir en la emulsión son el polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (triolato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Se pueden incluir mezclas de surfactantes en la emulsión, por ejemplo mezclas de Tween80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton-X100. También es adecuada una combinación de éster de polioxietileno sorbitán como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol como t- octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un surfactante con un valor HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo Tween 80, con un HLB de 15,0) y un surfactante con un valor HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo Span 85, con un HLB de 1,8).

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

Antes del paso de microfluidización, los componentes de la emulsión pueden ser mezclados para formar una primera emulsión.

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

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

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

El tamaño de gotitas de aceite medio de la primera emulsión se puede conseguir mezclando los componentes de la primera emulsión en un homogeneizador. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, pueden ser combinados en un recipiente de mezclado (12) y después los componentes combinados pueden ser introducidos (13) en un homogeneizador mecánico, como un homogeneizador rotor-estator (1).

Los homogeneizadores pueden operar de una manera vertical y/o horizontal. Por conveniencia en un entorno comercial, se prefieren los homogeneizadores en línea.

Los componentes se introducen en un homogeneizador rotor-estator y alcanzan un rotor de rotación rápida que contiene ranuras o agujeros. Los componentes son lanzados hacia afuera por centrifugación de una forma

similar a una bomba y pasan a través de las ranuras/agujeros. En algunas realizaciones el homogeneizador incluye combinaciones múltiples de rotores y estatores, por ejemplo una disposición concéntrica de anillos de dientes en peine, como se muestra por las características (3) y (4); (5) y (6); y (7) y (8) en la Figura 1 y la Figura 2. Los rotores en homogeneizadores a gran escala útiles pueden tener anillos de dientes en peine en el extremo de un impulsor multi-cuchilla orientado horizontalmente (por ejemplo característica (9) en la Figura 1) alineados en tolerancia estrecha con los dientes concordantes en un revestimiento estático. La primera emulsión se forma por una combinación de turbulencia, cavitación y cizallamiento mecánico que tiene lugar dentro del espacio entre el rotor y el estator. Los componentes son introducidos útilmente en una dirección paralela al eje del rotor.

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

Para la fabricación a escala comercial el homogeneizador debería tener idealmente un caudal de al menos 300 L/h por ejemplo,  $\geq 400 \text{ L/h}$ ,  $\geq 500 \text{ L/h}$ ,  $\geq 600 \text{ L/h}$ ,  $\geq 700 \text{ L/h}$ ,  $\geq 800 \text{ L/h}$ ,  $\geq 900 \text{ L/h}$ ,  $\geq 1000 \text{ L/h}$ ,  $\geq 2000 \text{ L/h}$ ,  $\geq 5000 \text{ L/h}$ , o incluso  $\geq 10.000 \text{ L/h}$ . Homogeneizadores de alta capacidad adecuados están disponibles comercialmente.

Un homogeneizador preferido proporciona una tasa 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 alrededor de  $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ .

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

En algunas realizaciones los componentes de la primera emulsión pueden ser homogeneizados múltiples 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 contenedores y homogeneizadores los componentes de la emulsión pueden ser en lugar de eso circulados (por ejemplo, como se muestra por la característica (11) en la Figura 1). En particular, la primera emulsión puede ser formada circulando los componentes de la primera emulsión a través de un homogeneizador una pluralidad de veces (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 etc. veces). Sin embargo, demasiados ciclos pueden no ser deseables ya que pueden producir re-coalescencia como se describe en la referencia 14. Así el tamaño de las gotitas de aceite puede ser monitorizado si la circulación del homogeneizador se usa para comprobar que se alcanza un tamaño de gotita deseado y/o que no está teniendo lugar la re-coalescencia.

La circulación a través del homogeneizador es ventajosa ya que puede reducir el tamaño medio de las gotitas de aceite en la primera emulsión. La circulación también es ventajosa ya que puede reducir el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $> 1,2 \mu\text{m}$  en la primera emulsión. Estas reducciones en el tamaño de gotita medio y número de gotitas  $> 1,2 \mu\text{m}$  en la primera emulsión pueden proporcionar ventajas en procesos descendentes. En particular, la circulación de los componentes de la primera emulsión a través del homogeneizador puede llevar a un proceso de microfluidización mejorado que puede resultar entonces en un número reducido de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $> 1,2 \mu\text{m}$  en la segunda emulsión, es decir, después de la microfluidización. Esta mejora en los parámetros de la segunda emulsión puede proporcionar rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede llevar 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.

En la presente se hace referencia a dos tipos particulares de circulación como "tipo I" y "tipo II". La circulación tipo I se ilustra en la Figura 5, mientras que la circulación del tipo II se ilustra en la Figura 6.

La circulación de los componentes de la primera emulsión puede comprender una circulación tipo I de transferencia de los componentes de la primera emulsión entre un contenedor de la primera premezcla y un homogeneizador. El contenedor de la primera premezcla puede ser de 50 a 500 L de tamaño, por ejemplo de 100 a 400 L, 100 a 300 L, 200 a 300 L, 250 L o 280 L. El contenedor de la primera premezcla puede estar fabricado de acero inoxidable. La circulación de tipo I puede ser continuada durante 10 a 60 minutos, por ejemplo de 10 a 40 minutos o 20 minutos.

La circulación de los componentes de la primera emulsión pueden comprender una circulación tipo II de transferencia de los componentes de la primera emulsión de un contenedor de la primera premezcla, a través de un primer homogeneizador a un contenedor de la segunda premezcla (teniendo opcionalmente las mismas propiedades que el contenedor de la primera premezcla), y después a través de un segundo homogeneizador. El segundo homogeneizador será habitualmente el mismo que el primer homogeneizador, pero en algunas disposiciones el primer y el segundo homogeneizador son diferentes. Después del paso de los componentes de la primera emulsión a través del segundo homogeneizador, los componentes de la primera emulsión pueden ser transferidos de vuelta al contenedor de la primera premezcla, por ejemplo si el proceso de circulación de tipo II se va a repetir. Así los

componentes de la emulsión pueden viajar en una figura de ocho vías entre los contenedores de la primera y segunda premezcla por un único homogeneizador (ver Figura 6). La circulación de tipo II puede ser llevada a cabo una única vez o una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, etc. veces.

5 La circulación de tipo II es ventajosa, en comparación con la circulación de tipo I, ya que puede ayudar a asegurar que todos los componentes de la primera emulsión pasen a través del homogeneizador. El vaciado del contenedor de la primera premezcla significa que los contenidos de la emulsión completos han pasado a través del homogeneizador, al contenedor de la segunda premezcla. De manera similar, los contenidos del contenedor de la segunda premezcla pueden ser vaciados, asegurando de nuevo que pasan todos a través del homogeneizador. Así  
10 la disposición de tipo II puede asegurar convenientemente que todos los componentes de la emulsión sean homogeneizados al menos dos veces, lo que puede reducir tanto el tamaño medio de las gotitas de aceite como el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  en la primera emulsión. Una circulación de tipo II ideal implica por lo tanto vaciar el contenedor de la primera premezcla y pasar sustancialmente todos sus componentes a través del homogeneizador al contenedor de la segunda premezcla, seguido por el vaciado del contenedor de la segunda premezcla y re-pasar sustancialmente todos su contenido a través del homogeneizador de vuelta al contenedor de la primera premezcla. Por lo tanto todas las partículas pasan a través del homogeneizador al menos dos veces, mientras que esto es difícil de conseguir con la circulación tipo I.

20 En algunas realizaciones se usa una combinación de circulaciones tipo I y tipo II, y esta combinación puede proporcionar una primera emulsión con buenas características. En particular, esta combinación puede reducir en gran medida el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  en la primera emulsión. Esta combinación puede comprender cualquier orden de circulación tipo I y tipo II, por ejemplo tipo I seguido por el tipo II, tipo II seguido por tipo I, tipo I seguido por tipo II seguido por tipo I de nuevo, etc. En una realización, la combinación comprende 20 minutos de circulación tipo I seguido por una única circulación tipo II, es decir, transferir los  
25 componentes de la primera emulsión circulados de un contenedor de la primera premezcla, a través de un primer homogeneizador a un contenedor de la segunda premezcla, y después a través de un segundo homogeneizador una vez.

30 Los contenedores de la primera y segunda premezcla pueden ser mantenidos bajo un gas inerte, por ejemplo nitrógeno, por ejemplo a hasta 0,5 bar. Esto puede evitar que los componentes de la emulsión se oxiden, lo 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.

35 Como se ha mencionado anteriormente, la entrada inicial para el homogeneizador puede ser una mezcla no homogeneizada de los componentes de la primera emulsión. Esta mezcla puede ser preparada mezclando los componentes de la primera emulsión individuales individualmente pero, en algunas realizaciones, se pueden combinar múltiples componentes antes de este mezclado. Por ejemplo, si la emulsión incluye un surfactante con un HLB por debajo de 10 entonces este surfactante puede ser combinado con un aceite antes del mezclado. De manera similar, si la emulsión incluye un surfactante con un HLB por encima de 10 entonces este surfactante puede ser  
40 combinado con un componente acuoso antes del mezclado. Las sales tampón pueden ser combinadas con un componente acuoso antes del mezclado, o pueden ser añadidas separadamente.

45 Los métodos de la invención pueden ser usados a gran escala. Así un método puede implicar preparar una primera emulsión cuyo volumen sea más grande de 1 litro, por ejemplo,  $\geq 5$  litros,  $\geq 10$  litros,  $\geq 20$  litros,  $\geq 50$  litros,  $\geq 100$  litros,  $\geq 250$  litros, etc.

Después de su formación, la primera emulsión puede ser microfluidizada, o puede ser almacenada para esperar la microfluidización.

50 En algunas realizaciones, en particular aquellas donde se usan múltiples ciclos de los pasos (i) y (ii), la entrada para el homogeneizador será la salida de un microfluidizador, de tal forma que la primera emulsión es microfluidizada y después sometida de nuevo a homogeneización.

### **Microfluidización**

55 Después de su formación la primera emulsión es microfluidizada para reducir su tamaño de gotita de aceite medio y/o reducir el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$ .

60 Los instrumentos de microfluidización reducen el tamaño de gotita de aceite medio impulsando corrientes de componentes de entrada a través de canales fijados geoméricamente a alta presión y alta velocidad. La presión en 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 al menos el 85% del tiempo durante el que los componentes son introducidos en el microfluidizador, por ejemplo al menos el 87%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o el 100% del tiempo durante el que la emulsión es introducida en el microfluidizador.

65

En una realización, la primera presión es  $1300 \text{ bar} \pm 15\%$  ( $18 \text{ kPSI} \pm 15\%$ ), es decir entre 1000 bar y 1500 bar (entre 15 kPSI y 21 kPSI) para el 85% del tiempo durante el que la emulsión es introducida 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 el 85% del tiempo, mientras que en la Figura 3B la presión permanece continuamente sustancialmente constante.

El aparato de microfluidización comprende al menos una bomba intensificadora (preferiblemente dos bombas, que pueden ser sincrónicas), una cámara de interacción y una cámara de presión de retorno. La bomba intensificadora, que idealmente es accionada electrohidráulicamente, proporciona presión alta (es decir, la primera presión) para forzar una emulsión en y a través de la cámara de interacción. La naturaleza sincrónica de las bombas intensificadoras puede ser usada para proporcionar una presión sustancialmente constante de la emulsión comentada anteriormente, lo que significa que las gotitas de la emulsión están todas expuestas a sustancialmente el mismo nivel de fuerzas de cizallamiento durante la microfluidización.

Una ventaja del uso de una presión sustancialmente constante es que puede reducir los fallos por fatiga en el dispositivo de microfluidización, lo que puede llevar a una vida más larga del dispositivo. Una ventaja adicional del uso de una presión sustancialmente constante es que se pueden mejorar los parámetros de la segunda emulsión. En particular, se puede reducir el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  presentes en la segunda emulsión. Además, el tamaño de gotita de aceite medio de la segunda emulsión puede ser reducido cuando se usa una presión sustancialmente constante. La reducción en el tamaño de gotita de aceite medio y en el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  en la segunda emulsión puede proporcionar rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede llevar a menos pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión es MF59.

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

La geometría fija de la pluralidad de canales en la cámara de interacción es geometría tipo "Z".

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

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

En una realización, la corriente de la emulsión pasa alrededor de dos esquinas con ángulo sustancialmente recto. En el punto cuando la corriente de la emulsión de entrada pasa alrededor de la primera esquina de ángulo sustancialmente recto, se divide en cinco sub-corrientes. En el punto cuando las corrientes pasan alrededor de la

segunda esquina de ángulo sustancialmente recto, son recombinadas en una única corriente de la emulsión de salida.

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

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

15 Un aparato de microfluidización preferido funciona a un caudal de hasta 20 L/min, por ejemplo hasta 14 L/min, hasta 7 L/min, hasta 3,5 L/min, etc.

20 Un aparato de microfluidización preferido tiene una cámara de interacción que proporciona una tasa de cizallamiento superior a  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  por ejemplo  $\geq 2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $\geq 5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $\geq 10^7 \text{ s}^{-1}$ , etc.

25 Un aparato de microfluidización puede incluir múltiples cámaras de interacción que se usan en paralelo, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más, pero es más útil incluir una única cámara de interacción.

30 El dispositivo de microfluidización comprende un módulo de procesamiento auxiliar (APM; también conocido en microfluidizadores como una cámara de presión de retorno - estos términos son usados intercambiamente en la presente). El APM contribuye a la reducción en el tamaño medio de las gotitas de aceite en la emulsión que se está pasando a través del dispositivo de microfluidización, aunque la mayoría de la reducción tiene lugar en la cámara de interacción. Como se ha mencionado anteriormente, los componentes de la emulsión son introducidos en la cámara de interacción por bombas intensificadoras bajo una primera presión. Los componentes de la emulsión generalmente salen del APM a una segunda presión que es inferior que la primera presión (por ejemplo, presión atmosférica). En general entre el 80 y el 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presión cae a través de la cámara de interacción (por ejemplo de  $P_1$  a  $P_2$  en la Figura 4) y del 5 al 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presión cae 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 caída a través de la cámara de interacción y la presión caída a través del módulo de procesamiento auxiliar no representan el total de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presión, 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.

40 El APM habitualmente no incluye partes móviles. Puede incluir superficies del canal de cerámica (por ejemplo alúmina) o diamante (por ejemplo diamante policristalino). Otras superficies pueden estar hechas de acero inoxidable.

45 El APM está posicionado hacia abajo de la cámara de interacción y puede estar posicionado secuencial a la cámara de interacción. En el estado de la técnica, los APMs están generalmente posicionados hacia abajo de las cámaras de interacción comprendiendo canales de tipo Y para eliminar la cavitación y aumentar de este modo el caudal en la cámara de tipo Y hasta un 30%. Además en el estado de la técnica los APMs están generalmente posicionados hacia arriba de las cámaras de interacción que comprenden canales de tipo Z para reducir el tamaño de los aglomerados grandes. En el último caso, el APM sólo disminuye el caudal en las cámaras de tipo Z hasta un 3%. Sin embargo, se ha descubierto que posicionar el APM hacia abajo de una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales tipo Z es ventajoso en la presente invención ya que puede llevar a una reducción mayor en el tamaño de gotitas de aceite medio y una reducción mayor en el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$  presentes en la segunda emulsión. Como se ha mencionado anteriormente, la reducción en el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. Un rendimiento de filtración mejorado puede llevar a menores 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 hacia abajo es que puede llevar a una disminución de la presión más lenta después de la cámara de interacción. La disminución de la presión más lenta puede llevar a un aumento en la estabilidad del producto ya que hay menos gas encerrado en la emulsión.

60 El APM contiene una pluralidad, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc., de fijos por los que pasa la emulsión. El canal o canales del APM pueden ser lineales o no lineales. Los canales no lineales adecuados son de geometría tipo "Z" o geometría tipo "Y", que son los mismos que los descritos anteriormente para la cámara de

65



interacción. En una realización, el canal, o canales, del APM son de geometría tipo Z. Una pluralidad de canales de tipo Z divide la emulsión en corrientes a medida que entre en el APM.

5 Al contrario que las recomendaciones del fabricante, el uso de un APM que comprende una pluralidad de canales de geometría fija es ventajosa en comparación con un APM de canal de geometría fija ya que puede llevar una reducción mayor del número de gotitas de aceite que tienen un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$  presentes en la segunda emulsión. Como se ha mencionado anteriormente, la reducción en el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. Un rendimiento de filtración mejorado puede llevar a menores pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo pérdidas de  
10 escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite-en-agua es MF59.

15 Un aparato de microfluidización genera calor durante el funcionamiento, lo que puede elevar una temperatura de la emulsión por  $15\text{-}20^\circ \text{C}$  en relación a la primera emulsión. Ventajosamente, por lo tanto, la emulsión microfluidizada se enfría tan pronto como sea posible. La temperatura de la segunda emulsión puede ser mantenida por debajo de  $60^\circ \text{C}$ , por ejemplo por debajo de  $45^\circ \text{C}$ . Por lo tanto una salida de la cámara de interacción y/o una salida del APM pueden ser incorporadas en un mecanismo de refrigeración, como un intercambiador de calor o serpentín de refrigeración. La distancia entre la salida y el mecanismo de refrigeración debe ser mantenida lo más corta posible para acortar el tiempo total reduciendo retrasos en la refrigeración. En una realización, la distancia entre la salida del microfluidizador y el mecanismo de refrigeración es de entre 20-30 cm. Un mecanismo de  
20 refrigeración es particularmente útil cuando una emulsión es sometida a múltiples pasos de microfluidización, para evitar el sobrecalentamiento de la emulsión.

25 El resultado de la microfluidización es una emulsión de aceite-en-agua, la segunda emulsión, en la que el tamaño medio de las gotitas de aceite es de 500 nm o menos. Este tamaño medio es particularmente útil ya que facilita la esterilización por filtración de la emulsión. Las emulsiones en las que al menos el 80% del número de gotitas 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 gotitas de aceite en la segunda emulsión que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  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  $2 \times 10^9$  /ml o menos.  
30

La entrada inicial para la microfluidización puede ser la primera emulsión. En algunas realizaciones, sin embargo, la emulsión microfluidizada es sometida a microfluidización de nuevo, de tal forma que tienen lugar múltiples rondas de microfluidización. En particular, la segunda emulsión puede ser formada circulando los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización una pluralidad de veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc. veces. La segunda emulsión puede ser formada circulando los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización de 4 a 7 veces.  
35

La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede comprender una circulación tipo I de transferencia de los componentes de la segunda emulsión entre un contenedor de la primera emulsión (teniendo opcionalmente las mismas propiedades que el contenedor de la primera premezcla) y el dispositivo de microfluidización.  
40

La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede comprender una circulación tipo II de transferencia de los componentes de la segunda emulsión de un contenedor de la primera emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización a un contenedor de la segunda emulsión (teniendo opcionalmente las mismas propiedades que el contenedor de la primera premezcla), y después a través de un segundo dispositivo de microfluidización.  
45

El segundo dispositivo de microfluidización puede ser el mismo que el primer dispositivo de microfluidización. Alternativamente, el segundo dispositivo de microfluidización puede ser diferente al primer dispositivo de microfluidización.  
50

El contenedor de la primera emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la primera premezcla. Alternativamente, el contenedor de la primera emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la segunda premezcla.  
55

El contenedor de la segunda emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la primera premezcla. Alternativamente, el contenedor de la segunda emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la segunda premezcla.  
60

El contenedor de la primera emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la primera premezcla y el contenedor de la segunda emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la segunda premezcla. Alternativamente, el contenedor de la primera emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la segunda premezcla y el contenedor de la segunda emulsión puede ser el mismo que el contenedor de la primera premezcla.  
65

Como una alternativa, los contenedores de la primera y la segunda emulsión pueden ser diferentes a los contenedores de la primera y segunda premezcla.

5 Después del 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 vuelta al contenedor de la primera emulsión, por ejemplo si se va a repetir el proceso de circulación de tipo II. La circulación de tipo II se puede llevar a cabo una única vez o una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, etc. veces.

10 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 gotitas de aceite y el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$  en la segunda emulsión.

15 Se puede usar una combinación de circulación de tipo I y circulación de tipo II durante la microfluidización. Esta combinación puede comprender cualquier orden de circulación de tipo I y tipo II, por ejemplo circulación tipo I seguida por tipo II, tipo II seguida por tipo I, tipo I seguida por tipo II seguida por tipo I de nuevo, etc.

20 Los contenedores de la primera y segunda emulsión pueden ser mantenidos bajo un gas inerte, por ejemplo, por ejemplo hasta 0,5 bar de nitrógeno. Esto evita que los componentes de la emulsión se oxiden, lo que es particularmente ventajoso si uno de los componentes de la emulsión es escualeno. Esto lleva a un aumento en la estabilidad de la emulsión.

Los métodos de la invención pueden ser usados a gran escala. Así un método puede implicar microfluidizar un volumen sea mayor de 1 litro, por ejemplo,  $\geq 5$  litros,  $\geq 10$  litros,  $\geq 20$  litros,  $\geq 50$  litros,  $\geq 100$  litros,  $\geq 250$  litros, etc.

## 25 **Filtración**

Después de la microfluidización, se filtra la segunda emulsión. Esta filtración eliminar cualquier gotita de aceite grande que haya sobrevivido a los procedimientos de homogeneización y microfluidización. Aunque pequeñas en término numéricos, estas gotitas de aceite pueden ser grandes en términos de volumen y pueden actuar como sitios de nucleación para la agregación, llevando a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento. Además, este paso de filtración puede conseguir la esterilización por filtración.

35 La membrana de filtración particular adecuada para la esterilización por filtración depende de las características del fluido de la segunda emulsión y el grado de filtración requerido. Una característica del filtro puede afectar su idoneidad para la filtración de la emulsión microfluidizada. Por ejemplo, su tamaño de poro y características de la superficie pueden ser importantes, particularmente cuando se filtra una emulsión basada en escualeno.

40 El tamaño del poro de las membranas usadas en la invención debería permitir el paso de las gotitas deseadas mientras se retienen las gotitas no deseadas. Por ejemplo, debería retener gotitas que tienen un tamaño  $\geq 1 \mu\text{m}$  mientras se permite el paso de gotitas  $< 200 \text{ nm}$ . Un filtro de  $0,2 \mu\text{m}$  o  $0,22 \mu\text{m}$  es ideal, y puede también conseguir la esterilización por filtración.

45 La emulsión puede ser prefiltrada, por ejemplo, a través de un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . La prefiltración y la filtración se pueden conseguir en un paso por el uso de filtros de doble capa conocidos que incluyen una primera capa de membrana con poros más grandes y una segunda capa de membrana con poros más pequeños. Los filtros de doble capa son particularmente útiles con la invención. La primera capa tiene idealmente un tamaño de poro  $> 0,3 \mu\text{m}$ , como de entre  $0,3-2 \mu\text{m}$  o entre  $0,3-1 \mu\text{m}$ , o entre  $0,4-0,8 \mu\text{m}$ , o entre  $0,5-0,7 \mu\text{m}$ . Se prefiere un tamaño de poro  $\geq 0,75 \mu\text{m}$  en la primera capa. Así la primera capa puede tener un tamaño de poro de  $0,6 \mu\text{m}$  o  $0,45 \mu\text{m}$ , por ejemplo. La segunda capa tiene idealmente un tamaño de poro que es menor del 75% del (e idealmente menor de la mitad de) tamaño del poro de la primera capa, como entre el 25-70% o entre el 25-49% del tamaño del poro de la primera capa, por ejemplo entre el 30-45%, como  $1/3$  o  $4/9$ , del tamaño del poro de la primera capa. Así la segunda capa puede tener un tamaño de poro  $< 0,3 \mu\text{m}$ , como entre  $0,15-0,28 \mu\text{m}$ , o entre  $0,18-0,24 \mu\text{m}$ , por ejemplo un tamaño de poro de la segunda capa de  $0,2 \mu\text{m}$  o  $0,22 \mu\text{m}$ . En un ejemplo, la primera capa de la membrana con poros más grandes proporciona un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ , mientras que la segunda capa de la membrana con poros más pequeños proporciona un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$ .

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

65 La membrana de filtración puede ser poroso o homogénea. Una membrana homogénea es habitualmente una película densa que varía de 10 a  $200 \mu\text{m}$ . Una membrana porosa tiene una estructura porosa. En una

realización, la membrana de filtración es porosa. En un filtro de doble capa, ambas capas pueden ser porosas, ambas capas pueden ser homogéneas, o puede haber una capa porosa y una homogénea. Un filtro de doble capa preferido es uno en el que ambas capas son porosas.

5 En una realización, la segunda emulsión es prefiltrada a través de una membrana asimétrica, hidrofílica porosa y después filtrada a través de otra membrana asimétrica hidrofílica porosa que tiene poros más pequeños que la membrana de prefiltración. Esta puede usar un filtro de doble capa.

10 La(s) membrana(s) del filtro pueden ser esterilizadas en autoclave antes del uso para asegurar que son estériles.

15 Las membranas de filtración están típicamente hechas de materiales de apoyo polimérico como PTFE (politetra-fluor-etileno), PES (polietersulfona), PVP (polivinilpirrolidona), de PVDF (fluoruro de polivinilideno), nylon (poliamidas), PP (polipropileno), celulosas (incluyendo ésteres de celulosa), PEEK (polieteretercetona), nitrocelulosa, etc. Estos tienen diversas características, con algunos apoyos siendo intrínsecamente hidrofóbicos (por ejemplo el PTFE) y otros siendo intrínsecamente hidrofílicos (por ejemplo acetatos de celulosa). Sin embargo, estas características intrínsecas pueden ser modificadas tratando la superficie de la membrana. Por ejemplo, se conoce el preparar membranas hidrofílicas o hidrofobizadas tratándolas con otros materiales (como otros polímeros, grafito, silicona, etc.) para recubrir la superficie de la membrana, por ejemplo ver la sección 2.1 de la referencia 15. En un  
20 filtro de doble capa las dos membranas pueden estar hechas de materiales diferentes o (idealmente) del mismo material.

25 Un filtro ideal para su uso con la invención tiene una superficie hidrofílica, al contrario que las enseñanzas de las referencias 9-12 en las que se deben usar filtros hidrofóbicos (polisulfona). Los filtros con superficies hidrofílicas pueden estar formados de materiales hidrofílicos, o por hidrofílicación de materiales hidrofóbicos, y un filtro preferido para su uso con la invención es una membrana de polietersulfona hidrofílica. Se conocen varios métodos diferentes para transformar membranas de PES hidrofóbicas en membranas de PES hidrofílicas. A menudo se consigue recubriendo la membrana con un polímero hidrofílico. Para proporcionar una unión permanente del polímero hidrofílico al PES se somete habitualmente a una capa de recubrimiento hidrofílico o a una reacción de  
30 reticulación o a injerto. La referencia 15 describe un proceso para modificar las propiedades de la superficie de un polímero hidrofóbico que tiene extremos de cadena funcionalizable, que comprende poner en contacto el polímero con una solución de una fracción conectora para formar un enlace covalente, y después poner en contacto el polímero hidrofóbico reaccionado con una solución de un agente modificante. La referencia describe un método de hidrofílicación de una membrana de PES por recubrimiento de la membrana directo, implicando pre-humectación con alcohol, y después empapando en una solución acuosa que contiene un monómero hidrofílico, un monómero polifuncional (reticulador) y un iniciador de polimerización. El monómero y el reticulador son entonces polimerizados usando polimerización térmica o iniciada por UV para formar un recubrimiento de polímero hidrofílico reticulado en la superficie de la membrana. De manera similar, las referencias 17 y 18 describen un recubrimiento de una membrana de PES empapándola en una solución acuosa de polímero hidrofílico (óxido de polialquileño) y al menos un monómero polifuncional (reticulador), y después polimerizando un monómero para proporcionar un recubrimiento hidrofílico no extraíble. La referencia 19 describe la hidrofílicación de la membrana de PES por una reacción de injerto en la que la membrana de PES es sometida a tratamiento de plasma de helio a baja temperatura seguido por el injerto de un monómero hidrofílico N-vinil-2-pirrolidona (NVP) en la superficie de la membrana. Otros de estos procesos se describen en las referencias 20 a 26.

45 En métodos que no se basan en recubrimiento, el PES puede ser disuelto en un solvente, mezclado con un aditivo hidrofílico soluble, y después la solución mezclada se usa para fundir una membrana hidrofílica, por ejemplo por precipitación o iniciación de co-polimerización. Tales métodos se describen en las referencias 27 a 33. Por ejemplo, la referencia 33 describe un método de preparación de una membrana de carga modificada hidrofílica que tiene extraíbles de membrana bajos y permite la recuperación rápida de la resistividad al agua ultrapura, teniendo una estructura de red de polímero inter-penetrante reticulada formada haciendo una solución de polímero de una mezcla de PES, PVP, polietilenimina, y diglicidil éter alifático, formando una película delgada de la solución, y precipitando la película como una membrana. Un proceso similar se describe en la referencia 34.

50 Se pueden usar enfoques híbridos, en los que aditivos hidrofílicos están presentes durante la formación de la membrana y también son añadidos después como un recubrimiento, ver por ejemplo la referencia 35.

60 La hidrofílicación de la membrana de PES se puede conseguir también por tratamiento con plasmas a baja temperatura. La referencia 36 describe la modificación hidrofílica de la membrana de PES por el tratamiento con CO<sub>2</sub>-plasma a baja temperatura.

65 La hidrofílicación de la membrana de PES también se puede conseguir por oxidación, como se describe en la referencia 37. Este método implica pre-humectar una membrana de PES hidrofóbica en un líquido que tiene una tensión superficial baja, exponer la membrana de PES húmeda a una solución acuosa de oxidante, y después calentar.

También se puede usar la inversión de fase, como se describe en la referencia 38.

Una membrana de PES hidrofílica ideal puede ser obtenida por tratamiento del PES (hidrofóbico) con PVP (hidrofílico). Se ha descubierto que el tratamiento con PEG (hidrofílico) en lugar de PVP da una membrana de PES hidrofílica que es fácilmente obstruida (particularmente cuando se usa una emulsión que contiene escualeno) y también libera desventajosamente formaldehído durante la esterilización en autoclave.

Un filtro de doble capa preferido tienen una primera membrana de PES hidrofílica y una segunda membrana de PES hidrofílica.

Las membranas hidrofílicas conocidas incluyen: BioAssure (de Cuno); Polietersulfona Everlux™; Polietersulfona Stylux™ (ambos de Meissner); Millex GV, Millex HP, Millipak 60, Millipak 200 y las membranas Durapore CVGL01TP3 (de Millipore); Membrana EX FED Fluorodyne™; Supor™ EAV; Supor™ VEB, Supor EKV™ (todos de Pall); Sartopore™ (de Sartorius); Membrana de PES hidrofílica de Sterlitech; y la membrana de PES WFPES de Wolftechnik.

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

Es ventajoso realizar el paso de filtración antes de 24 horas, por ejemplo antes de 18 horas, antes de 12 horas, antes de 6 horas, antes de 2 horas, antes de 30 minutos, de la producción de la segunda emulsión ya que después de este tiempo puede no ser posible pasar la segunda emulsión a través del filtro estéril sin obstruir el filtro, como se describe en la referencia 37.

Los métodos de la invención pueden ser usados a gran escala. Así un método puede implicar filtrar un volumen mayor de 1 litro, por ejemplo ≥5 litros, ≥10 litros, ≥20 litros, ≥50 litros, ≥100 litros, ≥250 litros, etc.

#### **La emulsión final**

El resultado de la microfluidización y la filtración es una emulsión de aceite-en-agua en la que el tamaño medio de las gotitas de aceite puede ser menor de 220 nm, por ejemplo  $155 \pm 20$  nm,  $155 \pm 10$  nm o  $155 \pm 5$  nm, y en la que el número de gotitas de aceite que tienen un tamaño  $>1,2 \mu\text{m}$  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.

El tamaño de las gotitas de aceite medio de las emulsiones descritas en la presente (incluyendo la primera y segunda emulsiones) no es generalmente menor de 50 nm.

Los métodos de la invención se pueden usar a gran escala. Así un método puede implicar preparar una emulsión final con un volumen mayor de 1 litro, por ejemplo ≥5 litros, ≥10 litros, ≥20 litros, ≥50 litros, ≥100 litros, ≥250 litros, etc.

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

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

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

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

- 5 • Una emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80 (Tween 80), y trioleato de sorbitán (Span 85). La composición de la emulsión por volumen puede ser de alrededor del 5% de escualeno, alrededor del 0,5% de polisorbato 80 y alrededor del 0,5% de trioleato de sorbitán. En términos de peso, estas cantidades estas cantidades se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de trioleato de sorbitán. Este adyuvante se conoce como 'MF59'. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones de citrato, por ejemplo 10 mM de tampón de citrato de sodio.
- 10 • Emulsiones que comprenden escualeno, un  $\alpha$ -tocoferol (idealmente DL- $\alpha$ -tocoferol), y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener (por peso) del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10%  $\alpha$ -tocoferol y del 0,3 al 3% de polisorbato 80 por ejemplo, 4,3% de escualeno, 4,7% de  $\alpha$ -tocoferol, 1,9% de polisorbato 80. La proporción de peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente  $\geq 1$  (por ejemplo 0,90) ya que proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en una proporción de volumen de alrededor de 5:2, o a una proporción de peso de alrededor de 11:5. Una de tales emulsiones se puede hacer disolviendo polisorbato 80 en PBS para dar un 2% de solución, después mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno) después midrofluidizar la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrónicas, por ejemplo con un tamaño entre 100 y 250 nm, preferiblemente de alrededor de 180 nm.
- 20 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100). La emulsión puede también incluir un lípido A 3-O-desacilado monofosforil (MPL-'3 d '). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
- 25 • Una emulsión que comprende escualeno, un polisorbato (por ejemplo polisorbato 80) un detergente Triton (por ejemplo Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo un succinato de  $\alpha$ -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una proporción de masa de alrededor de 75:11:10 (por ejemplo 750  $\mu$ g/ml de polisorbato 80, 110  $\mu$ g/ml de Triton X-100 y 100  $\mu$ g/ml de succinato de  $\alpha$ -tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede también incluir un 3d-MPL. La emulsión puede también incluir una saponina, como la QS21. La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
- 30 • Una emulsión que comprende escualeno, un solvente acuoso, un surfactante de polioxietilen alquil éter hidrofílico no iónico (por ejemplo, éter polioxietilen (12) cetoestearílico) y un surfactante no iónico hidrofóbico (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos un 910% de gotitas de aceite (por volumen) con un tamaño menor de 200 nm [40]. La emulsión puede también incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, 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 ser liofilizadas.

Las composiciones de estas emulsiones, expresadas anteriormente en términos porcentuales, pueden ser modificadas por dilución o concentración (por ejemplo, por un entero, como 2 ó 3 o por una fracción, como 2/3 ó 3/4), en la que sus proporciones permanezcan iguales. Por ejemplo, el MF59 concentrado 2 veces tendría alrededor del 10% de escualeno, alrededor del 1% de polisorbato 80 y alrededor del 1% de trioleato de sorbitán. Las formas concentradas pueden ser diluidas (por ejemplo con una solución de antígeno) para dar una concentración final deseada de la emulsión.

Las emulsiones de la invención son almacenadas idealmente a entre 2<sup>o</sup> C y 8<sup>o</sup> C. No deben congelarse. Deben ser mantenidas idealmente fuera de luz directa. En particular, las emulsiones y vacunas que contienen escualeno de la invención deben ser protegidas para evitar la descomposición fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones de la invención son almacenadas esto será preferiblemente en una atmósfera inerte, por ejemplo N<sub>2</sub> o argón.

## 55 **Vacunas**

Aunque es posible administrar adyuvantes de emulsiones de aceite-en-agua por sí mismas (por ejemplo para proporcionar un efecto adyuvante para un antígeno que ha sido administrado de forma separada al paciente), es más habitual mezclar el adyuvante con un antígeno antes de la administración, para formar una composición inmunogénica, por ejemplo una vacuna. Mezclar la emulsión y el antígeno puede tener lugar extemporáneamente, en el momento del uso, o puede tener lugar durante la fabricación de la vacuna, antes del llenado. Los métodos de la invención pueden ser aplicados en ambas situaciones.

65

Así, las emulsiones de aceite-en-agua hechas por un método de la invención pueden incluir un paso del proceso adicional de mezclar la emulsión con un componente antigénico. Como alternativa, puede incluir un paso adicional de envasar el adyuvante en un kit como un componente del kit junto con un componente antigénico.

5 En conjunto, por lo tanto, la invención puede ser usada cuando se prepara vacunas mezcladas o cuando se preparan kits que incluyen antigénico y adyuvante listos para el mezclado. Cuando el mezclado tiene lugar durante la fabricación los volúmenes de antigénico y emulsión brutos que se mezclan serán típicamente mayores de 1 litro, por ejemplo  $\geq 5$  litros,  $\geq 10$  litros,  $\geq 20$  litros,  $\geq 50$  litros,  $\geq 100$  litros,  $\geq 250$  litros, etc. Cuando el mezclado tiene lugar en el momento del uso cuando los volúmenes están mezclados serán típicamente menores de 1 mililitro, por ejemplo  $\leq 0,6$  ml,  $\leq 0,5$  ml,  $\leq 0,4$  ml,  $\leq 0,3$  ml,  $\leq 0,2$  ml, etc. En ambos casos es habitual mezclar volúmenes sustancialmente iguales de solución de antigénico y emulsión, 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 1,024:1 y 1:1,025). En algunas realizaciones, sin embargo, se puede usar un exceso de emulsión o un exceso de antigénico [42]. Cuando se usa una volumen en exceso de un componente el exceso será generalmente de al menos 1,5:1 por ejemplo,  $\geq 2:1$ ,  $\geq 2,5:1$ ,  $\geq 3:1$ ,  $\geq 4:1$ ,  $\geq 5:1$ , etc.

10 Cuando el antigénico y el adyuvante se presentan como componentes separados dentro de un kit, están físicamente separados entre sí dentro del kit, y esta separación se puede conseguir de varias maneras. Por ejemplo, los componentes pueden estar en contenedores separados, como viales. Los contenidos de los dos viales pueden ser entonces mezclados cuando se necesite, por ejemplo retirando los contenidos de un vial y añadiéndolos al otro vial, o retirando separadamente los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer contenedor.

15 En otra disposición, uno de los componentes del kit está en una jeringuilla y el otro está en un contenedor como un vial. La jeringuilla puede ser usada (por ejemplo con una aguja) para insertar sus contenidos en el vial para el mezclado, y la mezcla puede ser entonces retirada en la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden ser entonces administrados a un paciente, típicamente a través de una nueva aguja estéril. Envasar un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla separada para la administración al paciente.

20 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero de forma separada en la misma jeringuilla, por ejemplo una jeringuilla de doble cámara, como las descritas en las referencias 43-50, etc. Cuando se acciona la jeringuilla (por ejemplo durante la administración a un paciente) los contenidos de las dos cámaras se mezclan. Esta disposición evita la necesidad de un paso de mezclado separado en el momento del uso.

25 Los contenidos de los varios componentes del kit estarán generalmente en forma líquida. En algunas disposiciones, un componente (típicamente el componente antigénico en lugar del componente de la emulsión) está en forma seca (por ejemplo en una forma liofilizada), con el otro componente estando en forma líquida. Los dos componentes pueden ser mezclados para reactivar el componente seco y dar una composición líquida para la administración a un paciente. Un componente liofilizado estará típicamente localizado dentro de un vial en lugar de una jeringuilla. Los componentes secos pueden incluir estabilizadores 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 un componente de la emulsión líquido en una jeringuilla pre-llenada y un componente antigénico liofilizado en un vial.

30 Si las vacunas contienen componentes además de la emulsión y el antigénico entonces estos componentes adicionales pueden ser incluidos en uno de estos dos componentes del kit, o pueden ser parte de un tercer componente del kit.

35 Los contenedores adecuados para vacunas mezcladas de la invención, o para componentes del kit individuales, incluyen viales y jeringuillas desechables. Estos contenedores deben ser estériles.

40 Cuando una composición/componente está localizada en un vial, el vial está preferiblemente hecho de un material cristalino o plástico. El vial es preferiblemente esterilizado antes de que se le añada la composición, para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales son preferiblemente sellados con un tapón libre de látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de envasado. En una realización, un vial tiene un tapón de goma de butilo. El vial puede incluir una única dosis de vacuna/componente, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis'), por ejemplo 10 dosis. En una realización, un vial incluye 10 x 0,25 ml dosis de emulsión. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

45 Un vial puede tener una tapa (por ejemplo un cierre Luer) adaptado de tal manera que una jeringuilla pre-llenada puede ser insertada en la tapa, los contenidos de la jeringuilla pueden ser expulsados en el vial (por ejemplo para reconstituir material liofilizado en el mismo), y los contenidos del vial pueden ser retirados de vuelta a la jeringuilla. Después de la retirada de la jeringuilla del vial, puede unirse entonces una aguja y la composición puede ser administrada a un paciente. La tapa está localizada preferiblemente dentro de un sello o cubierta, de tal forma que el sello o cubierta tiene que ser retirado antes de que se pueda acceder a la tapa.

50

55

60

65

5 Cuando una composición/componente está envasada en una jeringuilla, la jeringuilla no tendrá normalmente una aguja unida a ella, aunque se puede suministrar una aguja separada con la jeringuilla para el montaje y uso, se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 1 pulgada calibre 23, 1 pulgada calibre 25 y 5/8 pulgadas calibre 25. Las jeringuillas se pueden proporcionar con etiquetas despegables en las que se puede imprimir el número del lote, temporada de la gripe y fecha de caducidad de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de los registros. El émbolo en la jeringuilla tiene preferiblemente un tope para evitar que el émbolo sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener una tapa y/o émbolo de goma de látex. Las jeringuillas desechables contienen una única dosis de la vacuna. La jeringuilla tendrá típicamente una tapa en la punta para sellar la punta antes de la unión de una aguja, y la tapa de la punta está hecha preferiblemente de goma de butilo. Si la jeringuilla y la aguja están envasadas de forma separada entonces la aguja está equipada preferiblemente con un protector de goma de butilo.

15 La emulsión puede ser diluida con un tampón antes del envasado en un vial o una jeringuilla. Los tampones típicos incluyen; un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. La dilución puede reducir la concentración de los componentes del adyuvante mientras mantiene sus proporciones relativas, por ejemplo para proporcionar un adyuvante de "fuerza media".

20 Los contenedores pueden ser marcados para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo para facilitar la administración a 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.

25 Cuando se usa un contenedor de vidrio (por ejemplo una jeringuilla o un vial), se prefiere usar un contenedor hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio sódico cálcico.

30 Se pueden usar varios antígenos con emulsiones de aceite-en-agua, incluyendo pero no limitados a: antígenos virales, como proteínas de superficie viral; antígenos bacterianos, como proteínas y/o antígenos de sacáridos; antígenos fúngicos; antígenos de parásitos; y antígenos tumorales. La invención es particularmente útil para vacunas contra el virus de la gripe, VIH, anquilostoma, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, la rabia, virus respiratorio sincitial, citomegalovirus, *Staphylococcus aureus*, clamidia, coronavirus SARS, virus de la varicela zoster, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, virus de Epstein Barr, el virus del papiloma humano, etc. por ejemplo:

- 35 • Antígenos del virus de la gripe. Estos pueden tomar la forma de un virus vivo o un virus inactivado. Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender viriones completos, viriones fraccionados o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y, por lo general, incluyendo también neuraminidasa). Los antígenos de la gripe también pueden ser presentados en la forma de virosomas. Los antígenos pueden tener cualquier subtipo de hemaglutinina, seleccionada de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H 13, H 14, H15 y/o H16. La vacuna puede incluir antígenos de una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe A y/o virus de la gripe B, por ejemplo una vacuna A/H5N1 o A/H1N1 monovalente, o una vacuna A/H1N1 + A/H3N2 + B trivalente. El virus de la gripe puede ser una cepa reagrupada, y puede haber sido obtenida por técnicas genéticas inversas [por ejemplo 51-55]. Así el virus puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (típicamente 6 segmentos de A/PR/8/34, con los segmentos HA y N siendo de una cepa de la vacuna, es decir un reagrupado 6:2). Los virus usados como fuente de los antígenos pueden ser cultivados o en huevos (por ejemplo huevos de gallina embrionados) o en cultivo celular. Cuando se usa cultivo celular, el sustrato celular será típicamente una línea celular mamífera, como MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Las líneas celulares mamíferas preferidas para cultivar virus de la gripe incluyen: células MDCK [56-59], derivadas de riñón canino Madin Darby; células Vero [60-62], derivadas de riñón de mono verde africano; o células PER.C6 [63], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Cuando el virus ha sido cultivado en una línea celular mamífera entonces la composición estará ventajosamente libre de proteínas del huevo (por ejemplo ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo de esta manera la alergenicidad. Las dosis unitarias de vacuna son estandarizadas típicamente por referencia a contenido de hemaglutinina (HA), medido típicamente por SRID. Las vacunas existentes contienen típicamente alrededor de 15 µg de Ha por cepa, aunque se pueden usar dosis más bajas, particularmente cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionales como 1/2 (es decir 7,5 µg de Ha por cepa, 1/4 y 1/5 [64, 65], como lo han sido dosis más altas (por ejemplo dosis de 3x o 9x [66, 67]). Por lo tanto las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 1150 µg de Ha por cepa de gripe, preferiblemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen, por ejemplo alrededor de 15, alrededor de 10, alrededor de 7,5, alrededor de 5, alrededor de 3,8, alrededor de 3,75, alrededor de 3,75, alrededor de 1,9, alrededor de 1,5, etc. por cepa.

- 65 • Virus de la inmunodeficiencia humana, incluyendo VIH-1 y VIH-2. El antígeno será típicamente un antígeno de la cubierta.

- 5 • Antígenos de superficie de virus de la hepatitis B. Este antígeno es obtenido preferiblemente por métodos de ADN recombinante, por ejemplo después de la expresión en una levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A diferencia del HBsAg viral nativo, el antígeno expresado en levadura recombinante no está glicosilado. Puede estar en la forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro medio de alrededor de 20 nm), incluyendo una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. A diferencia de las partículas de HBsAg nativas, las partículas expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol. El HBsAg puede ser de cualquiera de los subtipos ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- e adrq+.
- 10 • Anquilostomiasis, particularmente como se observa en caninos (*Ancylostoma caninum*). Este antígeno puede ser Ac-MTP-1 recombinante (metaloproteasa tipo astacina) y una hemoglobinasa aspártica (Ac-APR-1), qu, e puede ser expresada en un sistema celular de baculovirus/insecto como una proteína secretada [68, 69].
- 15 • Antígenos del virus simples del herpes (HSV). Un antígeno del HSV preferido para el uso con la invención es la glicoproteína de membrana gD. Se prefiere usar gD de una cepa HSV-2 (antígeno 'gD2'). La composición puede usar una forma de gD en la que la región de anclaje de la membrana C-terminal ha sido eliminada [70], por ejemplo una gD truncada que comprende los aminoácidos 1-306 de la proteína natural con la adición de aparagina y glutamina en el término C. Esta forma de la proteína incluye el péptido señal que está escindido para producir una proteína de 283 aminoácidos madura. La delección del anclaje permite a la proteína ser preparada en forma soluble.
- 20 • antígenos del virus del papiloma humano (HPV). Los antígenos del HPV preferidos para el uso con la invención son las proteínas cápside L1 que pueden montarse para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLPs). Las VLPs pueden ser producidas por expresión recombinante de L1 es células de levadura (por ejemplo en *S.cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo en células de *Spodoptera*, como *S.frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para las células de levadura, los vectores plásmidos pueden llevar los genes de L1; para células de insectos, los vectores de baculovirus pueden llevar los genes de L1. Más preferiblemente, la composición incluye VLPs de L1 de tanto las cepas HPV-16 y HPV-18. La combinación bivalente ha demostrado ser 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 HPV oncogénicas también es posible. Una vacuna puede incluir entre 20-60 µg/ml (por ejemplo alrededor de 40 µg/ml) de L1 por cepa de HPV.
- 25 • Antígenos de ántrax. El ántrax es causado por el *Bacillus anthracis*. Los antígenos de *B. anthracis* adecuados incluyen componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). Los antígenos pueden estar opcionalmente desintoxicados. Detalles adicionales se pueden encontrar en las referencias [72 a 74].
- 30 • Antígenos de *S.aureus*. Se conoce una variedad de los antígenos de *S.aureus*. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo de una cepa tipo 5 y/o tipo 8) y proteínas (por ejemplo lsdB, Hla, etc.). Los antígenos de sacáridos capsulares están idealmente conjugados con una proteína portadora.
- 35 • antígenos de *S.pneumoniae*. Se conocen una variedad de antígenos de *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, neumolisina desintoxicada, proteína D tríada de polihistidina (PhtD), etc.). Los antígenos de sacáridos capsulares están idealmente conjugados con una proteína portadora.
- 40 • Antígenos del cáncer. Se conocen una variedad de antígenos específicos de tumores. La invención puede ser usada con antígenos que provocan una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de pecho, cáncer de próstata, etc.
- 45
- 50

55 Una solución del antígeno será normalmente mezclada con la emulsión, por ejemplo a una proporción de volumen de 1:1. Esta mezcla puede ser realizada o por un fabricante de vacunas, antes del llenado, o puede ser realizada en el momento del uso, por un trabajador sanitario.

### Composiciones farmacéuticas

60 Las composiciones hechas usando los métodos de la invención son farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir componentes además de la emulsión y el antígeno opcional.

65 La composición puede incluir un conservante como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté sustancialmente libre de (es decir menos de 5 µg/ml) de materia mercurial, por ejemplo libre de tiomersal [75, 76]. Son más preferidas las vacunas y componentes que no contienen mercurio.



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

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

10 La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir un kit 'multidosis'). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis.

Las vacunas son típicamente administradas en un volumen de dosificación de alrededor de 0,5 ml, aunque se puede administrar a niños una media dosis (es decir alrededor de 0,25 ml).

15 **Métodos de tratamiento, y administración de la vacuna**

También se describen 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 también se describe un método de provocar una respuesta inmune en un paciente, que comprende el paso de administrar dicha composición al paciente.

También se describen estos kits y composiciones para el uso como medicamentos.

25 También se describe 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 promover una respuesta inmune en un paciente.

30 La respuesta inmune promovida por estos métodos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectora.

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

35 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden ser usadas para tratar a tanto niños como adultos. El paciente puede ser menor de 1 año, tener de 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años. El paciente puede ser mayor (por ejemplo  $\geq 50$  años, preferiblemente  $\geq 65$  años), jóvenes (por ejemplo  $\leq 5$  años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la sanidad, personal de servicios armados y militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, y gente que viaja al extranjero. Las vacunas nos son adecuadas solamente para estos grupos sin embargo, y pueden ser usadas más generalmente en una población.

40 Las vacunas de la invención pueden ser administradas a pacientes a sustancialmente el mismo tiempo que (por ejemplo durante la misma consulta o visita médica a un profesional de la sanidad) otras vacunas.

45 **General**

El término "comprende" engloba "incluye" así como "consiste", por ejemplo una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

50 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede ser completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede ser omitida de la definición de la invención.

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

55 A menos que se afirme específicamente, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Por lo tanto los componentes pueden ser mezclados en cualquier orden. Cuando hay tres componentes entonces dos componentes pueden ser combinados entre sí, y después la combinación puede ser combinada con el tercer componente, etc.

60 Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben ser obtenidos de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefiere células de cultivo en ausencia total de materiales derivados de animales.

65

**BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

- 5 La Figura 1 muestra un ejemplo específico de un homogeneizador que puede ser usado para formar una primera emulsión.
- La Figura 2 muestra detalles de un rotor y un estator que pueden ser usados en dicho homogeneizador.
- La Figura 3 muestra dos perfiles de presión para un modo de bomba intensificadora sincrónica.
- 10 La Figura 4 muestra una cámara de interacción de cala tipo Z.
- La Figura 5 muestra una circulación tipo I, mientras que la Figura 6 muestra una circulación tipo II. Los contenedores están etiquetados como "C" mientras que un homogeneizador está etiquetado como "H". Se muestran la dirección y orden de los movimientos del 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.
- 15

**MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION**

- 20 Se preparó una primera emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y tampón de citrato de sodio por homogeneización. La primera emulsión se homogeneizó hasta que tuvo un tamaño de gotitas de aceite medio de 1200 nm o menos y un número de gotitas de aceite que tenían un tamaño de  $>1,2 \mu\text{m}$  de  $5 \times 10^9$  /ml o menos.
- 25 La primera emulsión fue entonces sometida a microfluidización para formar una segunda emulsión. El dispositivo de microfluidización comprendía dos bombas intensificadoras sincrónicas que proporcionaban una presión sustancialmente constante de aproximadamente 700 bar (es decir aproximadamente 10000 psi). La emulsión se pasó a través del dispositivo de microfluidización cinco veces. La emulsión se mantuvo a una temperatura de  $40 \pm 5^\circ \text{C}$  durante la microfluidización a través del uso de un mecanismo de refrigeración.
- 30 Se realizaron cuatro ejecuciones de prueba. En el primer par de ejecuciones de prueba se posicionó un único modulo de procesamiento auxiliar (APM) del canal hacia arriba de una cámara de interacción (IXC) tipo Z, de 8 canales, como se recomienda por el fabricante, y el caudal de la emulsión en el dispositivo microfluidizador era de 10,2 L/min. En el segundo par de ejecuciones de prueba, se posicionó un APM multi-canal hacia abajo de una IXC tipo Z, de 8 canales y el caudal de la emulsión en dispositivo microfluidizador fue de 11,6 L/min. Ambas ejecuciones se realizaron a gran escala (250 litros). Los resultados de las cuatro ejecuciones de prueba están en la Tabla 1.
- 35

Tabla 1

Orden	APM-IXC		IXC-APM	
Número de ejecución	1	2	3	4
45 Tamaño de las gotitas de aceite medio después de 1 pase	249	220.9	200.8	200.3
Nº de gotitas de aceite con un tamaño $> 1.2 \mu\text{m}$ después de 2 pases	$180.7 \times 10^6$	$175.4 \times 10^6$	$54.3 \times 10^6$	$62,1 \times 10^6$
50 Tamaño de las gotitas de aceite medio después de 1 pase	230	224.9	170.9	167.5
Nº de gotitas de aceite con un tamaño $> 1.2 \mu\text{m}$ después de 2 pases	$170.2 \times 10^6$	$139.6 \times 10^6$	$43.0 \times 10^6$	$42.8 \times 10^6$
55 Tamaño de las gotitas de aceite medio después de 3 pases	218	221.5	166.8	156.7
Nº de gotitas de aceite con un tamaño $> 1.2 \mu\text{m}$ después de 3 pases	$166.7 \times 10^6$	$164.3 \times 10^6$	$36.7 \times 10^6$	$42.5 \times 10^6$
60 Tamaño de las gotitas de aceite medio después de 4 pases	215	222.6	154.3	156.8
Nº de gotitas de aceite con un tamaño $> 1.2 \mu\text{m}$ después de 4 pases	$127.6 \times 10^6$	$115.6 \times 10^6$	$35.9 \times 10^6$	$43.2 \times 10^6$

Como se muestra en la Tabla 1, las ejecuciones de prueba en las que el APM estaba posicionado hacia abajo de la IXC produjeron emulsiones con tamaño de partículas medio más pequeño y con menos partículas con un tamaño > 1,2 µm. Además, el orden IXXC-APM alcanzó un diámetro de partícula de ≤200 nm después de 1 pase mientras que este tamaño no se alcanzó incluso después de 4 pases con el orden APM-IXC. Por lo tanto, el posicionamiento del APM hacia abajo de la IXC tipo Z mostró ser ventajoso para la fabricación a gran escala.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y se pueden hacer modificaciones mientras se permanece dentro del ámbito y espíritu de la invención.

## 10 REFERENCIAS

- [1] WO90/14837.  
 [2] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.  
 [3] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.  
 15 [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.  
 20 [6] *New Generation Vaccines* (eds. Levine et al.). 3rd edition, 2004. ISBN 0-8247-4071-8.  
 [7] O'Hagan (2007) *Expert Rev Vaccines* 6(5):699-710.  
 [8] EP-B-2029170  
 [9] Baudner et al. (2009) *Pharm Res.* 26(6):1477-85.  
 25 [10] Dupuis et al. (1999) *Vaccine* 18:434-9.  
 [11] Dupuis et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:2910-8.  
 [12] Burke et al. (1994) *J Infect Dis* 170:1110-9.  
 [13] *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions* (W. Scharl), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.  
 [14] Jafari et al (2008) *Food Hydrocolloids* 22:1191-1202  
 30 [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.  
 35 [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  
 40 [25] US-4,673,504  
 [26] EP-A-0221046.  
 [27] US-4,943,374  
 [28] US-6,071,406  
 [29] US-4,705,753  
 45 [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.  
 50 [35] US-4,964,990  
 [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.  
 55 [39] Lidgate et al (1992) *Pharmaceutical Research* 9(7):860-863.  
 [40] US-2007/0014805.  
 [41] WO2007/080308.  
 [42] WO2007/052155.  
 [43] WO2005/089837.  
 [44] US 6,692,468.  
 60 [45] WO00/07647.  
 [46] WO99/17820.  
 [47] US 5,971,953.  
 [48] US 4,060,082.  
 [49] EP-A-0520618.  
 65 [50] WO98/01174.  
 [51] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.

5  
 [52] Subbarao et al. (2003) *Virology* 305:192-200.  
 [53] Liu et al. (2003) *Virology* 314:580-590.  
 [54] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.  
 [55] Webby et al. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.  
 [56] WO97/37000.  
 [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) *Vaccines* 19:3444-50.  
 10 [60] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.  
 [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.  
 15 [65] Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.  
 [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.  
 20 [70] EP-A-0139417.  
 [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.  
 25 [75] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.  
 [76] WO02/097072.  
 [77] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.  
 [78] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.  
 [79] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.  
 30 [80] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.  
 [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.  
 [84] US 2006/251684 A

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

5 1. Un aparato de microfluidización que comprende una cámara de interacción, al menos una bomba intensificadora, y una cámara de presión de retorno, en donde la cámara de interacción contiene una pluralidad de canales de geometría tipo Z y en donde la cámara de presión de retorno comprende una pluralidad de canales de geometría fija y está localizada hacia abajo de la cámara de interacción.

10 2. El aparato de cualquier reivindicación anterior, en donde la cámara de interacción proporciona una tasa de cizallamiento superior a  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ .

15 3. Un método para la fabricación de una emulsión de aceite-en-agua que comprende el paso de pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño de gotitas de aceite medio a través de un aparato de microfluidización como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

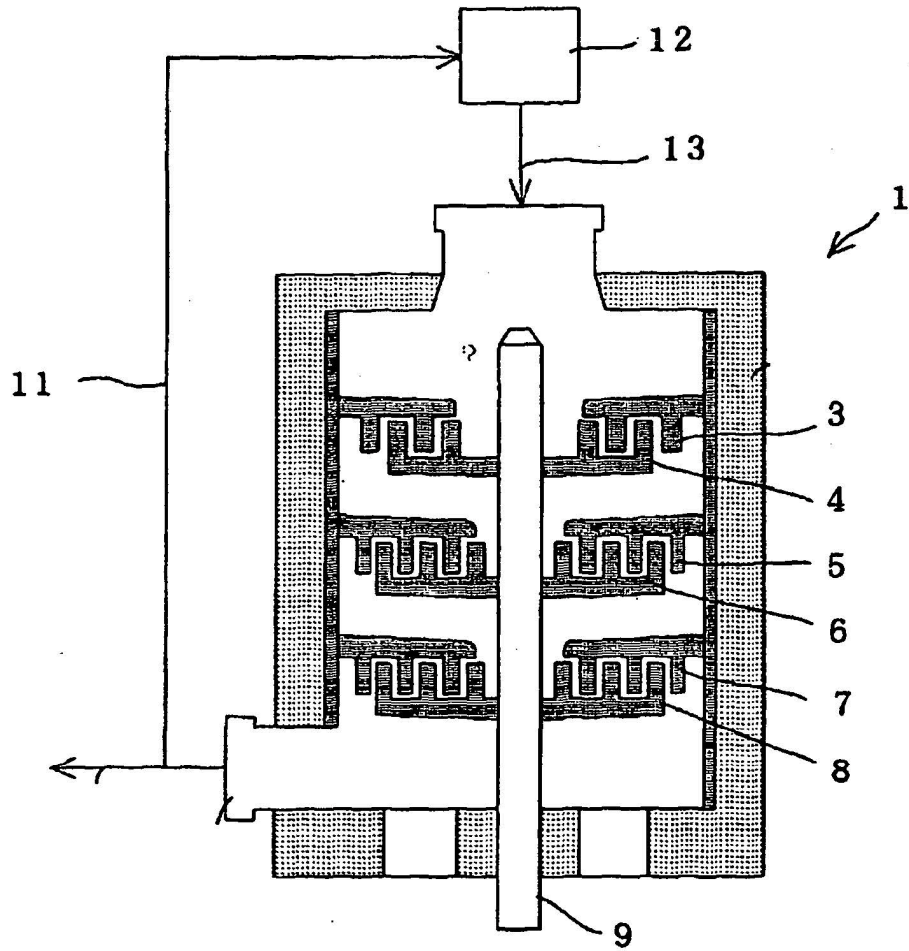
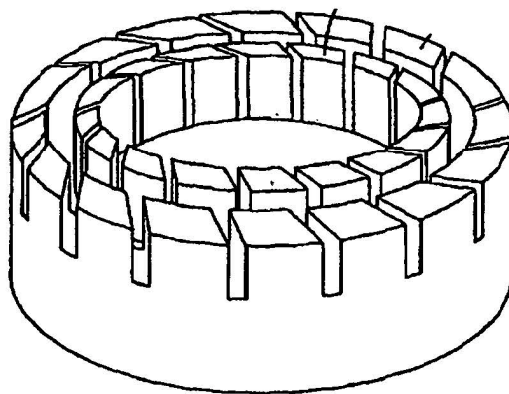
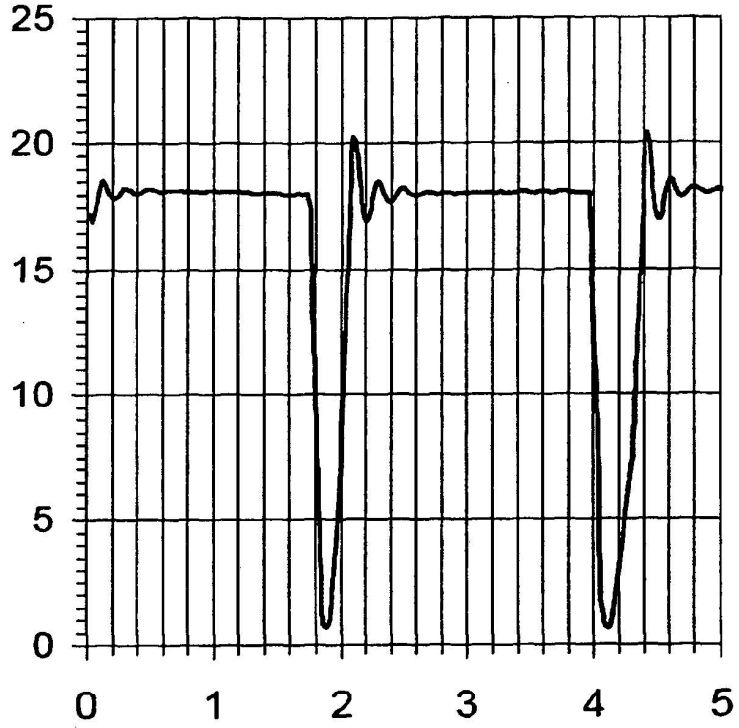


Figura 2



**Figura 3**

**Figura 3A**



**Figura 3B**

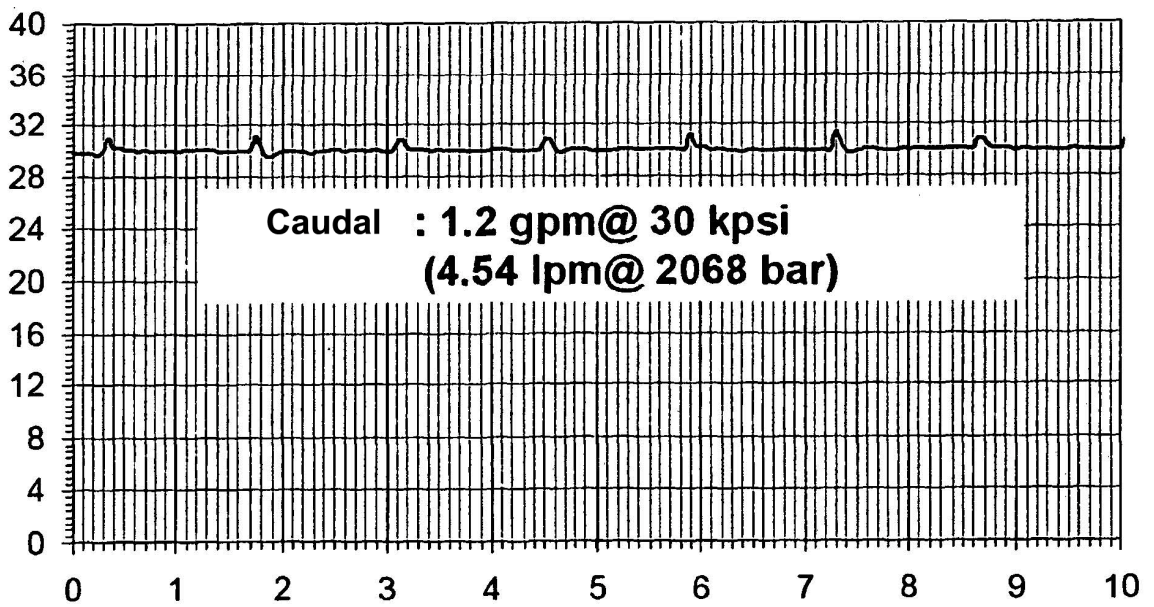


Figura 4

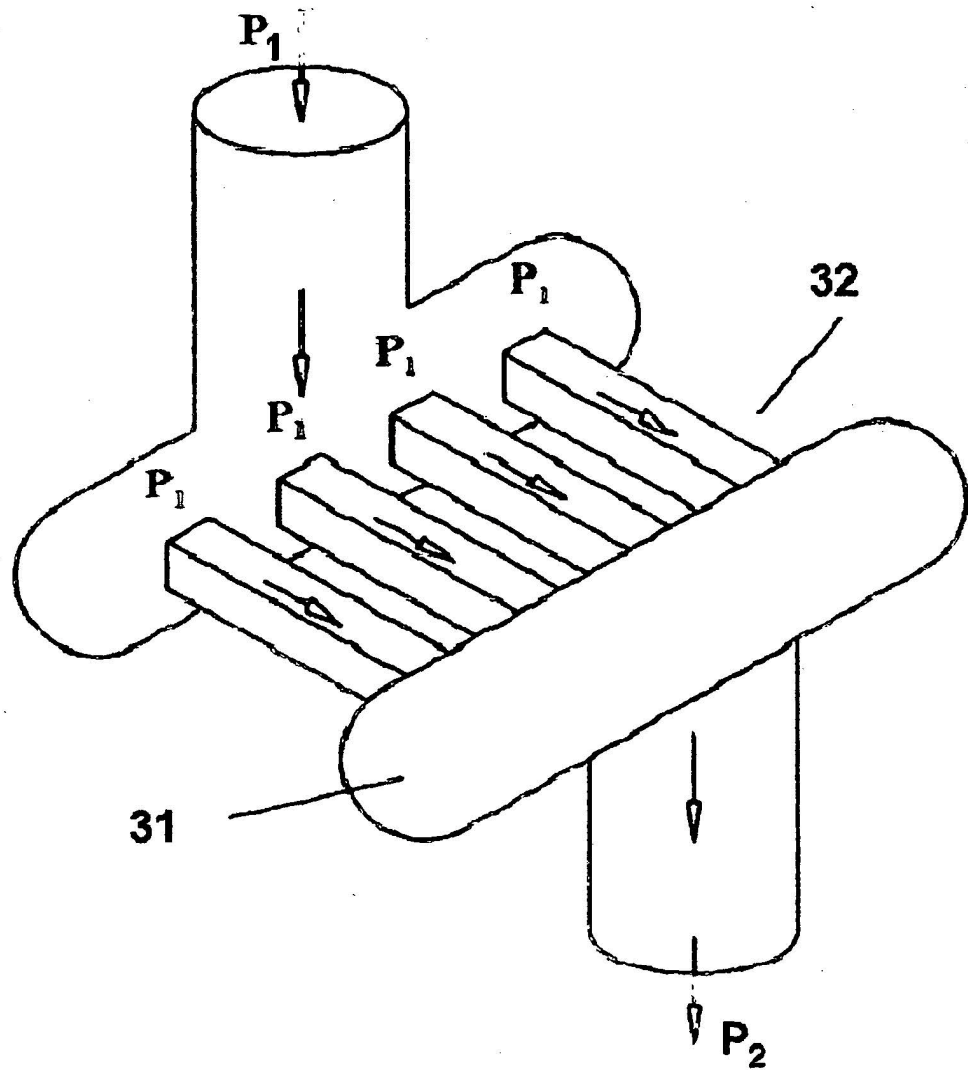




Figura 5

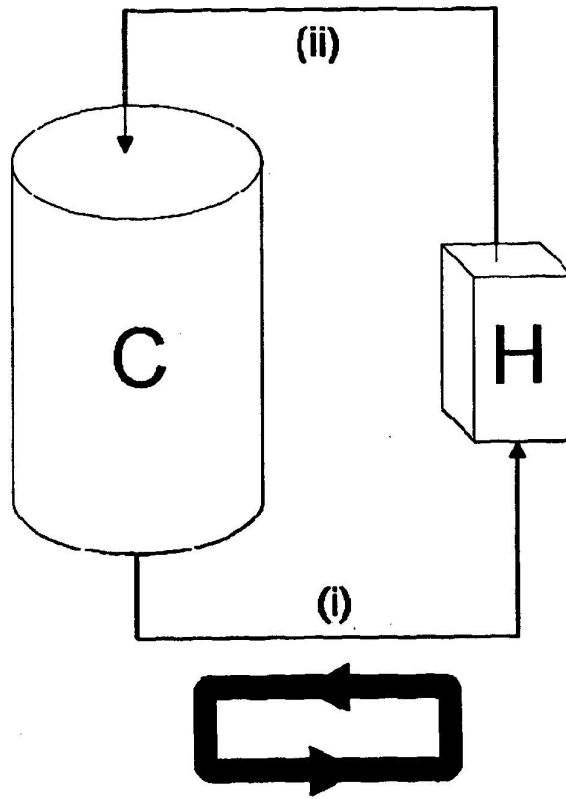


Figura 6

