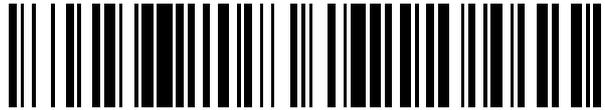


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 646**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10790134 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2442827**

54 Título: **Vacunas en nanoemulsión**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187529 P

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

14.04.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (100.0%)**

**1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

72 Inventor/es:

**LUKACS, NICHOLAS W.;
LINDELL, DENNIS M. y
BAKER, JAMES R., JR.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 646 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

Vacunas en nanoemulsión

Campo de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos y composiciones para la estimulación de respuestas inmunitarias. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones inmunógenas como se definen en las reivindicaciones 1-9, una vacuna que comprende dicha composición inmunógena como se define en las reivindicaciones 10-11 y la mencionada composición inmunógena para su uso en el tratamiento o prevención de una infección debida al virus sincicial respiratorio como se define en la reivindicación 12. En otras palabras, la invención como se define en las reivindicaciones se refiere a procedimientos para utilizar las composiciones inmunógenas para inducir respuestas inmunitarias (por ejemplo, inmunidad (por ejemplo, inmunidad protectora)) contra un virus patógeno de la familia *paramyxoviridae* un virus *Pneumovirinae* (concretamente el virus sincicial respiratorio). Las composiciones de la presente invención son de utilidad en, entre otras cosas, aplicaciones clínicas (por ejemplo, terapéuticas y de medicina preventiva (por ejemplo, de vacunación)) así como aplicaciones de investigación.

Antecedentes

La inmunización es una característica principal para mejorar la salud de las personas. A pesar de la disponibilidad de una variedad de vacunas satisfactorias contra muchas enfermedades comunes, las enfermedades infecciosas siguen siendo una causa conducente a problemas de salud y muerte. Los problemas significativos inherentes a las vacunas existentes incluyen la necesidad de inmunizaciones repetidas, y la ineficacia de los sistemas de administración de las vacunas actuales para un amplio espectro de enfermedades.

A fin de desarrollar vacunas contra patógenos que han sido resistentes al desarrollo de vacunas, y/o para superar los defectos de las vacunas comercialmente disponibles (por ejemplo, debido a los resultados adversos, coste elevado, complejidad, y/o infrautilización), deben desarrollarse nuevos procedimientos de expresión de antígenos que permitan un número menor de inmunizaciones, una utilización más eficaz, y/o menos efectos secundarios de la vacuna.

Se conocen en la técnica anterior composiciones que comprenden virus inactivados. En particular Meyer y col., 2008 [MEYER Y COL: "Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development" COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 31, n.º 2-3, 1 de marzo de 2008, páginas 191-225] y Becker, 2006 [YECHIEL BECKER: "Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy -a review", VIRUS GENES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 33, n.º 2, 1 de octubre de 2006, páginas 235-252] describe la vacuna del VSR inactivada con formaldehído (FI-VSR). Se divulga la administración de composiciones que contienen virus inactivados con una nanoemulsión en Makidon y col., 2008 [PAUL E MAKIDON Y COL: "Pre-Clinical Evaluation of a Novel Nanoemulsion-Based Hepatitis B Mucosal Vaccine", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, EE.UU., vol. 3, n.º 8, 1 de agosto de 2008, páginas E2954.1-E2954.15], documento WO-A-2004/030608 y Bielinska y col., 2008 [ANNA U BIELINSKA ET AL: "A Novel, Killed-Virus Nasal Vaccinia Virus Vaccine" CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, EE.UU., vol. 15, n.º 2, 1 de febrero de 2008, páginas 348-358]. Como nota al margen, el documento WO-A-2009/143524 y Dennis y col., 2007 [DENNIS M. LINDELL Y COL: "A Novel Inactivated Intranasal Respiratory Syncytial Virus Vaccine Promotes Viral Clearance without Th2 Associated Vaccine-Enhanced Disease", PLOS ONE, vol. 6, n.º 7, 15 julio de 2011, página e21823], que puede considerarse como una divulgación antecedente con respecto a la teoría o principio sobre la que subyace la invención, se ha publicado después la fecha de presentación de la presente solicitud y por tanto no se puede citar como técnica anterior de la novedosa etapa inventiva de la presente invención.

El hecho de que la composición de nanoemulsión reivindicada, como se divulga en la presente solicitud, sea suficiente para inactivar el VSR no era algo esperado. Partiendo de Meyer y col., 2008 Becker, 2006, como la técnica anterior más próxima, la persona experta enfrentada con el problema técnico objetivo "suministro de una composición de VSR inmunógena mejorada adecuada para su uso como vacuna segura" no anticiparía que la inactivación del VSR podría conseguirse con la propia nanoemulsión, sino que en su lugar inactivaría el virus de antemano.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. En detalle: la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un virus sincicial respiratorio inactivado con una nanoemulsión (VSR). En una realización preferida de la invención, la nanoemulsión de dicha composición inmunógena puede utilizarse para inactivar el virus sincicial respiratorio (VSR) y comprende una fase acuosa, una fase oleosa, y un disolvente. En realizaciones preferidas adicionales, dicha nanoemulsión utilizada para inactivar el virus sincicial respiratorio (VSR) comprende a) aproximadamente 5 % en vol. de TWEEN 80, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente 64 % en vol. de aceite, y

aproximadamente 22 % en vol. de agua, o b) aproximadamente un 5 % en vol. de TWEEN 20, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente 64 % en vol. de aceite, y aproximadamente 22 % en vol. de agua. La composición inmunógena que se ha mencionado anteriormente puede comprender 1,0 % - 10 %, 5 % - 15 %, 10 % - 20 %, 20 % - 30 %, 30 % - 40 %, 40 % - 50 %, o 50 % - 60 % de una solución en nanoemulsión. Adicionalmente, dicha composición inmunógena puede comprender entre 10 y 10¹⁰ unidades formadoras de placas (UFP) de virus sincicial respiratorio inactivado, por ejemplo, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ o 10⁹ unidades formadoras de placas (UFP) de virus sincicial respiratorio inactivado. En una realización preferida de la invención, dicha composición inmunógena es térmicamente estable. La composición inmunógena de la invención puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable. Además, puede incluirse un adyuvante en dicha composición inmunógena. La composición inmunógena anterior puede comprender una vacuna, y dicha vacuna podría formularse para su administración a una superficie mucosal. La composición inmunógena que se ha descrito anteriormente puede ser para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección por el virus sincicial respiratorio.

Por razones de precisión, se proporcionan a continuación algunos ejemplos adicionales. En algunos casos, la nanoemulsión es W₈₀5EC. La composición puede comprender una solución en nanoemulsión al 1-50 %, aunque encuentran también uso cantidades mayores y menores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 1,0 % - 10 %, aproximadamente 10 %-20 %, aproximadamente 20 %-30 %, aproximadamente 30 %-40 %, aproximadamente 40 %-50 %, aproximadamente 50 %-60 % o más de una solución en nanoemulsión como se ha mencionado ya anteriormente. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 10 % de una solución en nanoemulsión. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 15 % de una solución en nanoemulsión. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 20 % de una solución en nanoemulsión. La composición inmunógena puede comprender aproximadamente 12 % de una solución en nanoemulsión. La composición inmunógena puede comprender aproximadamente 8 % de una solución en nanoemulsión. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 5 % de una solución en nanoemulsión. La composición inmunógena puede comprender aproximadamente 2 % de una solución en nanoemulsión. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende aproximadamente 1 % de una solución en nanoemulsión. En algunas realizaciones, una composición inmunógena como se define en las reivindicaciones comprende 2x10⁶ unidades formadoras de placas (UFP) de virus patógeno inactivado VSR t, aunque se puede utilizar más, por ejemplo, aproximadamente 4x10⁶ UFP, 8x10⁶ UFP, 1x10⁷ UFP, 2x10⁷ UFP, 4x10⁷ UFP, 8x10⁷ UFP, 1x10⁸ UFP, 1x10⁹ UFP, o más UFP de VSR inactivado mediante nanoemulsión, y menos, por ejemplo, aproximadamente 1x10⁶ UFP, 5x10⁵ UFP, 1x10⁵ UFP, 5x10⁴ UFP, 1x10⁴ UFP, 5x10³ UFP, 1x10³ UFP o menos UFP de virus del VSR inactivado mediante cantidades en nanoemulsión. En algunas realizaciones, la composición es estable (por ejemplo, a temperatura ambiente (por ejemplo, durante 12 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, 9 meses, un año o más). En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende un transportador farmacéuticamente aceptable. La presente invención no se limita a ningún transportador farmacéuticamente aceptable concreto. De hecho, se puede utilizar cualquier transportador adecuado incluyendo, pero sin limitación, los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición inmunógena comprende además un adyuvante. La presente invención no se limita a ningún adyuvante concreto, y uno cualquiera o más adyuvantes descritos en el presente documento son de utilidad en la composición de la invención incluyendo, pero no de forma limitativa, los adyuvantes orientados hacia una respuesta inmunitaria Th1. La superficie mucosal a la que se va a dirigir la vacuna como se define en la reivindicación 11 puede comprender la mucosa nasal. La composición inmunógena que se define en las reivindicaciones puede estimular una respuesta inmunitaria y puede inducir la inmunidad al VSR en el sujeto. Dicha inmunidad puede comprender la inmunidad sistémica. Dicha inmunidad puede comprender la inmunidad mucosal. La respuesta inmunitaria puede comprender un aumento de la expresión de IFN-γ en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender un aumento de la expresión de IL-17 en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender la ausencia de un aumento de la expresión de las citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5 y IL-13). La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta sistémica de la IgG al virus inactivado de la familia *paramyxoviridae* (VSR). La inmunidad puede proteger al sujeto de mostrar signos o síntomas de la enfermedad producida por el virus de la familia *paramyxoviridae* VSR. La inmunidad puede proteger al sujeto del estímulo con una posterior exposición al virus vivo de la familia *paramyxoviridae* VSR. El sujeto puede ser un ser humano.

Se describen en el presente documento una variedad de composiciones en nanoemulsión como se definen en las reivindicaciones. Se contempla una variedad de aceites que forman parte de la nanoemulsión como se define en las reivindicaciones, que incluyen, pero no de forma limitativa, soja, aguacate, escualeno, oliva, canola, maíz, semilla de colza, cártamo, girasol, pescado, el aroma, y vitaminas insolubles en agua. Los disolventes pueden ser de utilidad como se define en la reivindicación 2, que incluyen, pero no de forma limitativa, un alcohol (por ejemplo, que incluyen, pero no de forma limitativa, metanol, etanol, propanol, y octanol), glicerol, polietilenglicol, y un disolvente basado en fosfato orgánico. Los componentes de la nanoemulsión incluyen aceites, disolventes y otros que se describen con mayor detalle a continuación.

La emulsión puede comprender además CPC, como un compuesto catiónico que contiene halógeno que se define en la reivindicación 3.

La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. Los casos de la descripción que no se encuentran comprendidos en las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

Descripción de las figuras

5 Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva. La invención puede comprenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras combinadas con la descripción de los ejemplos específicos presentados en el presente documento.

La Figura 1 muestra la destrucción del virus sincicial respiratorio (VSR) por la nanoemulsión.

10 La Figura 2 muestra la inducción de anticuerpos específicos de VSR tras la inmunización con VSR inactivado por la nanoemulsión (NE-VSR).

La Figura 3 muestra que la administración de NE-VSR a sujetos da como resultado respuestas potenciadas de linfocitos T CD8 específicas de VSR.

La Figura 4 muestra que la administración de NE-VSR a sujetos potencia las citoquinas antivíricas en fluido BAL procedente de las vías aéreas de ratones estimulados con VSR.

15 La Figura 5 muestra que la vacunación de ratones con NE-VSR potencia la producción de IL-17 en los pulmones tras el estímulo con la línea de VSR.

La Figura 6 muestra que la administración de NE-VSR a sujetos proporciona un aclaramiento mejorado e induce una respuesta protectora tras el posterior estímulo del virus vivo.

20 La Figura 7 muestra la expresión de varios genes en ratones a los que se ha administrado NE-VSR frente a los controles.

La Figura 8 muestra la tinción periódica de ácido de Schiff (PAS) de secciones histológicas de pulmón en ratones a los que se ha administrado NE-VSR frente a los controles.

La Figura 9 muestra la expresión de citoquinas en ratones a los que se ha administrado NE-VSR frente a los controles.

25 La Figura 10 muestra que se generaron sistémicamente respuestas de anticuerpos específicas de VSR significativas en ratones tras la vacunación con NE-VSR (A) e Ig total en fluido de lavado broncoalveolar de ratones vacunados en el día 2 después de estímulo con virus vivo.

Descripción general de la invención

30 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y en la anterior sección "SUMARIO DE LA INVENCION". Los ejemplos de la descripción que no se encuentran comprendidos en las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. La presente divulgación proporciona composiciones para la estimulación de respuestas inmunitarias. Específicamente, la presente divulgación proporciona composiciones inmunógenas que inducen respuestas inmunitarias (por ejemplo, inmunidad (por ejemplo, inmunidad protectora)) contra el virus sincicial respiratorio. Las composiciones de la presente invención son de utilidad en, entre
35 otras cosas, aplicaciones clínicas (por ejemplo, terapéuticas y de medicina preventiva (por ejemplo, de vacunación)) así como aplicaciones de investigación.

40 El tratamiento con NE preserva probablemente importantes epítopos antigénicos (por ejemplo, que puede reconocer el sistema inmunitario de un sujeto) del virus (por ejemplo, neutralizando y/o erradicando simultáneamente a la vez la infectividad potencial del virus), estabilizando sus componentes hidrófobos e hidrófilos en la interfase aceite / agua de la emulsión (por ejemplo, proporcionando por tanto uno o más inmunógenos (por ejemplo, antígenos estabilizados) contra los cuales un sujeto puede establecer una respuesta inmunitaria). Se observa que, como las formulaciones de NE penetran en la mucosa a través de los poros, pueden transportar inmunógenos a la localización submucosal de las células dendríticas (por ejemplo, iniciando y/o estimulando de esta forma una respuesta
45 inmunitaria). La combinación de NE y VSR parece estabilizar los inmunógenos víricos y proporciona un material inmunológico adecuado para la generación de una respuesta inmunitaria.

50 Las células dendríticas fagocitan con avidez las gotículas de aceite de la nanoemulsión (NE) y esto proporcionaría un medio para internalizar los inmunógenos víricos (por ejemplo, proteínas antigénicas o fragmentos peptídicos de las mismas generados tras la inactivación del VSR con una nanoemulsión para la presentación del antígeno. Mientras que otras vacunas se basan en las toxinas inflamatorias u otros estímulos inmunitarios para la actividad adyuvante (Véase, por ejemplo, Holmgren y Czerkinsky, Nature Med. 2005, 11; 45-53), no se ha mostrado que las NE sea inflamatorias cuando se colocan sobre la piel o las membranas mucosas en estudios en animales y en seres humanos. De esta manera, una composición que comprende una NE de la presente invención puede actuar como un adyuvante "físico" (por ejemplo, que transporta y/o presenta composiciones inmunógenas (por ejemplo, péptidos y/o antígenos de un virus de la familia *paramyxoviridae*) al sistema inmunitario. La administración mucosal de una
55 composición de la presente invención puede generar inmunidad mucosal (por ejemplo, signos de inmunidad mucosal (por ejemplo, generación de títulos de anticuerpos de IgA)) así como inmunidad sistémica.

La inmunidad celular y la humoral juegan un papel en la protección frente a múltiples patógenos y ambas se pueden inducir con las formulaciones de NE de la presente invención. La administración (por ejemplo, administración mucosal) de una composición de la presente invención (NE-inactivación del VSR) a un sujeto puede dar como

resultado la inducción de respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, desarrollo de anticuerpos específicos) y celulares (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) contra el VSR. Se usa una composición de la presente invención, como se define en las reivindicaciones (VSR inactivado con NE) como vacuna, como se define en la reivindicación 10.

- 5 Una composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones puede inducir (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto) inmunidad sistémica y mucosal. De esta manera, la administración de una composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones a un sujeto puede dar como resultado protección frente a una exposición (por ejemplo, una exposición mucosal letal) a VSR. La administración mucosal (por ejemplo, la vacunación) puede proporcionar protección contra una infección vírica (por ejemplo, que se inicia en una superficie mucosal). Aunque hasta ahora se ha demostrado difícil estimular respuestas de IgA secretoras y protección contra patógenos que invaden las superficies mucosales (véase, por ejemplo, Mestecky y col, *Mucosal Immunology*. 3ª ed. (Academic Press, San Diego, 2005)), la presente invención proporciona composiciones para estimular la inmunidad mucosal (por ejemplo, una respuesta de IgA protectora) frente a VSR.

DEFINICIONES

- 15 Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen a continuación varios términos y frases:

Tal como se usa en el presente documento, el término "microorganismo" se refiere a cualquier especie o tipo de microorganismo, incluyendo pero sin limitación, bacterias, virus, archaea, hongos, protozoarios, micoplasmas, priones, y organismos parásitos. El término microorganismo abarca aquellos organismos que son en sí mismos patógenos para otros organismos (por ejemplo, animales, incluyendo seres humanos, y plantas) y aquellos organismos que producen agentes que son patógenos para otros organismos, aunque el propio organismo no sea directamente patógeno o infectivo para el otro organismo.

20 Como se usa en el presente documento, el término "patógeno", y equivalentes gramaticales, se refiere a un organismo (por ejemplo, agente biológico), incluyendo microorganismos, que produce una patología (por ejemplo, infección, dolencia patológica, enfermedad, etc.) en otro organismo (por ejemplo, animales y vegetales) infectando directamente al otro organismo, o produciendo agentes que dan lugar a enfermedades en otros organismos (por ejemplo, bacterias que producen toxinas patógenas y similares). "Patógenos" incluyen, pero no de forma limitativa, virus, bacterias, archaea, hongos, protozoarios, micoplasmas, priones, y organismos parásitos.

30 Los términos "bacterias" y "bacteria" se refieren a todos los organismos procariotas, incluyendo aquellos comprendidos en todos los filum del Reino Procaryotae. Se pretende que el término abarque todos los microorganismos considerados como bacterias incluyendo *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, y *Rickettsia*. Se incluyen en esta definición todas las formas de bacterias incluyendo los cocos, bacilos, espiroquetas, esferoplastos, protoplastos, etc.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "hongos" se usa en referencia a organismos eucariotas tales como mohos y levaduras, incluyendo hongos dimórficos.

40 Como se usa en el presente documento los términos "enfermedad" y "dolencia patológica" se usan de manera indistinta, salvo que se indique otra cosa en el presente documento, para describir una desviación de la dolencia con respecto a los miembros normales o en promedio de una especie o grupo (por ejemplo, seres humanos), y que sea perjudicial para un individuo afectado en condiciones que no sean adversas para la mayoría de individuos de la especie o grupo. Dicha desviación puede manifestarse como un estado, signos, y/o síntomas (por ejemplo, diarrea, náuseas, fiebre, dolor, ampollas, forúnculos, prurito, inmunosupresión, inflamación, etc.) que están asociadas con cualquier deterioro del estado normal de un sujeto o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el comportamiento de las funciones normales. Una enfermedad o dolencia patológica puede estar producida por o ser el resultado del contacto con un microorganismo (por ejemplo, un patógeno u otro agente infectivo (por ejemplo, virus o bacterias)), puede ser sensible a factores ambientales (por ejemplo, desnutrición, riesgos industriales, y/o clima), puede ser sensible a un defecto inherente del organismo (por ejemplo, anomalías genéticas) o a combinaciones de estos y otros factores.

50 Los términos "hospedador" o "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refieren a un individuo que se va a tratar mediante (por ejemplo, que va a recibir) las composiciones de la presente invención. Los sujetos incluyen, pero no de forma limitativa, mamíferos (por ejemplo, murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, canes, felinos, y similares), y lo más preferentemente incluye seres humanos. En el contexto de la invención, el término "sujeto" se refiere en general a un individuo al que se administrará o al que se ha administrado una o más composiciones de la presente invención (por ejemplo, una composición para inducir una respuesta inmunitaria).

55 Tal como se usa en el presente documento, los términos "inactivar", "inactivación" y sus equivalentes gramaticales, cuando se usan en referencia a un microorganismo (por ejemplo, un patógeno (por ejemplo, un virus)), se refiere a la destrucción, eliminación, neutralización y/o reducción de la capacidad del microorganismo (por ejemplo, un patógeno (por ejemplo, un virus)) de infectar y/o producir una respuesta patológica y/o una enfermedad en un hospedador. Por ejemplo, la presente invención proporciona una composición que comprende un virus sincicial respiratorio (VSR)

5 inactivado con una nanoemulsión (NE), como se define en la reivindicación 1. De acuerdo con ello, tal como se cita en el presente documento, las composiciones que comprenden "VSR inactivado con NE", "VSR destruido con NE", "VSR neutralizado con NE", "NE-VSR" o sus equivalentes gramaticales que se refieren a las composiciones que, cuando se administran a un sujeto, se caracterizan por la ausencia de, o la presencia significativamente reducida de, replicación de VSR (por ejemplo, durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante un periodo de días, semanas, meses, o más)) en el hospedador.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "fusigénico" se refiera a una emulsión que es capaz de fusionarse con la membrana de un agente microbiano (por ejemplo, una bacteria, espora bacteriana o cápsida vírica). Se describen en el presente documentos ejemplos específicos de emulsiones fusigénicas.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "lisogénico" se refiere a una emulsión (por ejemplo, una nanoemulsión) que es capaz de perturbar la membrana de un agente microbiano (por ejemplo, un virus (por ejemplo, una envoltura vírica) o una bacteria o espora bacteriana). La presencia de un agente lisogénico y un agente fusigénico en la misma composición puede producir un efecto potenciado inactivante en comparación con cualquier agente en solitario. Se describen en detalle en el presente documento las composiciones (por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, usada como vacuna) utilizando esta composición antimicrobiana.

15 El término "emulsión" tal como se usa en el presente documento, incluye dispersiones o gotículas clásicas de aceite en agua o de agua en aceite, así como otras estructuras lipídicas que se pueden formar como resultado de las fuerzas hidrófobas que impulsan los restos apolares (por ejemplo, cadenas largas de hidrocarburos) lejos del agua y que impulsan los grupos de cabeza polares hacia el agua, cuando una fase oleosa inmiscible en agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, pero no de forma limitativa, vesículas lipídicas unilamelares, paucilamelares, y multilamelares, micelas, y fases lamelares. De manera similar, el término "nanoemulsión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a dispersiones de aceite en agua que comprenden estructuras lipídicas pequeñas. Por ejemplo, las nanoemulsiones pueden comprender una fase oleosa que tiene gotículas con un tamaño de partículas promedio de aproximadamente 0,1 a 5 micrómetros (por ejemplo, 20 150 +/-25 nm de diámetro), aunque se contemplan tamaños de partículas más pequeños y más grandes. Los términos "emulsión" y "nanoemulsión" se usan a menudo en el presente documento, de manera indistinta, para referirse a las nanoemulsiones de la presente invención.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos "contacto", "puesto en contacto", "exponer" y "expuesto", cuando se usan en referencia a una nanoemulsión y un microorganismo vivo, se refieren a poner una o más nanoemulsiones en contacto con un microorganismo (por ejemplo, un patógeno) de tal manera que la nanoemulsión inactiva el microorganismo o el agente patógeno, si está presente. Se describen en presente documento y en otros lugares una variedad de nanoemulsiones (por ejemplo, las nanoemulsiones descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos 20020045667 y 20040043041, y las patentes de Estados Unidos números 6.015.832, 6.506.803, 6.635.676, y 6.559.189). Las relaciones y cantidades de nanoemulsión (por ejemplo, suficientes para inactivar el microorganismo (por ejemplo, la inactivación del virus)) y los microorganismos (por ejemplo, suficientes para proporcionar una composición antigénica (por ejemplo, una composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria)) se describen en el presente documento.

30 El término "tensioactivo" se refiere a cualquier molécula que tiene un grupo de cabeza polar, que energéticamente prefiere la solvatación en agua, y una cola hidrófoba que no se solvata bien en agua. El término "tensioactivo catiónico" se refiere a un tensioactivo con un grupo de cabeza catiónico. El término "tensioactivo aniónico" se refiere a un tensioactivo con un grupo de cabeza aniónico.

35 Los términos "número del índice del balance hidrófilo-lipófilo" y "número del índice HLB" se refieren a un índice que correlaciona la estructura química de las moléculas tensioactivas con su actividad superficial. El número del índice HLB puede calcularse mediante una variedad de fórmulas empíricas como se describe, por ejemplo, en Meyers, (Véase, por ejemplo, Meyers, Surfactant Science and Technology, VCH Publishers Inc., Nueva York, pp. 231-245 (1992)). Como se usa en el presente documento cuando resulta adecuado, el número del índice del HLB de un tensioactivo es el número del índice HLB asignado al dicho tensioactivo en la obra de McCutcheon, Volumen 1: Emulsifiers and Detergents North American Edition, 1996. el número del índice HLB varía de 0 a aproximadamente 70 o más para los tensioactivos comerciales. Los tensioactivos hidrófilos con elevada solubilidad en agua y propiedades solubilizantes están en el extremo superior de la escala, mientras que los tensioactivos con baja solubilidad en agua que son buenos solubilizantes del agua en aceites están en el extremo inferior de la escala.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "potenciadores de la interacción" se refiere a compuestos que actúan para potenciar la interacción de una emulsión con un microorganismo (por ejemplo, con una pared celular de una bacteria (por ejemplo, una bacteria Gram negativa) o con una envoltura vírica. Los potenciadores de la interacción contemplados incluyen, pero no de forma limitativa, agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenbis(oxietilnonitrilo)tetraacético (EGTA), y similares) y determinados agentes biológicos (por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) y similares).

45 Los términos "tampón" o "agentes tamponantes" se refieren a materiales que, cuando se añaden a una solución, dan lugar a que la solución resista los cambios en el pH.

Los términos "agente reductor" y "donante de electrones" se refieren a un material que dona electrones a un segundo material para reducir el estado de oxidación de uno o más de los átomos del segundo material.

El término "sal monovalente" se refiere a cualquier sal en la que el metal (*por ejemplo*, Na, K, o Li) tiene una carga neta 1+ en solución (es decir, un protón más que el electrón).

- 5 El término "sal divalente" se refiere a cualquier sal en la que un metal (*por ejemplo*, Mg, Ca, o Sr) tiene una carga neta 2+ en solución.

Los términos "quelador" o "agente quelante" se refieren a cualquier material que tiene más de un átomo con un par solitario de electrones que están disponibles para unirse a un ion metálico.

El término "solución" se refiere a una mezcla acuosa o no acuosa.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, los términos "una composición para inducir una respuesta inmunitaria", "composición inmunógena" o los equivalentes gramaticales se refieren a una composición que, una vez administrada a un sujeto (*por ejemplo*, una vez, dos veces, tres veces o más (*por ejemplo*, con una separación de semanas, meses o años)), estimula, genera y/o desencadena una respuesta inmunitaria en el sujeto (*por ejemplo*, dando como resultado una inmunidad total o parcial a un microorganismo (*por ejemplo*, patógeno) capaz de producir una enfermedad). La composición puede comprender una nanoemulsión y un inmunógeno, y puede comprender además uno o más compuestos o agentes diferentes incluyendo, pero no de forma limitativa, agentes terapéuticos, líquidos fisiológicamente tolerables, geles, transportadores, diluyentes, adyuvantes, excipientes, salicatos, esteroides, inmunosupresores, inmunoestimulantes, anticuerpos, citoquinas, antibióticos, aglutinantes, cargas, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, y/o tampones. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria innata (*por ejemplo*, una respuesta inmunitaria no específica) o una respuesta inmunitaria aprendida (*por ejemplo*, adquirida) (*por ejemplo*, que disminuye la infectividad, morbilidad, o el inicio de la mortalidad en un sujeto (*por ejemplo*, producido por la exposición a un microorganismo patógeno) o que evita la infectividad, morbilidad, o el inicio de la mortalidad en un sujeto (*por ejemplo*, producido por la exposición a un microorganismo patógeno)). De esta manera, una composición que comprende una nanoemulsión y un inmunógeno se pueden administrar a un sujeto como vacuna (*por ejemplo*, para prevenir o atenuar una enfermedad (*por ejemplo*, proporcionando al sujeto inmunidad total o parcial frente a la enfermedad o la atenuación total o parcial (*por ejemplo*, la supresión) de un signo, síntoma o dolencia de la enfermedad).

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que puede estimular una respuesta inmunitaria (*por ejemplo*, una respuesta inmunitaria mucosal). Algunos adyuvantes pueden producir la activación de una célula del sistema inmunitario (*por ejemplo*, un adyuvante puede dar lugar a que una célula inmunitaria produzca y secrete una citoquina). Los ejemplos de adyuvantes que pueden dar lugar a la activación de una célula del sistema inmunitario incluyen, pero no de forma limitativa, saponinas purificadas procedentes de la corteza del árbol Q. saponaria, tales como QS21 (un glucolípido que eluye en el pico 21° con fraccionamiento mediante HPLC; Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass.); poli(di(carboxilatofenoxi)fosfaceno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE.UU.); derivados de lipopolisacáridos tales como monofosforil lípido A (MPL; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.), dipéptido de muramilo (MDP; Ribi) y dipéptido de treonil-muramilo (t-MDP; Ribi); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con el lípido A; OM Pharma SA, Meyrin, Suiza); y el factor de alargamiento de Leishmania (una proteína purificada de Leishmania; Corixa Corporation, Seattle, Wash.). Se conocen bien en la técnica los adyuvantes tradicionales e incluyen, *por ejemplo*, fosfato de aluminio o sales de hidróxido ("alum"). Las composiciones de la presente invención que comprenden VSR inactivado con una nanoemulsión como se define en las reivindicaciones pueden administrarse con uno o más adyuvantes (*por ejemplo*, para desviar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2).

- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria" (*por ejemplo*, de una composición para inducir una respuesta inmunitaria), se refiere al nivel de dosificación requerido (*por ejemplo*, cuando se administra a un sujeto) para estimular, generar y/o desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones (*por ejemplo*, mediante la misma o diferente ruta), aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o ruta de administración concreta.

- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término "en condiciones tales que dicho sujeto genera una respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier inducción, generación, y/o estimulación de una respuesta inmunitaria cualitativa o cuantitativa (*por ejemplo*, innata o adquirida).

- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta del sistema inmunitario de un sujeto. *Por ejemplo*, las respuestas inmunitarias incluyen, pero no de forma limitativa, una alteración detectable (*por ejemplo*, un aumento) en la activación del receptor Toll, la expresión y/o la secreción de linfoquinas (*por ejemplo*, la expresión y/o expresión de citoquinas (*por ejemplo*, citoquinas de tipo Th1 o Th2) o quimioquinas), activación de macrófagos, activación de células dendríticas, activación de linfocitos T (*por ejemplo*, linfocitos T CD4+ o CD8+), activación de linfocitos NK, y/o activación de linfocitos B (*por ejemplo*, generación y/o

secreción de anticuerpos). Los ejemplos adicionales de respuestas inmunitarias incluyen la unión de un inmunógeno (por ejemplo, un antígeno (por ejemplo, un polipéptido inmunógeno)) a una molécula MHC y la inducción de una respuesta de los linfocitos T citotóxicos ("LTC"), inducción de una respuesta de los linfocitos B (por ejemplo, la producción de anticuerpos), y/o una respuesta de los linfocitos T auxiliares, y/o una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) frente al antígeno del cual se deriva el polipéptido inmunógeno, la expansión (por ejemplo, el crecimiento de una población de células) de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B (por ejemplo, de cualquier etapa de desarrollo (por ejemplo, células plasmáticas), y un aumento del procesamiento y la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos. Una respuesta inmunitaria puede ser contra inmunógenos que el sistema inmunitario del sujeto reconoce como extraños (por ejemplo, no a los autoantígenos procedentes de microorganismos (por ejemplo, patógenos), o autoantígenos reconocidos como extraños). De esta manera, debe entenderse que, tal como se usa en el presente documento, "respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier tipo de respuesta inmunitaria, que incluye, pero no de forma limitativa, respuestas inmunitarias innatas (por ejemplo, la cascada de señalización del receptor Toll), respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, respuestas mediadas por linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T específicos de antígenos) y células no específicas del sistema inmunitario) y respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, respuestas mediadas por linfocitos B (por ejemplo, mediante la generación y secreción de anticuerpos en el plasma, linfa, y/o fluidos tisulares). Se entiende que el término "respuesta inmunitaria" abarca todos los aspectos de la capacidad del sistema inmunitario de un sujeto para responder a antígenos y/o inmunógenos (por ejemplo, la respuesta inicial a un inmunógeno (por ejemplo, un patógeno) así como las respuestas adquiridas (por ejemplo, la memoria) que son el resultado de una respuesta inmunitaria adaptativa).

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunidad" se refiere a la protección contra la enfermedad (por ejemplo, la prevención o atenuación (por ejemplo, la supresión) de un signo, síntoma o dolencia de la enfermedad) tras su exposición a un microorganismo (por ejemplo, patógeno) capaz de producir la enfermedad. La inmunidad puede ser innata (por ejemplo, respuestas inmunitarias no adaptativas (por ejemplo, no adquiridas) que existen en ausencia de una exposición previa a un antígeno) y o adquiridas (por ejemplo, respuestas inmunitarias que están mediadas por linfocitos B y T tras una exposición previa a un antígeno (por ejemplo, que presentan una especificidad y reactividad aumentadas al antígeno)).

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a un agente (por ejemplo, un microorganismo (por ejemplo, una bacteria, virus u hongo) y una parte o componente del mismo (por ejemplo, una proteína antigénica)) que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. Los inmunógenos pueden estimular la inmunidad frente al inmunógeno (por ejemplo, un microorganismo (por ejemplo, un patógeno o un producto patógeno)) cuando se administra en combinación con una nanoemulsión.

Tal como se usa en el presente documento, el término "producto patógeno" se refiere a cualquier componente o producto derivado de un patógeno, incluyendo, pero no de forma limitativa, polipéptidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fracciones de membranas, y polisacáridos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunidad potenciada" se refiere a un aumento en el nivel de la inmunidad adaptativa y/o adquirida en un sujeto hacia un inmunógeno dado (por ejemplo, un microorganismo (por ejemplo, patógeno)) tras la administración de una composición relativa al nivel de inmunidad adaptativa y/o adquirida en un sujeto al que no se ha administrado la composición.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "purificado" o "para purificar" se refieren a la eliminación de contaminantes o compuestos indeseados de una muestra o composición. Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente purificado" se refiere a la eliminación de entre aproximadamente 70 a 90 %, hasta el 100 %, de los contaminantes o compuestos indeseados de una muestra o composición.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de proporcionar una composición a un sujeto. Las rutas de administración ilustrativas hacia el cuerpo humano incluyen, pero no de forma limitativa, a través de los ojos (oftálmica), la boca (oral), la piel (transdérmica), la nariz (nasal), los pulmones (mediante inhalación), la mucosa oral (bucal), los oídos, rectal, mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, etc.), tópica, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "coadministración" y "coadministrar" se refieren a la administración de al menos dos agente(s) o tratamientos a un sujeto. La coadministración de dos o más agentes o tratamientos puede ser simultánea, o un primer agente/tratamiento se administra antes de un segundo agente/tratamiento. La coadministración puede ser mediante la misma o diferente ruta de administración. Los expertos en la materia entienden que las formulaciones y/o rutas de administración de los diversos agentes o tratamientos pueden variar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosificación adecuada para la coadministración. Cuando se coadministran agentes o tratamientos, los agentes o tratamientos respectivos pueden administrarse a dosificaciones más bajas que las adecuadas para su administración en solitario. De esta manera, la coadministración es especialmente deseable cuando la coadministración de los agentes o los tratamientos disminuyen la dosificación requerida de un agente(s) potencialmente perjudicial (por ejemplo, tóxico), y/o cuando la coadministración de dos o más agentes da como resultado la sensibilización de un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes mediante la coadministración del otro agente. La coadministración puede ser preferible para

estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto a dos o más inmunógenos diferentes (por ejemplo, microorganismos (por ejemplo, patógenos)) en o prácticamente al mismo tiempo (por ejemplo, cuando es improbable que un sujeto esté disponible para una posterior administración de una segunda, tercera, o composición adicional para inducir una respuesta inmunitaria).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "tópicamente" se refiere a la aplicación de composiciones de la presente invención como se definen en las reivindicaciones a la superficie de la piel y/o a las células y tejidos mucosales (por ejemplo, mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatorio vaginal o nasal, y otros tejidos y células que revisten órganos huecos o cavidades corporales).

- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar también en la forma de emulsiones tópicas, composiciones inyectables, soluciones ingeribles, y similares. Por razones de precisión, se ha señalado que dicha administración no está cubierta por la invención como se define en las reivindicaciones. Cuando la ruta es tópica, la forma puede ser, por ejemplo, un pulverizador (por ejemplo, un pulverizador nasal), una crema, u otra solución viscosa (por ejemplo, una composición que comprende una nanoemulsión y un inmunógeno en polietilenglicol).

- 15 Los términos "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" tal como se usan en el presente documento, se refieren a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas (por ejemplo, reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas) cuando se administran a un sujeto.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los transportadores farmacéuticos normalizados incluyendo, pero no de forma limitativa, solución salina tamponada con fosfato, agua, y varios tipos de agentes mojanos (por ejemplo, lauril sulfato sódico), todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, laurilsulfato de sodio, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sodio), polietilenglicol, y similares. Las composiciones pueden incluir también estabilizantes y conservantes. Se han descrito ejemplos de transportadores, estabilizantes y adyuvantes y se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed, Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975)).

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal (por ejemplo, obtenida mediante reacción con un ácido o una base) de una composición que es fisiológicamente tolerada en el sujeto diana. Las "sales" de las composiciones pueden derivarse de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos incluyen, pero no de forma limitativa, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, p-toluenosulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, y similares. Pueden emplearse otros ácidos, tales como el ácido oxálico, aunque no sean por sí mismos farmacéuticamente aceptables, en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de las composiciones y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

- 35 Los ejemplos de bases incluyen, pero no de forma limitativa, hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amoníaco, y compuestos de fórmula NW^+ , en los que W es alquilo C, y similares.

- 40 Los ejemplos de las sales incluyen, pero no de forma limitativa: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato, y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos constituidos con un catión adecuado tales como Na^+ , NH_4^+ , y NW_4^+ (en el que W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares. Para el uso terapéutico, se contemplan las sales de los compuestos que son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, pueden también ser de utilidad las sales de ácidos y bases que no sean farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

- 50 Para el uso terapéutico, se contemplan las sales de las composiciones que son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, pueden también ser de utilidad las sales de ácidos y bases que no sean farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en la preparación o purificación de una composición farmacéuticamente aceptable.

- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto que está predispuesto a experimentar una enfermedad concreta. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética concreta a experimentar la enfermedad, tal como trastornos heredables), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, las condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el ambiente, etc.).

"Aplicación nasal", tal como se usa en el presente documento, significa aplicada a través de la nariz en los pasos nasales o sinusales o en ambos. La aplicación puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante gotas, pulverizadores,

nebulizaciones, revestimientos o sus mezclas aplicadas en los pasos nasales y sinusales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de administración para administrar materiales. En el contexto de los agentes inmunógenos (por ejemplo, las composiciones que comprenden una nanoemulsión y un inmunógeno), dichos sistemas de administración incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, el transporte, o la administración de agentes inmunógenos y/o materiales de soporte (por ejemplo, instrucciones escritas para utilizar los materiales, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más cerramientos (por ejemplo, cajas) que contienen los agentes inmunógenos relevantes (por ejemplo, nanoemulsiones) y/o los materiales de soporte. Tal como se usa en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a sistemas de administración que comprenden dos o más recipientes separados, que contienen cada uno una subporción de los componentes totales del kit. Los envases pueden administrarse al receptor previsto juntos o separados. Por ejemplo, un primer envase puede contener una composición que comprende una nanoemulsión y un inmunógeno para un uso concreto, a la vez que un segundo envase contiene un segundo agente (por ejemplo, un antibiótico o un aplicador para pulverización). De hecho, cualquier sistema de administración que comprende dos o más envases separados que contienen cada uno una subporción de los componentes totales del kit se incluye en el término "kit fragmentado". Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de administración que contiene todos los componentes de un agente inmunógeno necesarios para un uso concreto en un único envase (por ejemplo, en una caja única que contiene todos los componentes deseados). El término "kit" incluye kits fragmentados y combinados.

Descripción detallada de la invención

El virus sincicial respiratorio (VSR) infecta a casi todos los bebés de 2 años de edad y es la causa principal de la bronquiolitis en niños en todo el mundo. Los CDC estiman que hasta 125.000 hospitalizaciones pediátricas en los Estados Unidos cada año se deben al VSR, con un coste anual de más de 300 millones de dólares (1). A pesar de la generación de respuestas inmunitarias adaptativas específicas de VSR, el VSR no confiere inmunidad protectora y son comunes las infecciones recurrentes a lo largo de la vida (2, 3). Aunque el VSR es especialmente perjudicial en muchos lactantes cuyas vías aéreas son pequeñas y se ocluyen fácilmente, VSR se ha reconocido también como un importante patógeno en receptores de trasplantes, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), personas mayores, así como otros pacientes con enfermedad pulmonar crónica, especialmente asma. Datos recientes sugieren que la mortalidad combinada de todas las edades ha sido aproximadamente de 30/100.000 desde 1990-2000, con una mortalidad promedio anual de más de 17.000 personas en los Estados Unidos (4, 5). Estas cifras están probablemente muy subestimadas, ya que no se han investigado a fondo en adultos de una manera consistente. De esta manera, el VSR no solo produce una enfermedad pulmonar significativamente exacerbada en jóvenes y personas mayores, sino que se asocia también con una cantidad significativa de mortalidad directa. Aunque están disponibles anticuerpos contra el VSR y parecen aliviar la enfermedad grave, solamente son útiles cuando se administran de forma profiláctica y existen pocas opciones para combatir las infecciones por VSR en poblaciones de pacientes susceptibles (6-10).

A finales de 1960 fracasaron los intentos de vacunar niños con una preparación de vacuna de VSR inactivada con formol precipitada con alum y produjeron exacerbaciones graves de la enfermedad tras infección con el virus VSR vivo. Las manifestaciones clínicas parecieron ser el resultado de una enfermedad Th2 potenciada, con producción de moco y eosinofilia que no se observó en niños no vacunados. Estos mismos síntomas pueden aparecer en subconjuntos de lactantes gravemente infectados.

Algunos estudios epidemiológicos vinculan respuestas graves del VSR con el desarrollo final de enfermedad hiperreactiva de las vías aéreas incluso años después que se haya resuelto la infección (3). Sigurs et. al., han encontrado lactantes con bronquiolitis debida a VSR que tuvieron un riesgo mayor de desarrollar asma y episodios de sibilancias a las edades de 1, 3 y 7 en comparación con los controles sanos (11-13). Se ha asociado también el VSR con exacerbaciones de asma y puede producir episodios prolongados de enfermedad (14). Un interesante estudio ha sugerido un vínculo causal debido a que el tratamiento de los lactantes que tenían enfermedad grave de VSR con globulina inmunitaria de VSR disminuyó significativamente su riesgo final en el desarrollo de asma infantil y disfunción pulmonar (15). Una característica clínicamente relevante de la enfermedad por VSR que puede predisponer a niños y adultos a enfermedad crónica es la incapacidad de adquirir inmunidad protectora debido a la respuesta inmunitaria alterada. Estudios más recientes han sugerido que poblaciones de pacientes con función pulmonar comprometida (especialmente pacientes con EPOC) están también en riesgo de complicaciones graves debido a la infección por VSR que es casi tan frecuente como la asociada con el virus de la gripe (16-20). Estas complicaciones podrían agravarse por el potencial del VSR de tener la capacidad de persistir durante largos periodos en el pulmón incluso después de haberse resuelto la enfermedad aguda. Se ha teorizado que esto está asociado con el desarrollo de un entorno inmunitario alterado que aclara menos eficazmente el virus. De esta manera, una vacuna eficaz que se pueda usar en niños y adultos tiene el potencial de una amplia aplicación a través de la población y puede proporcionar una protección significativa desde el inicio y la exacerbación de la enfermedad pulmonar crónica.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona composiciones de nanoemulsiones inmunógenas como se definen en las reivindicaciones y su uso para inducir respuestas inmunitarias (por ejemplo, inmunidad (por ejemplo, inmunidad protectora)) frente a VSR. Las composiciones de la presente invención como se definen en las

reivindicaciones son de utilidad en, entre otras cosas, aplicaciones clínicas (por ejemplo, terapéuticas y de medicina preventiva (por ejemplo, de vacunación)) así como aplicaciones de investigación. Las composiciones inmunógenas ilustrativas (por ejemplo, las composiciones de vacuna) se describen de manera más detallada a continuación.

5 La presente invención proporciona composiciones para inducir respuestas inmunitarias que comprenden una nanoemulsión y un virus sincitial respiratorio inactivado como se define en la reivindicación 1. La reivindicación 2 especifica nanoemulsiones concretas. De hecho, pueden ser de utilidad una variedad de nanoemulsiones, por ejemplo, las descritas en el presente documento y las descritas en otra parte (por ejemplo, las nanoemulsiones descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos 20020045667 y 20040043041, y las patentes de Estados Unidos números 6.015.832, 6.506.803, 6.635.676, y 6.559.189).

10 Los inmunógenos (virus sincitial respiratorio inactivado) y las nanoemulsiones que se definen en las reivindicaciones pueden combinarse en cualquier cantidad adecuada. Se puede utilizar cualquier formulación farmacéutica, que incluye, pero no de forma limitativa, las descritas en el presente documento. Se pueden someter a ensayo las formulaciones adecuadas para la inmunogenicidad usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se puede investigar la inmunogenicidad mediante la cuantificación de los títulos de anticuerpos y las respuestas específicas de los linfocitos T. Se pueden someter a ensayo también las composiciones en nanoemulsión con modelos animales de patologías infecciosas. Por razones de precisión debe señalarse que este aspecto no está incluido en la presente invención. Los modelos animales adecuados, patógenos, y ensayos de inmunogenicidad incluyen, pero no de forma limitativa, los descritos a continuación.

20 Las composiciones que se definen en las reivindicaciones pueden proporcionar el desarrollo de inmunidad contra VSR en un sujeto tras la administración mucosal (por ejemplo, vacunación mucosal) de una composición que comprende el VSR inactivado con una nanoemulsión (NE). Tal como se describe en los Ejemplos 1-2, la NE se mezcla con el VSR, dando como resultado una formulación (por ejemplo, composición de VSR inactivado con NE) que es estable a temperatura ambiente (por ejemplo, en algunas realizaciones, durante más de 2 semanas, más preferentemente más de 3 semanas, incluso de forma más preferente más de 4 semanas, y lo más preferente durante más de 5 semanas) y que se puede usar para inducir una respuesta inmunitaria frente a VSR en un sujeto (por ejemplo, que se puede usar tanto solo o como adyuvante para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra VSR).

30 La administración mucosal de una composición que comprende VSR inactivado con NE a un sujeto dio como resultado respuestas de anticuerpos con un título alto inmunidad celular específica de Th1 (Véase, por ejemplo, los ejemplos 1-4). Además, se protegieron los animales contra un posterior estímulo con VSR (Véase, por ejemplo, Ejemplo 4). Además, en agudo contraste con una preparación de vacuna de VSR inactivada con formol precipitada con alum (por ejemplo, descrita anteriormente), descrito anteriormente, el VSR inactivado con NE conduce a una sólida respuesta inmunitaria Th1 (por ejemplo, como se ha documentado por la expresión potenciada de la respuesta de IFN- γ e IL-17 (Véase, por ejemplo, Ejemplo 4) y no potencia y/o eleva la expresión de las citoquinas Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5 o IL-13) asociada con una respuesta de tipo Th2. Los ratones a los que se administró incluso una única dosis de una composición que comprendía VSR inactivado con NE desarrollaron concentraciones en suero de IgG dirigida contra VSR 4 semanas después de la administración que continuó aumentando a 8 semanas después de la administración y que se elevó significativamente tras una administración de refuerzo (Véanse, por ejemplo, Ejemplos 2-4). De esta manera, se ha mostrado que una única administración (por ejemplo, administración mucosal) de una composición que comprende VSR inactivado con NE es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto (por ejemplo, inmunidad protectora (por ejemplo, inmunidad mucosal y sistémica)). La posterior administración (por ejemplo, una o más administraciones de refuerzo posteriores a una administración primaria) a un sujeto puede proporcionar la inducción de una respuesta inmunitaria potenciada a VSR en el sujeto. De esta manera, se ha demostrado que la administración de una composición que comprende VSR inactivado con NE a un sujeto proporciona inmunidad protectora frente a la infección por VSR.

La inmunidad celular y humoral juegan probablemente un papel en la protección frente al CSR, y ambas se indujeron con las formulaciones de NE (Véanse, por ejemplo, los ejemplos 1-4). Los títulos de anticuerpos específicos de VSR se consideran importantes para estimar la inmunidad protectora en sujetos humanos y en modelos animales de vacunación.

50 Los datos documentan que NE destruye eficazmente el VSR y genera una composición de inmunización no infecciosa adecuada para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria frente a VSR en un sujeto (por ejemplo, para su uso como una vacuna). Las composiciones inmunógenas inducen títulos de anticuerpos en suero dirigidos contra VSR específicos e inician importantes respuestas inmunitarias celulares antivíricas (por ejemplo, que incluyen la producción creciente de citoquinas antivíricas y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de VSR) tras la administración a un sujeto. La composición inmunógena de la invención proporciona también un aclaramiento vírico mejorado tras el estímulo con el VSR vivo. De acuerdo con ello, las composiciones de la presente invención como se definen en las reivindicaciones pueden proporcionar la capacidad de generar respuestas inmunitarias innatas adecuadas (por ejemplo, resultantes de la exposición a antígenos mantenida en una forma reconocible en NE que estimula los antígenos proporcionados por una infección activa) proporcionando por tanto una estrategia de vacuna más adecuada (por ejemplo, en comparación con el VSR inactivado con formol).

De esta manera, la administración (por ejemplo, administración mucosal) de una composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones a un sujeto puede proporcionar la inducción de respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, desarrollo de anticuerpos específicos) y celulares (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) contra el VSR. Se puede usar una composición de la presente invención, como se define en las reivindicaciones 1-9, como vacuna, de acuerdo con las reivindicaciones 10-11.

Generación de anticuerpos

Se puede usar una composición inmunógena que comprende un virus sincicial respiratorio inactivado con una nanoemulsión (NE) para inmunizar a un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, mono, o ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, puede conjugarse un antígeno de un virus sincicial respiratorio con una proteína transportadora, tal como albúmina sérica de bovino, tiroglobulina, hemocianina de lapa californiana u otro transportador descrito en el presente documento. Dependiendo de la especie hospedadora, se pueden usar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero no de forma limitativa, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, nanoemulsiones descritas en el presente documento, hemocianina de lapa californiana, y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, los BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un antígeno del virus sincicial respiratorio utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo en líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no de forma limitativa, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica del hibridoma de VEB (Véanse, por ejemplo, Kohler y col., *Nature* 256, 495 497, 1985; Kozbor y col., *J. Immunol. Methods* 81, 3142, 1985; Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026 2030, 1983; Cole y col., *Mol. Cell. Biol.* 62, 109 120, 1984).

Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad antigénica y actividad biológica adecuadas, (Véanse, por ejemplo, Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 68516855, 1984; Neuberger y col., *Nature* 312, 604 608, 1984; Takeda y col., *Nature* 314, 452 454, 1985). Los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos se pueden también "humanizar" para evitar que un paciente desarrolle una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo cuando se usa terapéuticamente. Dichos anticuerpos pueden tener una secuencia lo suficientemente similar en secuencia a la de los anticuerpos humanos que se van a usar directamente en tratamiento o pueden requerir la alteración de unos pocos restos clave. Las diferencias de secuencia entre anticuerpos de roedores y secuencias humanas se pueden minimizar sustituyendo restos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales o reticulando regiones completas determinantes de la complementariedad.

Como alternativa, se pueden producir anticuerpos humanizados utilizando procedimientos recombinantes, como se describe más adelante. Los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno concreto pueden contener sitios de unión al antígeno que están tanto parcial como completamente humanizados, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.565.332.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios pueden adaptarse utilizando los procedimientos conocidos en la materia para producir anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a un antígeno concreto. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, pueden generarse mediante intercambio de cadenas a partir de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias (Véanse, por ejemplo, Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120 23, 1991).

Se pueden construir anticuerpos monocatenarios utilizando un procedimiento de amplificación del ADN, tales como la PCR, utilizando un ADNc de hibridoma como molde (Véase, por ejemplo, Thirion y col., 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Los anticuerpos monocatenarios pueden ser monoespecíficos o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se contempla la construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes, por ejemplo, en Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Se contempla la construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos bivalentes, por ejemplo, en Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo bicatenario utilizando la síntesis manual o automatizada de nucleótidos, clonarse en una construcción de expresión utilizando procedimientos de ADN recombinante normalizados, e introducirse en una célula que expresa la secuencia de codificación, como se describe más adelante. Como alternativa, se pueden producir anticuerpos monocatenarios directamente utilizando, por ejemplo, la tecnología de fagos filamentosos (véanse, por ejemplo, Verhaar y col., 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls y col., 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

Se pueden producir también anticuerpos que se unen a un antígeno concreto induciendo la producción in vivo en la población de linfocitos o seleccionando bibliotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión muy específicos como se describe en la bibliografía (Véanse, por ejemplo, Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833 3837, 1989; Winter y col., *Nature* 349, 293 299, 1991).

Se pueden construir anticuerpos quiméricos como se describe en el documento WO 93/03151. Se pueden preparar también proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804. Se pueden purificar anticuerpos mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse por afinidad mediante paso sobre una columna a la cual se une el antígeno relevante. Los anticuerpos unidos se pueden eluir a continuación a partir de la columna utilizando un tampón con una elevada concentración de sal.

Nanoemulsiones

Las composiciones para vacunas en nanoemulsión de la presente invención como se definen en las reivindicaciones no están limitadas a ninguna nanoemulsión concreta. Se puede utilizar cualquier número de composiciones para emulsión adecuadas en las composiciones de vacunas de la presente invención, que incluyen, pero no de forma limitativa, las descritas en Hamouda y col., J. Infect Dis., 180:1939 (1999); Hamouda y Baker, J. Appl. Microbiol., 89:397 (2000); y Donovan y col., Antivir. Chem. Chemother., 11:41 (2000), así como las que se muestran en las Tablas 1 y 2 y en las Figuras 4 y 9. Las nanoemulsiones preferidas de la presente invención son aquellas que son eficaces en la destrucción o inactivación de patógenos y que no son tóxicas en animales. De acuerdo con ello, las formulaciones de emulsiones preferidas utilizan disolventes no tóxicos, tal como etanol, y consiguen más eficacia de destrucción a bajas concentraciones de la emulsión. En realizaciones preferidas, las nanoemulsiones utilizadas en los procedimientos de la presente invención son estables, y no se descomponen incluso después de largos periodos de almacenamiento (*por ejemplo*, uno o más años). Adicionalmente, las emulsiones preferidas mantienen la estabilidad incluso tras la exposición a alta temperatura y congelación. Esto es especialmente útil si se van a aplicar en condiciones extremas (*por ejemplo*, en un campo de batalla). En algunas realizaciones, se utiliza una de las nanoemulsiones descritas en la Tabla 1.

En algunas realizaciones preferidas, las emulsiones comprenden (i) una fase acuosa; (ii) una fase oleosa; y al menos un compuesto adicional. Estos compuestos adicionales pueden premezclarse con cualquiera de las fases acuosas u oleosas de la composición. Estos compuestos adicionales pueden premezclarse en una composición de emulsión existente inmediatamente antes de su uso. Se pueden premezclar uno o más compuestos adicionales en una composición de emulsión existente inmediatamente antes de su uso. Se pueden premezclar uno o más compuestos adicionales en una composición de emulsión existente antes del uso inmediato de las composiciones.

Los compuestos adicionales adecuados para el uso en las composiciones de la presente invención como se definen en las reivindicaciones incluyen, pero no se limitan a uno o más de, disolventes orgánicos, y más especialmente, disolventes basados en fosfato orgánico, tensioactivos y detergentes, compuestos que contienen amonio cuaternario, compuestos que contienen halógeno catiónico, potenciadores de la germinación, potenciadores de la interacción, y compuestos farmacéuticamente aceptables. Se presentan a continuación determinados compuestos ilustrativos contemplados para su uso en las composiciones de la presente invención.

| Tabla 1 | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| Formulaciones para nanoemulsión | | |
| Nombre | Fórmula de la fase oleosa | Relación de fases acuosa y oleosa (Vol/Vol) |
| X8P | 1 vol. Tri(N-butil)fosfato | 4:1 |
| | 1 vol. TRITON X-100 | |
| | 8 vol. Aceite de soja | |
| NN | 86,5 g de monooleato de glicerilo | 3:1 |
| | 60,1 ml de Nonoxinol-9 | |
| | 24,2 g de GENEROL 122 | |
| | 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio | |
| | 554 g de aceite de soja | |
| W ₈₀ 8P | 86,5 g de monooleato de glicerilo | 3,2:1 |
| | 21,2 g de Polysorbate 60 | |
| | 24,2 g de GENEROL 122 | |
| | 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio | |
| | 4 ml de aceite de menta piperita | |
| | 554 g de aceite de soja | |

(continuación)

| Nombre | Fórmula de la fase oleosa | Relación de fases acuosa y oleosa (Vol/Vol) |
|--------|-------------------------------------|---|
| SS | 86,5 g de monooleato de glicerilo | 3,2:1 |
| | 21,2 g de Polysorbate 60 | (bismuto al 1 % en agua) |
| | 24,2 g de GENEROL 122 | |
| | 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio | |
| | 554 g de aceite de soja | |

| Nanoemulsión | Composición |
|---------------------|---|
| X8P | 8 % de TRITÓN X-100; 8 % de fosfato de tributilo; 64 % de aceite de soja; 20 % de agua |
| W ₂₀ 5EC | 5 % de TWEEN 20; 8 % de etanol; 1 % de Cloruro de cetilpiridinio; 64 % de aceite de soja; 22 % de agua |
| EC | 1 % de Cloruro de cetilpiridinio; 8 % de etanol; 64 % de aceite de soja; 27 % de agua |
| Y3EC | 3 % de TYLOXAPOL; 1 % de Cloruro de cetilpiridinio; 8 % de etanol; 64 % de aceite de soja; 24 % de agua |
| X4E | 4 % de TRITÓN X-100; 8 % de etanol; 64 % de aceite de soja; 24 % de agua |

5 Las emulsiones pueden contener (i) una fase acuosa y (ii) una fase oleosa que contiene etanol como disolvente orgánico y opcionalmente un potenciador de la germinación, y (iii) TYLOXAPOL como tensioactivo (preferentemente 2-5 %, más preferentemente 3 %). Esta formulación es muy eficaz contra los microorganismos y también es no irritante y no tóxica para los usuarios mamíferos (y de esta manera, se puede poner en contacto con las membranas mucosales).

10 Las emulsiones pueden comprender una primera emulsión emulsionada dentro de una segunda emulsión, en la que (a) la primera emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y un disolvente orgánico; y (iii) un tensioactivo; y (b) la segunda emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y un compuesto que contiene un ion catiónico; y (iii) un tensioactivo.

15 La siguiente descripción proporciona varias emulsiones ilustrativas que incluyen formulaciones para composiciones de BCTP y X₈W₆₀PC. X8P comprende una nanoemulsión de agua en aceite, en la que la fase oleosa está constituida por aceite de soja, fosfato de tri-n-butilo, y TRITON X-100 al 80 % en agua. X₈W₆₀PC comprende una mezcla de volúmenes iguales de X8P con W₈₀8P. W₈₀8P es un compuesto liposómico hecho de monoestearato de glicerilo, esteroides refinados de soja (por ejemplo, los esteroides GENEROL), TWEEN 60, aceite de soja, un CPC de ion catiónico que contiene halógeno, y aceite de menta piperita. La familia GENEROL son un grupo de esteroides de soja polietoxilados (Henkel Corporation, Ambler, Pensilvania). En la Tabla 1 se proporcionan determinadas formulaciones para emulsión. Estas formulaciones particulares se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos números 5.700.679 (NN); 5.618.840; 5.549.901 (W₈₀8P); y 5.547.677.

25 La emulsión X8W₆₀PC se fabrica preparando en primer lugar la emulsión W₈₀8P y las emulsiones X8P por separado. A continuación, una mezcla de estas dos emulsiones se vuelve a emulsionar para producir una composición para emulsión reciente denominada X8W₆₀PC. Los procedimientos para producir dichas emulsiones se describen en las patentes de Estados Unidos números 5.103.497 y 4.895.452. Estos compuestos tienen una actividad microbiana de amplio espectro, y son capaces de inactivar las bacterias vegetativas a través de perturbaciones en la membrana.

30 Las composiciones anteriormente relacionadas son meramente ilustrativas, y los expertos en la técnica podrán alterar las cantidades de los componentes. Los expertos en la técnica entenderán que la relación de la fase oleosa a la fase acuosa, así como del transportador oleoso particular, tensioactivo CPC, y el tampón fosfato orgánico, y los componentes de cada composición.

Aunque determinadas composiciones que comprenden X8P tienen una relación de agua a aceite de 4:1, se entiende que X8P se puede formular para tener más o menos de una fase acuosa. Por ejemplo, puede haber 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más partes de la fase acuosa por cada parte de la fase oleosa. Lo mismo es válido para la formulación de W₈₀8P. De manera similar, la relación de tri(N-butil)fosfato:TRITON X-100:aceite de soja también puede variar.

35

Aunque la Tabla 1 relaciona cantidades específicas de monooleato de glicerilo, Polysorbate 60, GENEROL 122, cloruro de cetilpiridinio, y aceite transportador de W₈₀8P, estas son meramente ilustrativas. Puede formularse que una emulsión que tiene las propiedades de W₈₀8P tiene diferentes concentraciones de cada uno de estos componentes o a su vez diferentes componentes que cumplirán la misma función. Por ejemplo, la emulsión puede tener de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 g de monooleato de glicerilo en la fase oleosa inicial. La emulsión puede tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 g de Polysorbate 60 en la fase oleosa inicial. La composición puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 g de un esteroide de GENEROL, en la fase oleosa inicial.

La estructura de las nanoemulsiones puede jugar un papel en su actividad biocida así como contribuyendo a la no toxicidad de estas emulsiones. Por ejemplo, el componente activo en X8P, TRITON-X100 muestra menos actividad biocida frente a concentraciones de virus equivalentes a 11 % de X8P. Añadiendo la fase oleosa al detergente y al disolvente se reduce en gran medida la toxicidad de estos agentes en el cultivo tisular a las mismas concentraciones. Se sugiere que la nanoemulsión potencia la interacción de sus componentes con los patógenos, facilitando de esta forma la inactivación del patógeno y reduciendo la toxicidad de los componentes individuales. Debe indicarse que, cuando todos los componentes del X8P se han combinado en una composición, pero no en una estructura en nanoemulsión, la mezcla no es eficaz como antimicrobiano salvo que los componentes estén en una estructura de nanoemulsión.

Se presentan a continuación numerosos ejemplos adicionales agrupados en clases de formulaciones con composiciones similares. Las siguientes composiciones citan varios intervalos y mezclas de componentes activos. Un experto en la técnica apreciará que las formulaciones citadas a continuación son ilustrativas, y que son posibles formulaciones adicionales que comprenden intervalos porcentuales similares de los componentes citados.

La formulación puede comprender de aproximadamente 3 a 8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente de 60 a 70 % en vol. aceite (*por ejemplo*, aceite de soja), aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS), y en algunas formulaciones menos de aproximadamente 1 % en vol. de NaOH 1 N. Algunas de estas formulaciones pueden comprender PBS. Se contempla que la adición de NaOH 1 N y/o PBS. permita al usuario controlar ventajosamente el pH de las formulaciones, de forma que el pH está comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 10,0, y más preferiblemente para conseguir de aproximadamente 7,1 a 8,5. Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC). Otra formulación similar comprende aproximadamente 3,5 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3.5EC). Otra formulación adicional comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,067 % en vol. de NaOH 1 N, de forma tal que el pH de la formulación sea de aproximadamente 7,1, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,93 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC pH 7,1). Otra formulación más comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,67 % en vol. de NaOH 1 N, de forma tal que el pH de la formulación sea de aproximadamente 8,5, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC pH 8,5). Otra formulación similar comprende aproximadamente 4 % de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y4EC). La formulación puede comprender aproximadamente un 8 % de TYLOXAPOL, aproximadamente un 8 % de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y8EC). Una formulación adicional comprende aproximadamente 8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de 1x PBS (designado en el presente documento como Y8EC PBS).

Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de etanol, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, aceite de soja), y aproximadamente 27 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS) (designado en el presente documento como EC).

Algunas formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de dodecil sulfato de sodio (SDS), aproximadamente 8 % en vol. de fosfato de tributilo (TBP), y aproximadamente 64 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, aceite de soja), y aproximadamente 20 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS) (designado en el presente documento como S8P).

La formulación puede comprender de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TYLOXAPOL, de aproximadamente 7 a 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente de 64 a 57,6 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, aceite de soja), y aproximadamente 23 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas

5 formulaciones comprenden además aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, y aproximadamente 10 mM de amonio, cloruro. Algunas de estas formulaciones comprenden PBS. Se contempla que la adición de PBS en algunas de estas formulaciones permita al usuario controlar ventajosamente el pH de las formulaciones. Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de fase acuosa de DiH₂O. Otra formulación comprende aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de etanol, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, y aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y el resto de 1x PBS (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2EC/GE).

10 En una realización preferida de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 5 % en vol. de Tween 80, de aproximadamente 8 % en vol. de etanol, de aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₈₀5EC) como se define en el punto a) de la reivindicación 3.

15 En otras realizaciones adicionales de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 5 % en vol. de Tween 20, de aproximadamente 8 % en vol. de etanol, de aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC) como se define en el punto b) de la reivindicación 3.

20 Las formulaciones pueden comprender de aproximadamente 3 a 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, soja, o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, se contemplan formulaciones que comprenden aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 3 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 25 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X3E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 4 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X4E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 5 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X5E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 6 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X6E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de oliva, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8EO). Las formulaciones pueden comprender 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8EC).

35 Las formulaciones pueden comprender de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TYLOXAPOL, de aproximadamente 6 a 8 % en vol. de TBP, de aproximadamente 0,5 a 1,0 % en vol. de CPC, de aproximadamente 60 a 70 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, soja), y aproximadamente de 1 a 35 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones pueden comprender de aproximadamente 1 a 5 % en vol. de caldo de tripticasa soja, de aproximadamente 0,5 a 1,5 % en vol. de extracto de levadura, aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, y de aproximadamente 20-40 % en vol. de fórmula líquida para bebés. En algunas de las formulaciones que comprenden formulas líquidas para bebés, la fórmula comprende un hidrolizado de caseína (*por ejemplo*, Neutramigen, o Progestimil, y similares). En algunas de estas formulaciones, las formulaciones comprenden además de aproximadamente 0,1 a 1,0 % en vol. de tiosulfato de sodio, y de aproximadamente 0,1 a 1,0 % en vol. de citrato de sodio. Otras formulaciones similares que comprenden estos componentes básicos utilizan solución salina tamponada con fosfato (PBS) como la fase acuosa. Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y2EC). La formulación puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,9 % en vol. de tiosulfato de sodio, aproximadamente 0,1 % en vol. de citrato de sodio, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y2PC STS1). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 1,7 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,7 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 6,8 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,85 % de CPC, aproximadamente 29,2 % de NEUTRAMIGEN, aproximadamente 54,4 % en vol.

- de aceite de soja, y aproximadamente 4,9 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 85 % de X2Y2PC/baby). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 5 mM de L-alanina/Inosina, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y el restante % en vol. de 0,1x PBS (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2 PC/GE). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, y aproximadamente 3 % en vol. de caldo de tripticasa soja, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 27,7 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 90 % X2Y2PC/TSB). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de extracto de levadura, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 29,7 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2PC/YE).
- Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3PC).

- Las formulaciones pueden comprender de aproximadamente 4 a 8 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 5 a 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 30 a 70 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 0 a 30 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones comprenden además aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de benzalconio, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 1 % en vol. bromuro de cetildimetiltilamonio, EDTA 500 µM, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 5 mM de inosina, y aproximadamente 5 mM de L-alanina. Por ejemplo, las formulaciones comprenden aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como ATB-X1001). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 32 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como ATB-X002). Otras formulaciones pueden comprender aproximadamente 4 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 4 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 32 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 59,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 50 % de X8PC). Otras formulaciones relacionadas pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC_{1/2}). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC2). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % de TBP, aproximadamente 1 % de cloruro de benzalconio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P BC). La formulación puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P CPB). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetildimetiltilamonio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P CTAB). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 500 µM de EDTA, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 15,8 % en vol. DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC EDTA). Las formulaciones similares adicionales pueden comprender 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 5 mM de inosina, aproximadamente 5 mM de L-alanina, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O o PBS (designado en el presente documento como X8PC GE_{1x}). Las formulaciones pueden comprender adicionalmente aproximadamente 5 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 5 % de TBP, aproximadamente

1 % en vol. de CPC, aproximadamente 40 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 49 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X5P₅C).

5 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 6 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y6E).

10 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, y aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Algunas formulaciones relacionadas pueden comprender además aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico. Por ejemplo, una formulación particular comprende aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8G). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8GV_c).

20 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 0,5 a 0,8 % en vol. de TWEEN 60, de aproximadamente 0,5 a 2,0 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,70 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18,3 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8W60PC₁). Otra formulación relacionada comprende aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18,29 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W60_{0,7}X8PC). Las formulaciones pueden comprender de aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,7 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 64 a 70 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18,8 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8W60PC₂). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 17,3 % en vol. de DiH₂O. Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 25,29 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W60_{0,7}PC).

40 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, bien aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, o bien aproximadamente 8 % en vol. de TBP, además de, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (*por ejemplo*, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 20 a 30 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como D2G). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, y aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como D2P).

45 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de glicerilo, y aproximadamente de 1 a 10 % en vol. de CPC, aproximadamente de 50 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, las composiciones pueden comprender adicionalmente aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico. Por ejemplo, una formulación particular comprende aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 27 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GC). Una formulación adicional relacionada comprende aproximadamente 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 10 % en vol. de CPC, aproximadamente 60 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GC10). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico, aproximadamente 64 % en vol. de soja o aceite, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GCV_c).

60 Las formulaciones pueden comprender aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de SDS, aproximadamente de 50 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (*por ejemplo*, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, en algunas de estas formulaciones, las composiciones comprenden adicionalmente aproximadamente 1 % en vol. de lecitina, y aproximadamente 1 % en vol. de éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico. Las formulaciones ilustrativas

pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de SDS, 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como S8G). Una formulación relacionada comprende aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 8 % en vol. de SDS, aproximadamente 1 % en vol. de lecitina, aproximadamente 1 % en vol. de éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como S8GL1B1).

Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 4 % en vol. de TWEEN 80, aproximadamente 4 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₈₀4Y4EC).

Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 0,01 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,08 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 10 % en vol. de etanol, aproximadamente 70 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19,91 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y.08EC.01).

Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de laurilsulfato de sodio, y aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como SLS8G).

Las formulaciones específicas anteriormente descritas son meros ejemplos para ilustrar la variedad de composiciones que pueden ser de utilidad. Se pueden utilizar muchas variaciones de la formulación anterior, así como nanoemulsiones adicionales. Para determinar si una emulsión candidata es adecuada para el uso, se deben analizar tres criterios. Usando los procedimientos y patrones descritos en el presente documento, las emulsiones candidatas se pueden someter a ensayo fácilmente para ver si son adecuadas. En primer lugar, los ingredientes deseados se preparan usando los procedimientos descritos en el presente documento, para determinar si se puede formar una emulsión. Si no se puede formar una emulsión, el candidato se rechaza. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 4,5 % de tiosulfato de sodio, 0,5 % de citrato de sodio, 10 % de n-butanol, 64 % de aceite de soja, y 21 % de DiH₂O no conforma una emulsión.

En segundo lugar, la emulsión candidata debería formar una emulsión estable. Una emulsión es estable si permanece en forma de emulsión durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su uso previsto. Por ejemplo, para las emulsiones que se deben almacenar, enviar, etc., puede ser deseable que la composición permanezca en emulsión de meses a años. Las emulsiones típicas que son relativamente inestables, perderán su forma en el mismo día. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 8 % de 1-butanol, 5 % de TWEEN 10, 1 % de CPC, 64 % de aceite de soja, y 22 % de DiH₂O no conforma una emulsión estable. Las siguientes emulsiones candidatas mostraron ser estables usando los procedimientos descritos en el presente documento: 0,08 % de TRITON X-100, 0,08 % de glicerilo, 0,01 % de cloruro de cetilpiridinio, 99 % de mantequilla, y 0,83 % de diH₂O (designado en el presente documento como 1 % X8GC Mantequilla); 0,8 % de TRITON X-100, 0,8 % de glicerilo, 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 6,4 % de aceite de soja, 1,9 % de diH₂O, y 90 % de mantequilla (designado en el presente documento como 10 % X8GC Mantequilla); 2 % de W₂₀5EC, 1 % de Natrosol 250L NF, y 97 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC L GEL); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral con viscosidad 70, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite mineral 70); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral con viscosidad 350, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC Aceite mineral 350).

En tercer lugar, la emulsión candidata deberá tener eficacia para su uso previsto. Por ejemplo, una emulsión antibacteriana debería destruir o desactivar patógenos hasta un nivel detectable. Tal como se usa en el presente documento, algunas emulsiones tienen eficacia contra microorganismos específicos, pero no contra otros. Usando los procedimientos descritos en el presente documento, se puede determinar la adecuabilidad de una emulsión candidata concreta contra el microorganismo deseado. En general, esto implica exponer los microorganismos a la emulsión durante uno o más periodos de tiempo en experimentos simultáneos con las muestras de control adecuadas (*por ejemplo*, un control negativo tal como agua) y determinar si, y hasta qué grado, la emulsión destruye o desactiva el microorganismo. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 1 % de cloruro de amonio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 22 % DiH₂O no mostró ser una emulsión eficaz. Las siguientes emulsiones candidatas mostraron ser eficaces usando los procedimientos descritos en el presente documento: 5 % de TWEEN 20, 5 % de cloruro de cetilpiridinio, 10 % de glicerilo, 60 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC5); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 10 % de glicerilo, 64 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de oliva, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de oliva); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de linaza, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de linaza); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de maíz, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de maíz); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de coco, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de coco); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de semillas de algodón, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de semilla de

algodón); 8 % de dextrosa, 5 % de TWEEN 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C Dextrosa); 8 % de PEG 200, 5 % de TWEEN 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C PEG 200); 8 % de metanol, 5 % de TWEEN 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C metanol); 8 % de PEG 1000, 5 % de TWEEN 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C PEG 1000); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Natrosol 250H NF, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 2, también denominado 2 % de W₂₀5EC GEL); 2 % de W₂₀5EC, 1 % de Natrosol 250H NF, y 97 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 1); 2 % de W₂₀5EC, 3 % de Natrosol 250H NF, y 95 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 3); 2 % de W₂₀5EC, 0,5 % de Natrosol 250H NF, y 97,5 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 0,5); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Methocel A, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Methocel A); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Methocel K, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Methocel K); 2 % de Natrosol, 0,1 % de X8PC, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y diH₂O (designado en el presente documento como 0,1 % de X8PC/GE+2 % Natrosol); 2 % de Natrosol, 0,8 % de TRITON X-100, 0,8 % de fosfato de tributilo, 6,4 % de aceite de soja, 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y diH₂O (designado en el presente documento como 10 % de X8PC/GE+2 % Natrosol); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de manteca de cerdo, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC de manteca de cerdo); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite mineral); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 2 % de Nerolidol, 5 % de TWEEN 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 18,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}N); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 2 % de Farnesol, 5 % de TWEEN 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 18,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}F); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 20,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}); 10 % de cloruro de cetilpiridinio, 8 % de fosfato de tributilo, 8 % de TRITON X-100, 54 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como X8PC₁₀); 5 % de cloruro de cetilpiridinio, 8 % de TRITON X-100, 8 % de fosfato de tributilo, 59 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como X8PC₅); 0,02 % de cloruro de cetilpiridinio, 0,1 % de TWEEN 20, 10 % de etanol, 70 % de aceite de soja, y 19,88 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀0.1EC_{0,02}); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de TWEEN 20, 8 % de glicerilo, 64 % de Mobil 1, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC Mobil 1); 7,2 % de TRITON X-100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y 25,87 % de diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE); 7,2 % de TRITON X-100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 1 % de EDTA, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, 0,1 % de PBS, y diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE EDTA); y 7,2 % de TRITON X-100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 1 % de tiosulfato de sodio, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, 0,1 % de PBS, y diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE STS).

1. Fase acuosa

En algunas realizaciones, la emulsión comprende una fase acuosa como se define en la reivindicación 2. La emulsión puede comprender aproximadamente de 5 a 50, preferentemente de 10 a 40, más preferentemente de 15 a 30, % en vol. de fase acuosa, basado en el volumen total de la emulsión (aunque también se contemplan otras concentraciones). La fase acuosa puede comprender agua a un pH aproximadamente de 4 a 10, preferentemente de aproximadamente 6 a 8. El agua es preferentemente agua desionizada (a partir de ahora en el presente documento "DiH₂O"). La fase acuosa puede comprender suero salino tamponado con fosfato (PBS). La fase acuosa puede ser estéril y está exenta de pirógenos.

2. Fase oleosa

En algunas realizaciones, la emulsión comprende una fase oleosa como se define en la reivindicación 2. La fase oleosa (por ejemplo, aceite transportador) de la emulsión puede comprender 30-90, preferentemente 60-80, y más preferentemente 60-70 % en vol. de aceite, basado en el volumen total de la emulsión (aunque concentraciones más altas y más bajas también pueden ser de utilidad en las emulsiones descritas en el presente documento).

El aceite de la vacuna en nanoemulsión de la invención como se define en las reivindicaciones 10-11 puede ser cualquier aceite cosmética o farmacéuticamente aceptable. El aceite puede ser volátil o no volátil, y se puede seleccionar entre aceite animal, aceite vegetal, aceite natural, aceite sintético, aceites de hidrocarburo, aceites de silicona, derivados semisintéticos de los mismos, y sus combinaciones.

Los aceites adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, aceite de escualeno, aceites aromáticos, aceite de silicona, aceites esenciales, vitaminas insolubles en agua, estearato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de octilo, palmitato de cetilo, behenato de tridecilo, adipato de diisopropilo, sebacato de dietilo, antranilato de metilo, octanoato de cetilo, salicilato de octilo, miristato de isopropilo, cetoes de neopentil glicol dicarpato, Ceraphyls®,

oleato de decilo, adipato de diisopropilo, lactatos de alquilo C₁₂₋₁₅, lactato de cetilo, lactato de laurilo, neopentanoato de isostearilo, lactato de miristilo, estearoil estearato de isocetilo, estearoil estearato de octildocetilo, aceites de hidrocarburo, isoparafina, parafinas fluidas, isododecano, vaselina, aceite de argán, aceite de canola, aceite de chile, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de semilla de uva, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de nuez de palma, aceite de cacahuete, aceite de semilla de pino, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de té, aceite de trufa, aceite vegetal, aceite de albaricoque (almendra), aceite de yoyoba (aceite de semilla de simmondsia chinensis), aceite de semilla de uva, aceite de macadamia, aceite de germen de trigo, aceite de almendra, aceite de semillas de colza, aceite de calabacín, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de avellano, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de marihuana, aceite de madera, aceite de nuez de la India, aceite de aguacate, aceite de avellana, aceite de pescado, aceite de baya, aceite de pimienta de Jamaica, aceite de enebro, aceite de semillas, aceite de semillas de almendra, aceite de semilla de anís, aceite de semilla de apio, aceite de semilla de comino, aceite de semilla de nuez moscada, aceite de hoja, aceite de hoja de albahaca, aceite de hoja de laurel, aceite de hoja de canela, aceite de hoja de salvia común, aceite de hoja de eucalipto, aceite de hoja de limón, aceite de hoja de mirto, aceite de hoja de orégano, aceite de hoja de pachulí, aceite de hoja de piperita, aceite de aguja de pino, aceite de hoja de romero, aceite de hoja de menta verde, aceite de hoja del árbol del té, aceite de hoja de timo, aceite de hoja de gaulteria, aceite de flores, aceite de camomila, aceite de esclarea, aceite de clavo, aceite de flor de geranio, aceite de flor de hisopo, aceite de flor de jazmín, aceite de flor de lavanda, aceite de flor de manuka, aceite de flor de mejorana, aceite de flor de naranja, aceite de flor de rosa, aceite de flor de ylang-ylang, aceite de corteza, aceite de corteza de cassia, aceite de corteza de canela, aceite de sasafrás, aceite de madera, aceite de madera de alcanfor, aceite de madera de cedro, aceite de madera de palisandro, aceite de madera de sándalo), aceite de madera de rizoma (jengibre), aceite de resina, aceite de olíbano, aceite de mirra, aceite de peladura, aceite de peladura de bergamota, aceite de peladura de pomelo, aceite de peladura de limón, aceite de peladura de lima, aceite de peladura de naranja, aceite de peladura de tangerina, aceite de raíz, aceite de valeriana, ácido oleico, ácido linoleico, alcohol oleílico, alcohol isoestearílico, derivados semisintéticos de los mismos, y cualquier combinación de los mismos.

El aceite puede comprender además un componente de silicona, tal como un componente de silicona volátil, que puede ser el único aceite en el componente de silicona o se puede combinar con otra silicona o no silicona, aceites volátiles o no volátiles. Los componentes de silicona adecuados incluyen, pero sin limitación, metilfenilpolisiloxano, simeticona, dimeticona, feniltrimeticona (o una versión organomodificada del mismo), derivados alquilados de siliconas poliméricas, cetil dimeticona, lauril trimeticona, derivados hidroxilados de siliconas poliméricas, tal como dimeticonol, aceites de silicona volátil, siliconas cíclicas y lineales, ciclometicona, derivados de ciclometicona, hexametil ciclotrisiloxano, octametilciclotetrasiloxano, decametilciclopentasiloxano, dimetilpolisiloxanos lineales volátiles, isohexadecano, isoeicosano, isotetracosano, poliisobuteno, isooctano, isododecano, derivados semisintéticos de los mismos, y sus combinaciones.

El aceite volátil puede ser el disolvente orgánico, o el aceite volátil puede estar presente además de un disolvente orgánico. Los aceites volátiles adecuados incluyen, pero no se limitan a, un terpeno, monoterpeneo, sesquiterpeno, carminativo, azuleno, mentol, alcanfor, tujona, timol, nerol, linalool, limoneno, geraniol, alcohol perilílico, nerolidol, farnesol, ilangeno, bisabolol, farneseno, ascaridol, aceite de quenopodio, citronelal, citral, citronelol, chamazuleno, milenrama, guaiazuleno, camomila, derivados semisintéticos, o combinaciones de los mismos.

El aceite volátil del componente de silicona puede ser diferente del aceite de la fase oleosa.

La fase oleosa puede comprender 3-15, y preferentemente 5-10 % en vol. de un disolvente orgánico, basado en el volumen total de la emulsión. Se contempla que los disolventes orgánicos de tipo fosfato empleados en las emulsiones sirven para eliminar o perturbar los lípidos de las membranas de los patógenos. De esta manera, cualquier disolvente que elimine los esteroides o los fosfolípidos de las membranas microbianas puede ser de utilidad. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los disolventes o alcoholes basados en fosfatos orgánicos. Los alcoholes no tóxicos (por ejemplo, etanol) se pueden usar como disolvente. La fase oleosa, y cualquier compuesto adicional proporcionado en la fase oleosa, son preferiblemente estériles y están exentos de pirógenos.

3. Tensioactivos y detergentes

Las emulsiones pueden comprender además un tensioactivo o detergente. La emulsión puede comprender de aproximadamente 3 a 15 %, y preferentemente de aproximadamente 10 % de uno o más tensioactivos o detergentes (aunque también se contemplan otras concentraciones). Se contempla que los tensioactivos, cuando están presentes en las emulsiones, ayudan a estabilizar las emulsiones. Se contemplan tensioactivos tanto no iónicos (no aniónicos) como iónicos. Adicionalmente, los tensioactivos de la familia BRIJ de tensioactivos puede ser de utilidad en las composiciones reivindicadas de la presente invención. El tensioactivo se puede proporcionar tanto en la fase acuosa como en la fase oleosa. Los tensioactivos adecuados para su uso en las emulsiones incluyen una variedad de tensioactivos aniónicos y no iónicos, así como otros compuestos emulsionantes capaces de promover la formación de emulsiones de aceite en agua. Por lo general, los compuestos emulsionantes son relativamente hidrófilos, y las mezclas de compuestos emulsionantes se pueden utilizar para conseguir las calidades necesarias. En algunas formulaciones, los tensioactivos no iónicos tienen ventajas sobre los emulsionantes no iónicos en que

son sustancialmente más compatibles con un amplio intervalo de pH y frecuentemente forman emulsiones más estables de lo que lo hacen los emulsionantes iónicos (por ejemplo, de tipo jabón).

5 El tensioactivo que puede ser de aplicación en la vacuna en nanoemulsión de la invención como se define en las reivindicaciones 10-11 puede ser un tensioactivo iónico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo no iónico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo catiónico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo aniónico farmacéuticamente aceptable, o un tensioactivo de ion híbrido farmacéuticamente aceptable.

10 Los tensioactivo ilustrativos útiles se describen en Applied Surfactants: Principles and Applications. Tharwat F. Tadros, Copyright 8 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-30629-3). Además, el tensioactivo puede ser un tensioactivo polimérico iónico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo no iónico polimérico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo catiónico polimérico farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo aniónico polimérico farmacéuticamente aceptable, o un tensioactivo de ion híbrido polimérico farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tensioactivos poliméricos incluyen, pero sin limitación, un copolímero de injerto de una estructura principal de poli(metacrilato de metilo) con múltiples (al menos dos) cadenas secundarias de poli(óxido de etileno) (POE), ácido polihidroxisteárico, un condensado de formaldehído con alquilfenol alcoxlado, un poliéster modificado con polialquilenglicol con hidrófobos de ácido graso, un poliéster, derivados semisintéticos de los mismos, o combinaciones de los mismos.

15 Los agentes de superficie activa o tensioactivos, son moléculas anfipáticas compuestas por una parte hidrófoba no polar, habitualmente un hidrocarburo lineal o ramificado o una cadena de fluorocarbono que contiene 8-18 átomos de carbono, unido a una parte polar o hidrófila iónica. La porción hidrófila puede ser no iónica, iónica o de ion híbrido. La cadena de hidrocarburo interactúa débilmente con las moléculas de agua en un entorno acuoso, mientras que el grupo cabeza polar e iónico interactúa con las moléculas de agua mediante interacciones de dipolo o ion dipolo. Basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo, los tensioactivos se clasifican en tensioactivos aniónicos, catiónicos, de ion híbrido, no iónico y polimérico.

20 Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, nonilfenil etoxilado que comprende de 9 a 10 unidades de etilenglicol, undecanol etoxilado que comprende de 8 unidades de etilenglicol, monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20), monopalmitato de sorbitán polioxietilenado (20), monoestearato de sorbitán polioxietilenado (20), monooleato de sorbitán polioxietilenado (20), monoalaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, aceites de ricino hidrogenados etoxilados, laurilsulfato de sodio, un copolímero dibloque de óxido de etileno y óxido de propileno, copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, y copolímeros en bloque tetrafuncionales basados en óxido de etileno y óxido de propileno, monoésteres de glicerilo, caprato de glicerilo, caprilato de glicerilo, cocoato de glicerilo, erucato de glicerilo, hidroxistearato de glicerilo, isoestearato de glicerilo, lanolato de glicerilo, laurato de glicerilo, linolato de glicerilo, miristato de glicerilo, oleato de glicerilo, PABA de glicerilo, palmitato de glicerilo, ricinoleato de glicerilo, estearato de glicerilo, tiglicolato de glicerilo, dilaurato de glicerilo, dioleato de glicerilo, dimiristato de glicerilo, distearato de glicerilo, sesquioleato de glicerilo, estearato lactato de glicerilo, cetil estearil éster polioxietilenado, éter de colesterol polioxietilenado, laurato o dialurato polioxietilenado, estearato o diestearato polioxietilenado, ésteres grasos polioxietilenados, lauril éter polioxietilenado, éster de estearilo polioxietilenado, miristil éster polioxietilenado, un esteroide, colesterol, betasitosterol, bisabolol, ésteres grasos de alcoholes grasos, miristato de isopropilo, n-burirato de alifatiisopropilo, n-hexanoato de isopropilo, n-decanoato de isopropilo, palmitato de isopropilo, miristato de octildodecilo, alcoholes alcoxlados, ácidos alcoxlados, amidas alcoxladas, derivados de azúcar alcoxlados, derivados de aceites y ceras naturales, copolímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, nonoxinol-14, laurato de PEG-8, cocoamida de PEG-6, sesquiestearato de metilglucosa PEG-20, lanolina PEG40, aceite de ricino PEG-40, aceite de ricino hidrogenado PEG-40, ésteres grasos polioxietilenados, diésteres de glicerilo, éster de estearilo polioxietilenado, miristil éster polioxietilenado, lauril éter polioxietilenado, dilaurato de glicerilo, dimiristato de glicerilo, diestearato de glicerilo, derivados semisintéticos de los mismos, o mezclas de los mismos. Los tensioactivos adicionales adecuados incluyen, pero sin limitación, lípidos no iónicos, tal como laurato de glicerilo, miristato de glicerilo, dilaurato de glicerilo, dimiristato de glicerilo, derivados semisintéticos de los mismos, y mezclas de los mismos.

50 El tensioactivo puede ser un éster graso polioxietilenado que tiene un grupo de cabeza de polioxietileno comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 grupos, o un alcohol alcoxlado que tiene la estructura $R_5 - (OCH_2CH_2)_n - OH$, en la que R_5 es un grupo alquilo ramificado o no ramificado que tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 22 átomos de carbono e y tiene entre aproximadamente 4 y aproximadamente 100, y preferentemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100. Preferentemente, el alcohol alcoxlado es la especie en la que R_5 es un grupo laurilo e y tiene un valor medio de 23. El tensioactivo puede ser un alcohol alcoxlado que es un derivado etoxilado del alcohol lanolina. Preferentemente, el derivado etoxilado del alcohol lanolina es laneth-10, que es un éter de propilenglicol del alcohol lanolina con un valor de etoxilación promedio de 10.

60 Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero sin limitación, un tensioactivo etoxilado, un alcohol etoxilado, un alquilfenol etoxilado, un ácido graso etoxilado, una monoalcanolamida etoxilada, un éster de sorbitán etoxilado, una amina grasa etoxilada, un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno, bis(polietilenglicol bis[imidazoil carbonilo]), nonoxynol-9, bis(polietilenglicol bis[imidazoil carbonilo]), Brij[®] 35, Brij[®] 56, Brij[®] 72, Brij[®] 76, Brij[®] 92V, Brij[®]

97, Brij[®] 58P, Cremophor[®] EL, Decaetilenglicol monodocecil éter, N-Decanoil-N-metilglucamina, n-decil alfa-D-glucopiranosido, Decil beta-D-maltopiranosido, n-Dodecanoil-N-metilglucamida, n-Dodecil alfa-D-maltósido, n-Dodecil beta-D-maltósido, n-Dodecil beta-D-maltósido, Heptaetilenglicol monodecil éter, Heptaetilenglicol monododecil éter, Heptaetilenglicol monotetradecil éter, n-Hexadecil beta-D-maltósido, Hexaetilenglicol monododecil éter, Hexaetilenglicol monohexadecil éter, Hexaetilenglicol monooctadecil éter, Hexaetilenglicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-alfa-D-glucopiranosido, Nonaetilenglicol monododecil éter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, Octaetilenglicol monodecil éter, Octaetilenglicol monododecil éter, Octaetilenglicol monoheptadecil éter, Octaetilenglicol monooctadecil éter, Octaetilenglicol monotetradecil éter, Octil-beta-D-glucopiranosido, Pentaetilenglicol monodecil éter, Pentaetilenglicol monododecil éter, Pentaetilenglicol monohexadecil éter, Pentaetilenglicol monohexil éter, Pentaetilenglicol monooctadecil éter, Pentaetilenglicol monoocil éter, Polietilenglicol diglicidil éter, Polietilenglicol éter W-1, Tridecil éter polioxietilenado 10, Estearato polioxietilenado 100, Isohexadecil éter polioxietilenado 20, Oleil éter polioxietilenado 20, Estearato polioxietilenado 40, Estearato polioxietilenado 50, Estearato polioxietilenado 8, bis(Imidazolil carbonilo) polioxietilenado, estearato de propilenglicol polioxietilenado 25, Saponina de corteza de Quillaja, Span[®] 20, Span[®] 40, Span[®] 60, Span[®] 65, Span[®] 80, Span[®] 85, Tergitol, Tipe 15-S-12, Tergitol, Tipe 15-S-30, Tergitol, Tipe 15-S-5, Tergitol, Tipe 15-S-7, Tergitol, Tipe 15-S-9, Tergitol, Tipe NP-10, Tergitol, Tipe NP-4, Tergitol, Tipe NP-40, Tergitol, Tipe NP-7, Tergitol, Tipe NP9, Tergitol, Tergitol, Tipe TMN-10, Tergitol, Tipe TMN-6, Tetradecil-beta-D-maltósido, Tetraetilenglicol monodecil éter, Tetraetilenglicol monododecil éter, Tetraetilenglicol monotetradecil éter, Trietilenglicol monodecil éter, Trietilenglicol monododecil éter, Trietilenglicol monohexadecil éter, Trietilenglicol monoocil éter, Trietilenglicol monotetradecil éter, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Triton[®] X-165, Triton[®] X-305, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, TWEEN[®] 20, TWEEN[®] 21, TWEEN[®] 40, TWEEN[®] 60, TWEEN[®] 61, TWEEN[®] 65, TWEEN[®] 80, TWEEN[®] 81, TWEEN[®] 85, Tyloxapol, n-Undecil beta-D-glucopiranosido, derivados semisintéticos de los mismos, o combinaciones de los mismos.

Además, el tensioactivo no iónico puede ser un poloxámero. Los poloxámeros son polioles fabricados a partir de un bloque de polioxietileno, seguido por un bloque de polioxipropileno, seguido por un bloque de polioxietileno. El número promedio de unidades de polioxietileno y polioxipropileno varía en función del número asociado con el polímero. Por ejemplo, el polímero más pequeño, poloxámero 101, consiste en un bloque con un promedio de 2 unidades de polioxietileno, un bloque con un promedio de 16 unidades de polioxipropileno, seguido por un bloque con un promedio de 2 unidades de polioxietileno. Los poloxámeros van desde líquidos y pastas incoloras hasta sólidos de color blanco. En cosméticos y productos de higiene personal, los poloxámeros se utilizan en la formulación de limpiadores de piel, productos para el baño, champús, acondicionadores de cabello, colutorios, desmaquillantes para ojos y otros productos para la piel y el cabello. Los ejemplos de poloxámeros incluyen, pero sin limitación, poloxámero 101, poloxámero 105, poloxámero 108, poloxámero 122, poloxámero 123, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 183, poloxámero 184, poloxámero 185, poloxámero 188, poloxámero 212, poloxámero 215, poloxámero 217, poloxámero 231, poloxámero 234, poloxámero 235, poloxámero 237, poloxámero 238, poloxámero 282, poloxámero 284, poloxámero 288, poloxámero 331, poloxámero 333, poloxámero 334, poloxámero 335, poloxámero 338, poloxámero 401, poloxámero 402, poloxámero 403, poloxámero 407, benzoato de poloxámero 105, dibenzoato de poloxámero 182.

Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, un compuesto de amonio cuaternario, un compuesto de cloruro de alquiltrimetilamonio, un compuesto de cloruro de dialquil dimetilamonio, un compuesto que contiene halógeno, tal como cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, bromuro de bencildodecildimetilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiocetadecilamonio, bromuro de dodecildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadecildimetilamonio, reactivo T de Girard, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, N,N',N'-sebo-1,3-diaminopropano polioxietileno (10), bromuro de tonzonio, bromuro de trimetil(tetradecil)amonio, 1,3,5-Triazina-1,3,5(2H,4H,6H)-trietanol, 1-Decanaminio, N-decil-N, N-dimetil-, cloruro, Didecil dimetil amonio, cloruro, 2-(2-(p-(Diisobutil)cresoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio, cloruro, 2-(2-(p-(Diisobutil)fenoxi)etoxi)etil dimetil bencilamonio, cloruro, cloruro de alquil 1 o 3 bencil-1-(2-hidroxetil)-2-imidazolinio, Alquil bis(2-hidroxietil) bencil amonio, cloruro, Alquil demetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio, cloruro (100 % de C12), cloruro de alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio (50 % de C14, 40 % de C12, 10 % de C16), cloruro de alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio (55 % de C14, 23 % de C12, 20 % de C16), Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil amonio, cloruro (100 % C14), Alquil dimetil bencil amonio, cloruro (100 % C16), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (41 % C14, 28 % de C12), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (47 % C12, 18 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (55 % C16, 20 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (58 % C14, 28 % de C16), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (60 % C14, 25 % de C12), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (61 % C11, 23 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (61 % C12, 23 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (65 % C12, 25 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (67 % C12, 24 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (67 % C12, 25 % de C14), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (90 % C14, 5 % de C12), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (93 % C14, 4 % de C12), cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (95 % C16, 5 % de C18), Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, Alquil didecil dimetil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil amonio, cloruro (C12-16), Alquil dimetil bencil amonio, cloruro (C12-18), Alquil dimetil bencil amonio,

cloruro, dialquil dimetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil dimetilbencil amonio, cloruro, bromuro de alquil dimetil etil amonio (90 % de C14, 5 % de C16, 5 % de C12), Alquil dimetil etil amonio, bromuro (mezcla de grupos alquilo y alquenilo en los ácidos grasos del aceite de soja), Alquil dimetil etilbencil amonio, cloruro, Alquil dimetil etilbencil amonio, cloruro (60 % C14), Alquil dimetil isopropilbencil amonio, cloruro (50 % C12, 30 % de C14, 17 % de C16, 3 % de C18), cloruro de alquil trimetil amonio (58 % C18, 40 % de C16, 1 % de C14, 1 % de C12), cloruro de alquil trimetil amonio (90 % C18, 10 % de C16), Alquildimetil(etilbencil) amonio, cloruro (C12-18), Di-(C8-10)-alquil dimetil amonio, cloruro, Dialquil dimetil amonio, cloruro, Dialquil metil bencil amonio, cloruro, Didecil dimetil amonio, cloruro, Diisododecil dimetil amonio, cloruro, Dioctil dimetil amonio, cloruro, Dodecil bis (2-hidroxietyl) octil hidrógenoamonio, cloruro, Dodecil dimetil bencil amonio, cloruro, Dodecilcarbamoil metil dinetil bencil amonio, cloruro, cloruro de heptadecil hidroxietilimidazolinio, Hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietyl)-s-triazina, Hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietyl)-s-triazina, cloruro de miristalconio (y) Quat RNIUM 14, N,N-Dimetil-2-hidroxiopropilamonio, cloruro, polímero, n-Tetradecil dimetil bencil amonio, cloruro monohidrato, Octil decil dimetil amonio, cloruro, Octil dodecil dimetil amonio, cloruro, Octifenoxietoxietil dimetil bencil amonio, cloruro, Oxidietilenebis(alquil dimetil amonio, cloruro), compuestos de amonio cuaternario, dicoco alquildimetilo, cloruro, Trimetoxisilil propil dimetil octadecil amonio, cloruro, Trimetoxisililo cuaternario, Trimetil dodecilbencil amonio, cloruro, derivados semisintéticos de los mismos, y sus combinaciones.

Los compuestos catiónicos que contienen halógeno ilustrativos incluyen, pero sin limitación, haluros de cetilpiridinio, cetiltrimetilamonio, haluros, cetildimetiletilamonio, haluros, cetildimetilbencilamonio, haluros, cetiltributylfosfonio halides, dodeciltrimetilamonio, haluros, o tetradeciltrimetilamonio, haluros. En algunas realizaciones concretas, los compuestos catiónicos que contienen halógeno adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de cetilpiridinio (CPC), cetiltrimetilamonio, cloruro, cetilbencildimetilamonio, cloruro, bromuro de cetilpiridinio (CPB), cetiltrimetilamonio, bromuro (CTAB), bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de cetiltributylfosfonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, y bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro. El compuesto catiónico que contiene halógeno puede ser CPC.

Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, un carboxilato, un sulfato, un sulfonato, un fosfato, ácido chenodesoxicólico, una sal de ácido chenodesoxicólico, ácido cólico, bilis de buey o de oveja, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, Digitonina, Digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, sal de docusato sódico, sal sódica del ácido glicochenodesoxicólico, hidrato del ácido glicocólico, sintético, hidrato de la sal sódica del ácido glicocólico, sintético, monohidrato del ácido glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal disódica del ácido 3-sulfatoglicodesoxicólico, éster etílico del ácido glicolítico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, solución de N-lauroilsarcosina, solución de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, dodecil sulfato de litio, solución de Lugol, Niaproof 4, tipo 4, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio anhidro, 1-heptanosulfonato de sodio anhidro, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidrato, 2-bromoetanosulfonato de sodio, colato de sodio hidratado, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, desoxicolato de sodio monohidratado, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio anhidro, octilsulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio anhidro, taurocolato de sodio, sal sódica del ácido taurochenodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico monohidrato, hidrato de la sal sódica del ácido taurodesoxicólico monohidrato, sal disódica del ácido 3-sulfatotaurodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico, Trizma[®] dodecil sulfato, TWEEN[®] 80, ácido ursodesoxicólico, derivados semisintéticos de los mismos, y sus combinaciones.

Los tensioactivos de ion híbrido adecuados incluyen, pero sin limitación, una N-alquil betaína, lauril amino propil dimetil betaína, un alquilglicinato de dimetilo, un aminopropionato de N-alquilo, CHAPS, mínimo 98 % (TLC), CHAPS, SigmaUltra, mínimo 98 % (TLC), CHAPS, para electroforesis, mínimo 98 % (TLC), CHAPSO, mínimo 98 %, CHAPSO, SigmaUltra, CHAPSO, para electroforesis, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato de sodio, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato de sodio, SigmaUltra, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato de sodio, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato de sodio, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato de sodio, sal interna de 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato de sodio, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato de sodio, derivados semisintéticos de los mismos, y sus combinaciones.

Los tensioactivos y detergentes adicionales útiles en las composiciones de la presente invención se pueden determinar a partir de las obras de referencia (por ejemplo, que incluyen, pero sin limitación, McCutcheon's Volumen 1: Emulsions and Detergents -North American Edition, 2000) y fuentes comerciales.

55 4. Compuestos catiónicos que contienen halógeno

Las emulsiones pueden comprender además un compuesto catiónico que contiene halógeno. La emulsión puede comprender de aproximadamente 0,5 a 1,0 % en peso o más de un compuesto catiónico que contiene halógeno, basado en el peso total de la emulsión (aunque también se contemplan otras concentraciones). El compuesto catiónico que contiene halógeno se premezcla preferentemente con la fase oleosa; sin embargo, se debe entender que el compuesto catiónico que contiene halógeno se puede proporcionar junto con la composición en emulsión en una formulación diferente. Los compuestos que contienen halógeno adecuados se pueden seleccionar entre

compuestos que comprenden iones cloruro, bromuro y yoduro. Los compuestos catiónicos que contienen halógeno incluyen, pero sin limitación, haluros de cetilpiridinio, cetiltrimetilamonio, haluros, cetildimetiletilamonio, haluros, cetildimetilbencilamonio, haluros, cetiltributildifosfonio halides, dodeciltrimetilamonio, haluros, o tetradeciltrimetilamonio, haluros. En algunas realizaciones concretas, los compuestos catiónicos que contienen halógeno adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de cetilpiridinio (CPC), cetiltrimetilamonio, cloruro, cetilbencildimetilamonio, cloruro, bromuro de cetilpiridinio (CPB), y cetiltrimetilamonio, bromuro (CTAB), bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de cetiltributildifosfonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, y bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro. El compuesto catiónico que contiene halógeno puede ser CPC, (véase, por ejemplo, las nanoemulsiones que se han definido en la reivindicación 2), aunque las composiciones no se limitan a la formulación con cualquier compuesto que contenga un catión.

5. Potenciadores de la germinación

Las nanoemulsiones pueden comprender además un potenciador de la germinación. Las emulsiones pueden comprender de aproximadamente 1 mM a 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 5 mM a 10 mM de uno o más compuestos potenciadores de la germinación (aunque también se consideran otras concentraciones). El compuesto potenciador de la germinación se puede proporcionar en la fase acuosa antes de la formulación de la emulsión. Se contempla que cuando los potenciadores de la germinación se añaden a las composiciones en nanoemulsión, las propiedades esporicidas de la nanoemulsión se potencian. Se contempla además que dichos potenciadores de la germinación inician la actividad esporicida cerca del pH neutro (entre pH 6 - 8, y preferentemente 7). Dichas emulsiones de pH neutro se pueden obtener, por ejemplo, mediante dilución con suero salino tamponado con fosfato (PBS) o mediante preparaciones de emulsiones neutras. La actividad esporicida de la nanoemulsión se produce, preferentemente, cuando las esporas inician la germinación.

Se ha demostrado que las emulsiones utilizadas en las vacunas tienen actividad esporicida. Se cree que el componente fusigénico de las emulsiones actúa para iniciar la germinación y antes de que la reversión a la forma vegetativa sea completa, el componente lisogénico de la emulsión actúa para lisar la espora que acaba de comenzar la germinación. Estos componentes de la emulsión actúan por tanto de forma concertada para dejar la espora susceptible a la perturbación mediante las emulsiones. La adición del potenciador de la germinación facilita adicionalmente la actividad antiesporicida de las emulsiones, por ejemplo, acelerando la velocidad a la que se produce la actividad esporicida.

La germinación de las endosporas bacterianas y las esporas fúngicas se asocia con un aumento del metabolismo y una disminución en la resistencia al calor y los reactivos químicos. Para que se produzca la germinación, la espora debe detectar que el entorno es adecuado para soportar la vegetación y la reproducción. El aminoácido L-alanina estimula la germinación las esporas bacterianas (véase por ejemplo, Hills, J. Gen. Micro. 4:38 (1950); y Halvorson y Church, Bacteriol Rev. 21:112 (1957)). También se ha notificado que L-alanina y L-prolina inician la germinación de esporas fúngicas (Yanagita, Arch Mikrobiol 26:329 (1957)). Los α -aminoácidos simples, tales como glicina y L-alanina, ocupan una posición central en el metabolismo. La transaminación o desaminación de α -aminoácidos proporciona los hidratos de carbono glicogénicos o cetogénicos y el nitrógeno necesario para el metabolismo y el crecimiento. Por ejemplo, la transaminación o desaminación de la L-alanina proporciona piruvato, que es el producto final del metabolismo glicolítico (ruta Embden-Meyerhof Pathway). La oxidación del piruvato mediante el complejo piruvato deshidrogenasa proporciona acetil-CoA, NADH, H^+ , y CO_2 . Acetil-CoA es el sustrato iniciador del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs), que a su vez es el iniciador de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Acetil-CoA es también la fuente última de carbono en la síntesis de ácidos grasos, así como para la síntesis de esteroles. Los α -aminoácidos sencillos pueden proporcionar los equivalentes de nitrógeno, CO_2 , glicogénico y/o cetogénico necesarios para la germinación y la actividad metabólica posterior.

Los agentes potenciadores de la germinación adecuados incluyen, pero sin limitación, los α -aminoácidos que comprenden glicina y los L-enantiómeros de alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, fenilalanina, tirosina, y los ésteres de alquilo de los mismos. se puede encontrar más información sobre los efectos de los aminoácidos sobre la germinación se puede encontrar en la patente de Estados Unidos N.º 5.510.104. Una mezcla de glucosa, fructosa, asparagina, cloruro de sodio (NaCl), amonio, cloruro (NH_4Cl), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y cloruro de potasio (KCl) también son de utilidad. La formulación puede comprender los potenciadores de la germinación L-alanina, $CaCl_2$, inosina y NH_4Cl . Las composiciones pueden comprender además una o más formas comunes de medios de crecimiento (por ejemplo, caldo de tripticasa soja, y similares) que adicionalmente pueden comprender por sí mismos, o no, potenciadores de la germinación y tampones.

Las composiciones anteriores son meros potenciadores de la germinación ilustrativos, y se entiende que otros potenciadores de la germinación encontrarán uso en las nanoemulsiones. Un potenciador de la germinación candidato deberá cumplir dos criterios para su inclusión en las composiciones de la presente invención: debe ser capaz de asociarse con las emulsiones descritas en el presente documento y deberá aumentar la velocidad de germinación de una espora diana cuando se incorpora a las emulsiones divulgadas en el presente documento. Un experto en la técnica puede determinar su un agente particular tiene la función deseada de actuar como potenciador de la germinación aplicando dicho agente junto con las nanoemulsiones divulgadas en el presente documento a una diana y comparando la inactivación de la diana cuando se pone en contacto con la premezcla con inactivación de dianas similares mediante la composición sin el agente. Cualquier agente que aumente la germinación, y que de

esta forma disminuya o inhiba el crecimiento de los organismos, se considera un potenciador adecuado para su uso en las composiciones en nanoemulsión divulgadas en el presente documento.

La adición de un potenciador de la germinación (o medio de crecimiento) a una composición en emulsión neutra puede producir una composición que es útil para inactivar esporas bacterianas además de los virus encapsulados, bacterias Gram negativas, y bacterias Gram positivas para su uso en las composiciones de vacuna.

6. Potenciadores de la interacción

Las nanoemulsiones comprenden uno o más compuestos capaces de aumentar la interacción de las composiciones (es decir, "potenciador de la interacción") con patógenos diana (por ejemplo, la pared celular de las bacterias Gram negativas tales como *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*). El potenciador de la interacción se premezcla preferentemente con la fase oleosa; o el potenciador de la interacción se proporcionará junto con las composiciones tras la emulsión. El potenciador de la interacción puede ser un agente quelante (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilbis(oxietilenonitrilo)tetraacético (EGTA) en un tampón (por ejemplo, tampón tris)). Se entiende que los agentes quelantes son meros ejemplos de compuestos potenciadores de la interacción. De hecho, se contemplan otros agentes que aumentan la interacción de las nanoemulsiones utilizadas con agentes microbianos y/o patógenos. El potenciador de la interacción puede estar en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 µM. Un experto en la técnica podrá determinar su un agente particular tiene la función deseada de actuar como potenciador de la interacción aplicando dicho agente junto con las composiciones divulgadas en el presente documento a una diana y comparando la inactivación de la diana cuando se pone en contacto con la premezcla con inactivación de dianas similares mediante la composición sin el agente. Cualquier agente que aumente la interacción de una emulsión con bacterias, y por tanto aumenta o inhibe e crecimiento de las bacterias, en comparación con dicho parámetro en su ausencia, se considera un potenciador de la interacción.

La adición de un potenciador de la interacción a la nanoemulsión puede producir una composición que es útil para inactivar virus encapsulados, algunas bacterias Gram positivas y algunas bacterias Gram negativas para su uso en las composiciones de vacuna.

7. Compuestos de amonio cuaternario

Las nanoemulsiones de la presente invención pueden incluir un compuesto que contiene un amonio cuaternario. Los compuestos de amonio cuaternario ilustrativos comprenden, pero sin limitación, Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, didecil dimetil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil y dialquil dimetil amonio, cloruro, N,N-Dimetil-2-hidroxi-propilamonio, cloruro, polímero, Didecil dimetil amonio, cloruro, n-Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, n-Alquil dimetil etilbencil amonio, cloruro, Dialquil dimetil amonio, cloruro, n-Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, n-Tetradecil dimetil bencil amonio, cloruro monohidrato, n-Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, Dialquil dimetil amonio, cloruro, Hexahidro-1,3,5 -tris(2-hidroxi)etil-s-triazina, cloruro de miristalconio (y) Quat RNIUM 14, Alquil bis(2-hidroxi)etil bencil amonio, cloruro, Alquil demetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil amonio, cloruro, Alquil dimetil bencil dimetilbencil amonio,, Alquil dimetil dimetilbencil amonio, cloruro, Alquil dimetil etil amonio, bromuro, Alquil dimetil etil amonio, bromuro, Alquil dimetil etilbencil amonio, cloruro, Alquil dimetil isopropilbencil amonio, cloruro, Alquil trimetil amonio, cloruro, cloruro de alquil 1 o 3 bencil-1-(2-hidroxi)etil-2-imidazolinio, Dialquil metil bencil amonio, cloruro, Dialquil dimetil amonio, cloruro, Didecil dimetil amonio, cloruro, 2-(2-(p-(Diisobutil)resoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio, cloruro, 2-(2-(p-(Diisobutil)fenoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio, cloruro, Dioctil dimetil amonio, cloruro, Dodecil bis (2-hidroxi)etil octil hidrógenoamonio, cloruro, Dodecil dimetil bencil amonio, cloruro, Dodecilcarbamoil metil dinetil bencil amonio, cloruro, cloruro de heptadecil hidroxietilimidazolinio, Hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxi)etil-s-triazina, Octil decil dimetil amonio, cloruro, Octil dodecil dimetil amonio, cloruro, Octifenoxietoxietil dimetil bencil amonio, cloruro, Oxidietilenebis(alquil dimetil amonio, cloruro), compuestos de amonio cuaternario, dicoco alquildimetilo, cloruro, Trimetoxisililo cuaternario, y Trimetil dodecilbencil amonio, cloruro.

8. Otros compuestos

Una nanoemulsión puede comprender uno o más componentes adicionales que proporcionan una propiedad o funcionalidad deseada a las nanoemulsiones. Estos componentes se pueden incorporar a la fase acuosa o fase oleosa de las nanoemulsiones y/o se puede añadir antes de, o después, de la emulsión. Por ejemplo, las nanoemulsiones pueden comprender además (fenoles, triclosano, fenilfenol), agentes acidificantes (por ejemplo, ácido cítrico (por ejemplo, 1,5-6 %), ácido acético, zumo de limón), agentes alquilantes (por ejemplo, hidróxido de sodio (por ejemplo, 0,3 %)), tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón acetato, y otros tampones útiles para mantener un pH específico), y halógenos (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno).

Las técnicas ilustrativas para preparar una nanoemulsión (por ejemplo, usadas para inactivar un patógeno y/o generar una composición inmunógena) se describen a continuación. Adicionalmente, también se definen a continuación varias recetas específicas e ilustrativas.

Técnicas de formulación

Las nanoemulsiones se pueden formar usando técnicas clásicas de formación de emulsión. En resumen, la fase oleosa se mezcla con la fase acuosa bajo fuerzas de cizalla relativamente elevadas (por ejemplo, usando elevadas fuerzas hidráulicas y mecánicas) para obtener una nanoemulsión de aceite en agua. La emulsión se forma combinando la fase oleosa con una fase acuosa en un intervalo de volúmenes de aproximadamente 1:9 a 5:1, preferentemente, de aproximadamente 5:1 a 3:1, más preferentemente 4:1, de fase oleosa a fase acuosa. Las fases acuosa y oleosa se pueden combinar usando cualquier equipo que pueda producir fuerzas de cizalla suficientes para formar una emulsión tales como cafeteras de émbolo o mezcladores de alta cizalla (por ejemplo, mezcladores de alta cizalla autorizados por la FDA están disponibles, por ejemplo, de Admix, Inc., Manchester, NH). Los procedimientos para producir dichas emulsiones se describen en la patente de Estados Unidos números 5.103.497 y 4.895.452.

Las composiciones pueden comprender gotículas de una fase oleosa discontinua dispersada en una fase acuosa continua, tales como agua. Las nanoemulsiones pueden ser estables, y no se descomponen incluso después de un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, más de uno o más años). Adicionalmente, las nanoemulsiones pueden ser estables (por ejemplo, durante más de 3 meses, durante más de 6 meses, durante más de 12 meses, o durante más de 18 meses) tras combinación con un inmunógeno (por ejemplo, un patógeno). Las nanoemulsiones pueden ser no tóxicas y seguras cuando se administran (por ejemplo, mediante pulverización o puesta en contacto con superficies mucosas, tragada, inhalada, etc.) a un sujeto.

Una parte de la emulsión puede estar en la forma de estructuras lípidas que incluyen, pero sin limitación, vesículas lipídicas unilamelares, multilamelares y paucilamelares, micelas, y fases lamelares.

Algunas emulsiones pueden utilizar una fase oleosa que contiene etanol. Por ejemplo, las emulsiones pueden contener (i) una fase acuosa y (ii) una fase oleosa que contiene etanol como disolvente orgánico y opcionalmente un potenciador de la germinación, y (iii) TYOXAPOL como tensioactivo (preferentemente 2-5 %, más preferentemente 3 %). Esta formulación es muy eficaz para inactivar patógenos y tampoco es irritante ni tóxica para los sujetos mamíferos (por ejemplo, y por tanto se puede usar para su administración a una superficie mucosa).

Las emulsiones pueden comprender una primera emulsión emulsionada dentro de una segunda emulsión, en la que (a) la primera emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y un disolvente orgánico; y (iii) un tensioactivo; y (b) la segunda emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y un compuesto que contiene un ion catiónico; y (iii) un tensioactivo.

Formulaciones ilustrativas

La siguiente descripción proporciona varias emulsiones ilustrativas que incluyen formulaciones para composiciones BCTP y X₈W₆₀PC. BCTP comprende una nanoemulsión de agua en aceite, en la que la fase oleosa está constituida por aceite de soja, tri-n-butil fosfato, y TRITON X-100 al 80 % en agua. X₈W₆₀PC comprende una mezcla de volúmenes iguales de BCTP con W₈₀8P. W₈₀8P es un compuesto liposómico hecho de monoestearato de glicerilo, esteroides refinados de soja (por ejemplo, los esteroides GENEROL), TWEEN 60, aceite de soja, un CPC de ion catiónico que contiene halógeno, y aceite de menta piperita. La familia GENEROL son un grupo de esteroides de soja polietoxilados (Henkel Corporation, Ambler, Pensilvania). Las formulaciones ilustrativas de emulsiones se proporcionan en la Tabla 1B. Estas formulaciones particulares se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos números 5.700.679 (NN); 5.618.840; 5.549.901 (W₈₀8P); y 5.547.677. Algunas otras formulaciones en emulsión se presentan en la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie 10/669.865.

La emulsión X₈W₆₀PC se fabrica preparando en primer lugar la emulsión W₈₀8P y las emulsiones BCTP por separado. Una mezcla de estas dos emulsiones se puede volver a emulsionar para producir una emulsión fresca denominada X₈W₆₀PC. Los procedimientos para producir dichas emulsiones se describen en las patentes de Estados Unidos números 5.103.497 y 4.895.452.

Tabla 1B

| | Fórmula en fase oleosa | Relación de fases acuosa y oleosa (Vol/Vol) |
|------|--|---|
| BCTP | 1 vol. Tri(N-butil)fosfato 1 vol. TRITON X-100 8 vol. Aceite de soja | 4:1 |
| NN | 86,5 g de monooleato de glicerilo 60,1 ml de Nonoxynol-9 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 554 g de aceite de soja | 3:1 |

(continuación)

| | Fórmula en fase oleosa | Relación de fases acuosa y oleosa (Vol/Vol) |
|--------------------|--|---|
| W ₈₀ 8P | 86,5 g de monooleato de glicerilo 21,2 g de Polysorbate 60 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 4 ml de aceite de menta piperita 554 g de aceite de soja | 3,2:1 |
| SS | 86,5 g de monooleato de glicerilo 21,2 g de Polysorbate 60 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 554 g de aceite de soja | 3,2:1 (1 % de bismuto en agua) |

Las composiciones anteriormente relacionadas son meramente ilustrativas, y los expertos en la técnica podrán alterar las cantidades de los componentes para llegar a una composición en nanoemulsión estable. Los expertos en la técnica entenderán que la relación de la fase oleosa a la fase acuosa, así como las de los componentes particulares el transportador oleoso particular, tensioactivo CPC y tampón fosfato orgánico pueden variar.

Aunque determinadas composiciones que comprenden BCTP tienen una relación de agua en aceite 4:1, se entiende que la BCTP se puede formular para tener más o menos de una fase acuosa. Por ejemplo, puede haber 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más partes de la fase acuosa por cada parte de la fase oleosa. Lo mismo es cierto para la formulación W₈₀8P. De manera similar, la relación de tri(N-butil)fosfato:TRITON X-100:aceite de soja también puede variar.

Aunque la Tabla 1B relaciona cantidades específica de monooleato de glicerilo, Polysorbate 60, GENEROL 122, cloruro de cetilpiridinio, y aceite transportador de W₈₀8P, estas son meramente ilustrativas. Se puede formular una emulsión que tiene las propiedades de W₈₀8P que tenga diferentes concentraciones de cada uno de esos componentes o bien diferentes componentes que puedan cumplir la misma función. Por ejemplo, la emulsión puede tener de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 g de monooleato de glicerilo en la fase oleosa inicial. La emulsión puede tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 g de Polysorbate 60 en la fase oleosa inicial. La composición puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 g de un esteroide de GENEROL, en la fase oleosa inicial.

Los componentes individuales de las nanoemulsiones pueden funcionar tanto para inactivar un patógeno como para contribuir a la no toxicidad de las emulsiones. Por ejemplo, el componente activo de BCTP, TRITON-X100, muestra menos capacidad para inactivar un virus a concentraciones equivalentes al 11 % de BCTP. Añadiendo la fase oleosa al detergente y al disolvente se reduce en gran medida la toxicidad de estos agentes en el cultivo tisular a las mismas concentraciones. Se sugiere que la nanoemulsión potencia la interacción de sus componentes con los patógenos, facilitando de esta forma la inactivación del patógeno y reduciendo la toxicidad de los componentes individuales. Adicionalmente, cuando todos los componentes del BCTP se han combinado en una composición, pero no en una estructura en nanoemulsión, la mezcla no es tan eficaz en la inactivación de patógenos como cuando los componentes están en una estructura de nanoemulsión.

Se presentan a continuación numerosas composiciones adicionales. Las siguientes composiciones citan varios intervalos y mezclas de componentes activos. Un experto en la técnica apreciará que las formulaciones citadas a continuación son ilustrativas, y que son posibles formulaciones adicionales que comprenden intervalos porcentuales similares de los componentes citados.

Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 3 a 8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS), y en algunas formulaciones menos de aproximadamente 1 % en vol. de NaOH 1 N. Algunas de estas formulaciones comprenden PBS. Se contempla que la adición de NaOH 1 N y/o PBS en algunas de estas formulaciones, permita al usuario controlar ventajosamente el pH de las formulaciones, de forma que el pH está comprendido entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0, y más preferiblemente para conseguir de aproximadamente 7,1 a 8,5. Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC). Otra formulación similar comprende aproximadamente 3,5 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3.5EC). Otra formulación adicional comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,067 % en vol. de NaOH 1 N, de forma tal que el pH de la formulación sea de aproximadamente 7,1, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,93 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC pH 7,1). Otra

formulación más comprende aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,67 % en vol. de NaOH 1 N, de forma tal que el pH de la formulación sea de aproximadamente 8,5, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23,33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3EC pH 8,5). Otra formulación similar comprende aproximadamente 4 % de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y4EC). La formulación puede comprender aproximadamente un 8 % de TYLOXAPOL, aproximadamente un 8 % de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y8EC). Una formulación adicional comprende aproximadamente 8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de 1x PBS (designado en el presente documento como Y8EC PBS).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de etanol, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, y aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 27 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS) (designado en el presente documento como EC).

Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 8 % en vol. de dodecil sulfato de sodio (SDS), aproximadamente 8 % en vol. de fosfato de tributilo (TBP), y aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 20 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS) (designado en el presente documento como S8P).

Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TYLOXAPOL, de aproximadamente 7 a 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente de 64 a 57,6 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 23 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones comprenden además aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, y aproximadamente 10 mM de amonio, cloruro. Algunas de estas formulaciones comprenden PBS. Se contempla que la adición de PBS en algunas de estas formulaciones, permite al usuario controlar ventajosamente el pH de las formulaciones. Por ejemplo, la formulación puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de fase acuosa DiH₂O. La formulación comprende aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de etanol, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, y aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y el resto de 1x PBS (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2EC/GE).

En algunas realizaciones, una nanoemulsión comprende de aproximadamente 5 % en vol. de TWEEN 80, de aproximadamente 8 % en vol. de etanol, de aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₈₀5EC) como se define en el punto a) de la reivindicación 3.

En otras realizaciones adicionales de la presente invención, una nanoemulsión comprende de aproximadamente 5 % en vol. de TWEEN 20, de aproximadamente 8 % en vol. de etanol, de aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC) como se define en el punto b) de la reivindicación 3.

Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 2 a 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, soja, o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, se contemplan formulaciones que comprenden aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2E). Se contempla una nanoemulsión que comprenden aproximadamente 3 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 25 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X3E). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 4 % en vol. Triton de X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X4E). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 5 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X5E). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 6 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X6E). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8E). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol,

aproximadamente 64 % en vol. de aceite de oliva, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8EO). Una nanoemulsión puede comprender 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8EC).

- 5 Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2 % en vol. de TYLOXAPOL, de aproximadamente 6 a 8 % en vol. de TBP, de aproximadamente 0,5 a 1,0 % en vol. de CPC, de aproximadamente 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, soja), y aproximadamente de 1 a 35 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas nanoemulsiones pueden comprender de aproximadamente 1 a 5 % en vol. de caldo de tripticasa soja, de aproximadamente 0,5 a 1,5 % en vol. de extracto de levadura, aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, y de aproximadamente 20-40 % en vol. de fórmula líquida para bebés. En algunas formulaciones que comprenden fórmula líquida para bebés, la fórmula comprende un hidrolizado de caseína (por ejemplo, Neutramigen, o Progestimil, y similares). Un nanoemulsión puede comprender además de aproximadamente 0,1 a 1,0 % en vol. de tiosulfato de sodio, y de aproximadamente 0,1 a 1,0 % en vol. de citrato de sodio. Otras formulaciones similares que comprenden estos componentes básicos utilizan solución salina tamponada con fosfato (PBS) como la fase acuosa. Por ejemplo, una formulación comprende aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 23 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y2EC). La formulación puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 2 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,9 % en vol. de tiosulfato de sodio, aproximadamente 0,1 % en vol. de citrato de sodio, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y2PC STS1). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 1,7 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,7 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 6,8 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,85 % de CPC, aproximadamente 29,2 % de NEUTRAMIGEN, aproximadamente 54,4 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 4,9 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 85 % de X2Y2PC/baby). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 5 mM de L-alanina/inosina, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y el restante % en vol. de 0,1x PBS (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2 PC/GE). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, y aproximadamente 3 % en vol. de caldo de tripticasa soja, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 27,7 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 90 % X2Y2PC/TSB). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 1,8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 1,8 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,9 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de extracto de levadura, aproximadamente 57,6 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 29,7 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X2Y2PC/YE).
- 40 Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 3 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, y aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de soja, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y3PC).

Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 4 a 8 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 5 a 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 30 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 0 a 30 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones pueden comprender además aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de benzalconio, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetildimetiltilamonio, EDTA 500 µM, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 5 mM de inosina, y aproximadamente 5 mM de L-alanina. Por ejemplo, una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como ATB-X1001). Las formulaciones pueden comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 32 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como ATB-X002). Una nanoemulsión puede comprender

aproximadamente 4 % en vol. de TRITON X100, aproximadamente 4 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 32 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 59,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como 50 % de X8PC). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19,5 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC_{1/2}). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC2). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % de TBP, aproximadamente 1 % de cloruro de benzalconio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P BC). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P CPB). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de bromuro de cetildimetilamonio, aproximadamente 50 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 33 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P CTAB). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 500 µM de EDTA, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 15,8 % en vol. DiH₂O (designado en el presente documento como X8PC EDTA). Una nanoemulsión puede comprender 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 10 mM de cloruro de amonio, aproximadamente 5 mM de inosina, aproximadamente 5 mM de L-alanina, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O o PBS (designado en el presente documento como X8PC GE_{1x}). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 5 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 5 % de TBP, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 40 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 49 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X5P₅C).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 6 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X2Y6E).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, y aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Algunas composiciones en nanoemulsión (por ejemplo, usadas para generar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, para usar como vacuna) comprenden aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico. Por ejemplo, una formulación particular comprende aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8G). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8GV_c).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, de aproximadamente 0,5 a 0,8 % en vol. de TWEEN 60, de aproximadamente 0,5 a 2,0 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 25 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,70 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18,3 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8W60PC₁). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 17,3 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W60_{0,7}X8PC). Una nanoemulsión puede comprender de aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,7 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 0,5 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente de 64 a 70 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18,8 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8W60PC₂). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 2 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 17,3 % en vol. de DiH₂O. Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 0,71 % en vol. de TWEEN 60, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 25,29 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W60_{0,7}PC).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, bien aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, o bien aproximadamente 8 % en vol. de TBP, además de,

aproximadamente de 60 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 20 a 30 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Por ejemplo, una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como D2G). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 2 % en vol. de dioctil sulfosuccinato de sodio, y aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 26 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como D2P).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de glicerilo, y aproximadamente de 1 a 10 % en vol. de CPC, aproximadamente de 50 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, una nanoemulsión puede comprender además aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico. Por ejemplo, una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 27 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GC). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 10 % en vol. de CPC, aproximadamente 60 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GC10). Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 1 % en vol. de ácido L-ascórbico, aproximadamente 64 % en vol. de soja o aceite, y aproximadamente 24 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como GCV_c).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de glicerilo, aproximadamente de 8 a 10 % en vol. de SDS, aproximadamente de 50 a 70 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja o aceite de oliva), y aproximadamente de 15 a 30 % en vol. de fase acuosa (por ejemplo, DiH₂O o PBS). Adicionalmente, una nanoemulsión puede comprender además aproximadamente 1 % en vol. de lecitina, y aproximadamente 1 % en vol. de éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico. Las formulaciones ilustrativas comprenden aproximadamente 8 % en vol. de SDS, 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como S8G). Una formulación relacionada comprende aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 8 % en vol. de SDS, aproximadamente 1 % en vol. de lecitina, aproximadamente 1 % en vol. de éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 18 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como S8GL1B1).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 4 % en vol. de TWEEN 80, aproximadamente 4 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como W₈₀4Y4EC).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 0,01 % en vol. de CPC, aproximadamente 0,08 % en vol. de TYLOXAPOL, aproximadamente 10 % en vol. de etanol, aproximadamente 70 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 19,91 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como Y.08EC.01).

Una nanoemulsión puede comprender aproximadamente 8 % en vol. de laurilsulfato de sodio, y aproximadamente 8 % en vol. de glicerilo, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como SLS8G).

Las formulaciones específicas anteriormente descritas son meros ejemplos para ilustrar la variedad de nanoemulsiones que pueden ser de utilidad (por ejemplo, para inactivar y/o neutralizar un patógeno, y para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, para usar como vacuna)). Se contemplan muchas variaciones de las formulaciones anteriores, así como nanoemulsiones adicionales. Las emulsiones candidatas se pueden someter a ensayo fácilmente para ver si son adecuadas. En primer lugar, los ingredientes deseados se preparan usando los procedimientos descritos en el presente documento, para determinar si se puede formar una emulsión. Si no se puede formar una emulsión, el candidato se rechaza. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 4,5 % de tiosulfato de sodio, 0,5 % de citrato de sodio, 10 % de n-butanol, 64 % de aceite de soja, y 21 % de DiH₂O no conforma una emulsión.

En segundo lugar, la emulsión candidata debería formar una emulsión estable. Una emulsión es estable si permanece en forma de emulsión durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su uso previsto (por ejemplo, para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto). Por ejemplo, para las emulsiones que se deben almacenar, enviar, etc., puede ser deseable que la composición permanezca en emulsión de meses a años. Las emulsiones típicas que son relativamente inestables, perderán su forma en el mismo día. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 8 % de 1-butanol, 5 % de Tween 10, 1 % de CPC, 64 % de aceite de soja, y 22 % DiH₂O no conforma una emulsión estable. Las nanoemulsiones que demuestran ser estables incluyen, pero sin limitación, 8 % en vol. de TRITON X-100, aproximadamente 8 % en vol. de TBP, aproximadamente 64 % en vol. de aceite de soja, y aproximadamente 20 % en vol. de DiH₂O (designado en el presente documento como X8P); 5 % en vol. de TWEEN 20, de aproximadamente 8 % en vol. de etanol, de aproximadamente 1 % en vol. de CPC, aproximadamente 64 % en vol. de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 22 % en vol. de DiH₂O

(designado en el presente documento como W₂₀5EC); 0,08 % de Triton X-100, 0,08 % de glicerilo, 0,01 % de cloruro de cetilpiridinio, 99 % de mantequilla, y 0,83 % de diH₂O (designado en el presente documento como 1 % X8GC Mantequilla); 0,8 % de Triton X-100, 0,8 % de glicerilo, 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 6,4 % de aceite de soja, 1,9 % de diH₂O, y 90 % de mantequilla (designado en el presente documento como 10 % X8GC Mantequilla); 2 % de W₂₀5EC, 1 % de Natrosol 250L NF, y 97 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC L GEL); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral con viscosidad 70, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite mineral 70); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral con viscosidad 350, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC Aceite mineral 350). Preferentemente dichas nanoemulsiones son estables durante una semana, durante un mes, o durante un año.

En tercer lugar, la emulsión candidata deberá tener eficacia para su uso previsto. Por ejemplo, la nanoemulsión debería inactivar (por ejemplo, destruir o inhibir el crecimiento de) un patógeno hasta un nivel deseado (por ejemplo, una reducción de 1 log, 2 log, 3 log, 4 log, ... de reducción). Usando los procedimientos descritos en el presente documento, se puede determinar la adecuabilidad de una emulsión candidata concreta contra el patógeno deseado.

En general, esto implica exponer el patógeno a la emulsión durante uno o más periodos de tiempo en experimentos simultáneos con las muestras de control adecuadas (por ejemplo, un control negativo tal como agua) y determinar si, y hasta qué grado, la emulsión inactiva (por ejemplo, destruye y/o neutraliza) el microorganismo. Por ejemplo, una composición candidata realizada con un 1 % de cloruro de amonio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O no mostró ser una emulsión eficaz. Las siguientes emulsiones candidatas mostraron ser eficaces usando los procedimientos descritos en el presente documento: 5 % de Tween 20, 5 % de cloruro de cetilpiridinio, 10 % de glicerilo, 60 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC5); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 10 % de glicerilo, 64 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de oliva, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de oliva); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de linaza, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de linaza); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de maíz, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de maíz); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de coco, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de coco); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite de semillas de algodón, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite de semilla de algodón); 8 % de dextrosa, 5 % de Tween 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C Dextrosa); 8 % de PEG 200, 5 % de Tween 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C PEG 200); 8 % de metanol, 5 % de Tween 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C metanol); 8 % de PEG 1000, 5 % de Tween 10, 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 64 % de aceite de soja, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5C PEG 1000); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Natrosol 250H NF, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 2, también denominado 2 % de W₂₀5EC GEL); 2 % de W₂₀5EC, 1 % de Natrosol 250H NF, y 97 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 1); 2 % de W₂₀5EC, 3 % de Natrosol 250H NF, y 95 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 3); 2 % de W₂₀5EC, 0,5 % de Natrosol 250H NF, y 97,5 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Natrosol 0,5); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Methocel A, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Methocel A); 2 % de W₂₀5EC, 2 % de Methocel K, y 96 % de diH₂O (designado en el presente documento como 2 % W₂₀5EC Methocel K); 2 % de Natrosol, 0,1 % de X8PC, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y diH₂O (designado en el presente documento como 0,1 % de X8PC/GE+2 % Natrosol); 2 % de Natrosol, 0,8 % de Triton X-100, 0,8 % de fosfato de tributilo, 6,4 % de aceite de soja, 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y diH₂O (designado en el presente documento como 10 % de X8PC/GE+2 % Natrosol); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de manteca de cerdo, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC de manteca de cerdo); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de etanol, 64 % de aceite mineral, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC aceite mineral); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 2 % de Nerolidol, 5 % de Tween 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 18,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}N); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 2 % de Farnesol, 5 % de Tween 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 18,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}F); 0,1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 10 % de etanol, 64 % de aceite de soja, y 20,9 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5EC_{0,1}); 10 % de cloruro de cetilpiridinio, 8 % de fosfato de tributilo, 8 % de Triton X-100, 54 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como X8PC₁₀); 5 % de cloruro de cetilpiridinio, 8 % de Triton X-100, 8 % de fosfato de tributilo, 59 % de aceite de soja, y 20 % de diH₂O (designado en el presente documento como X8PC₅); 0,02 % de cloruro de cetilpiridinio, 0,1 % de Tween 20, 10 % de etanol, 70 % de aceite de soja, y 19,88 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀0.1EC_{0,02}); 1 % de cloruro de cetilpiridinio, 5 % de Tween 20, 8 % de glicerilo, 64 % de Mobil 1, y 22 % de diH₂O (designado en el presente documento como W₂₀5GC Mobil 1); 7,2 % de Triton X-100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 0,1 % de PBS, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, y 25,87 % de diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE); 7,2 % de Triton X-100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro

de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 1 % de EDTA, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, 0,1 % de PBS, y diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE EDTA); y 7,2 % de Tritón X100, 7,2 % de fosfato de tributilo, 0,9 % de cloruro de cetilpiridinio, 57,6 % de aceite de soja, 1 % de tiosulfato de sodio, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, 0,1 % de PBS, y diH₂O (designado en el presente documento como 90 % de X8PC/GE STS).

Preferentemente, las nanoemulsiones no son tóxicas (por ejemplo, para seres humanos, plantas, o animales), no irritante (por ejemplo, para seres humanos, plantas, o animales), y no corrosivo (por ejemplo, para seres humanos, plantas, o a los animales o para el medio ambiente), mostrando al mismo tiempo potencia contra una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, virus, y esporas. Aunque numerosos de los anteriores describen nanoemulsiones que satisfacen estas cualificaciones, la siguiente descripción proporciona numerosas nanoemulsiones no tóxicas, no irritantes, no corrosivas, antimicrobianas (denominadas a partir de ahora en el presente documento como "nanoemulsiones no tóxicas").

Las nanoemulsiones no tóxicas pueden comprender preparaciones de lípidos tensioactivos (SLP) para su uso como agentes antimicrobianos de amplio espectro que sean eficaces contra las bacterias y sus esporas, virus encapsulados, y hongos. Estos SLP pueden comprender una mezcla de aceites, detergentes, disolventes, y compuestos catiónicos que contienen halógeno además de varios iones que potencian sus actividades biocidas. Estos SLP se caracterizan como compuestos estables, no irritantes, y no tóxicos, comparados con agentes bactericidas y esporicidas comercialmente disponibles, que son muy irritantes y/o tóxicos.

Los ingredientes para su uso en las nanoemulsiones no tóxicos incluyen, pero no se limitan a: detergentes (por ejemplo, TRITON X100 (5-15 %) y otros miembros de la familia TRITON, TWEEN 60 (0,5-2 %) u otros miembros de la familia TWEEN, o TYLOXAPOL (1-10 %)); disolventes (por ejemplo, fosfato de tributilo (5-15 %)); alcoholes (por ejemplo, etanol (5-15 %) o glicerol (5-15 %)); aceites (por ejemplo, aceite de soja (40-70 %)); compuestos catiónicos que contienen halógeno (por ejemplo, cloruro de cetilpiridinio (0,5-2 %), bromuro de cetilpiridinio (0,5-2 %)), o cetildimetil etil amonio, bromuro (0,5-2 %)); amonio cuaternario, compuestos (por ejemplo, cloruro de benzalconio (0,5-2 %), cloruro de N-alquildimetilbencilamonio (0,5-2 %)); iones (cloruro de calcio (1 mM-40 mM), amonio, cloruro (1 mM-20 mM), cloruro de sodio (5 mM-200 mM), fosfato de sodio (1 mM-20 mM)); nucleósidos (por ejemplo, inosina (50 µM-20 mM)); y aminoácidos (por ejemplo, L-alanina (50 µM-20 mM)). Las emulsiones se preparan, por ejemplo, mezclando en un mezclador de alta cizalla durante 3-10 minutos. Las emulsiones pueden calentarse o no antes de mezclar a 82°C durante 1 hora.

Los compuestos de amonio cuaternario para usar incluyen, pero sin limitación: sacarinato de N-alquildimetil bencil amonio; 1,3,5-triazina-1,3,5-(2H,4H,6H)-trietanol; 1-Decanamino, N-decil-N, N-dimetil-, cloruro (o) cloruro de didecil dimetil amonio; cloruro de 2-(2-(p-(diisobutil)resoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio; cloruro de 2-(2-(p-(diisobutil)fenoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio; cloruro de alquil 1 o 3 bencil-1-(2-hidroxi)etil-2-imidazolinio; cloruro de alquil bis(2-hidroxi)etil bencil amonio; cloruro de alquil demetil bencil amonio; cloruro de alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio (100 % de C12); cloruro de alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio (50 % de C14, 40 % de C12, 10 % de C16); cloruro de alquil dimetil 3,4-diclorobencil amonio (55 % de C14, 23 % de C12, 20 % de C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio; cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (100 % C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (100 % C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (41 % C14, 28 % de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (47 % C12, 18 % de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (55 % C16, 20 % de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (58 % C14, 28 % de C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (60 % C14, 25 % de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (61 % C11, 23 % de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (61 % C12, 23 % de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (65 % C12, 25 % C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (67 % C12, 24 % C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (67 % C12, 25 % de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (90 % C14, 5 % de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (93 % C14, 4 % de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (95 % C16, 5 % de C18); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (y) cloruro de didecil dimetil amonio; cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (como en ácidos grasos); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (C12-C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio, (C12-C18); cloruro de alquil dimetil bencil y dialquil dimetil amonio; cloruro de alquil dimetil dimetilbencil amonio; bromuro de alquil dimetil etil amonio (90 % de C14, 5 % de C16, 5 % de C12); bromuro de alquil dimetil etil amonio (mezcla de grupos alquilo y alqueno en los ácidos grasos del aceite de soja); cloruro de alquil dimetil etilbencil amonio; cloruro de alquil dimetil etilbencil amonio (60 % C14); cloruro de alquil dimetil isopropilbencil amonio (50 % C12, 30 % de C14, 17 % de C16, 3 % de C18); cloruro de alquil trimetil amonio (58 % C18, 40 % de C16, 1 % de C14, 1 % de C12); cloruro de alquil trimetil amonio (90 % C18, 10 % de C16); cloruro de alquildimetil(etilbencil) amonio, (C12-18); cloruro de dialquil (C8-10) dimetil amonio; cloruro de dialquil metil bencil amonio; cloruro de didecil dimetil amonio; cloruro de diisodecil dimetil amonio; cloruro de dioctil dimetil amonio, cloruro; cloruro de dodecil bis (2-hidroxi)etil octil hidrogenoamónio; cloruro de dodecil dimetil bencil amonio; cloruro de dodecilcarbamoil metil dinetil bencil amonio; cloruro de heptadecil hidroxietilimidazolinio; hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxi)etil-s-triazina; cloruro de miristalconio (y) Quaternium 14; polímero de cloruro de N,N-dimetil-2-hidroxi)propilamonio; cloruro de n-alquil dimetil bencil amonio; cloruro de n-alquil dimetil etilbencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil bencil amonio monohidratado; cloruro de octil decil dimetil amonio; cloruro de octil dodecil dimetil amonio; cloruro de octifenoxietoxi)etil dimetil bencil amonio; oxidietilenobis(cloruro de alquil dimetil amonio); compuestos de amonio cuaternario, dicoco alquildimetilo, cloruro; cloruro de trimetoxisilil propil dimetil octadecil amonio; trimetoxisililo cuaternario, cloruro de trimetil dodecilbencil

amonio; cloruro de n-docecil dimetil etilbencil amonio; cloruro de n-hexadecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil etilbencil amonio; y cloruro de n-octadecil dimetil bencilamonio.

5 Por lo general, la nanoemulsiones no tóxicas preferidas se caracterizan por lo siguiente: tienen un diámetro de aproximadamente 200-800 nm de diámetro, aunque se contemplan nanoemulsiones de diámetro mayor y menor; la carga depende de los ingredientes; son estable durante periodos de tiempo relativamente prolongados (por ejemplo, hasta dos años), con conservación de la actividad biocida; son no irritantes y no tóxicos en comparación con sus componentes individuales debido, al menos en parte, a su contenido en aceite que reducen de forma importante la toxicidad de los detergentes y de los disolventes; son eficaces a concentraciones tan bajas como 0,1 %; tienen actividad antimicrobiana contra la mayoría de bacterias vegetativas (incluyendo organismos Gram positivos y Gram-negativos), hongos, y virus encapsulados y no encapsulados en 15 minutos (por ejemplo, 99,99 % de destrucción); y tienen actividad esporicida en 1-4 horas (por ejemplo, 99,99 % de destrucción) cuando se producen con potenciadores de la germinación.

D. Modelos animales

15 Las composiciones en nanoemulsión potenciales (por ejemplo, para generar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, para su uso como vacuna) puede someterse a ensayo en modelos animales de enfermedades infecciosas. El uso de modelos animales bien desarrollados proporciona un procedimiento para medir la eficacia y la seguridad de una vacuna antes de la administración a sujetos humanos. Los modelos animales ilustrativos de la enfermedad se muestran en la Tabla 3. Estos animales están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Jackson Laboratories Charles River; Portage, MI).

20 Los modelos animales de *Bacillus cereus* (estrechamente relacionado con *Bacillus anthracis*) se utilizan para someter a ensayos vacunas del ántrax de la presente invención. Tanto las bacterias como los bacilos Gram positivos formadores de spora y los síndromes patógenos producidos por cada bacteria se debe, en gran medida, a la producción y los efectos de dichas toxinas del hospedador infectado (Brown y col., J. Bact., 75:499 (1958); Burdon y Wende, J. Infect Dis., 107:224 (1960); Burdon y col., J. Infect. Dis., 117:307 (1967)). La infección por *Bacillus cereus* imita el síndrome patógeno causado por *Bacillus anthracis*. Se dice que los ratones sucumben rápidamente a los efectos de la toxina de *B. cereus* y es un modelo útil de la infección aguda. Las cobayas desarrollan una lesión cutánea después de una infección subcutánea con *B. cereus* que se parece a la forma cutánea del ántrax.

25 La infección por *Clostridium perfringens* tanto en ratones como en cobayas se utilizó como sistema modelo para el ensayo *in vivo* de fármacos antibióticos (Stevens y col., Antimicrob. Agents Chemother., 31:312 (1987); Stevens y col., J. Infect. Dis., 155:220 (1987); Altmeier y col., Surgery, 28:621 (1950); Sandusky y col., Surgery, 28:632 (1950)). *Clostridium tetani* es bien conocido por infectar y ocasionar enfermedades en una variedad de especie de mamífero. Ratones, cobayas, y conejos se han utilizado de forma experimental (Willis, Topley y Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Wilson, G., A. Miles, y M.T. Parker, eds. páginas 442-475 1983).

30 La infección por *Vibrio cholerae* se ha iniciado con éxito en ratones, cobayas, y conejos. De acuerdo con informes publicados, se prefiere alterar la flora bacteriana intestinal normal para que se establezca la infección en estos hospedadores experimentales. Esto se lleva a cabo mediante la administración de antibióticos para suprimir la flora intestinal normal y, en algunos casos, suprimiendo el alimento de los animales (Butterton y col., Infect. Immun., 64:4373 (1996); Levine y col., Microbiol. Rev., 47:510 (1983); Finkelstein y col., J. Infect. Dis., 114:203 (1964); Freter, J. Exp. Med., 104:411 (1956); y Freter, J. Infect. Dis., 97:57 (1955)).

35 La infección por *Shigella flexnerii* se ha iniciado con éxito en ratones y cobayas. como en el caso de las infecciones por vibrios, se prefiere que la flora bacteriana intestinal normal se altere para ayudar en el establecimiento de la infección de estos hospedadores experimentales. Esto se lleva a cabo mediante la administración de antibióticos para suprimir la flora intestinal normal y, en algunos casos, suprimiendo el alimento de los animales (Levine y col., Microbiol. Rev., 47:510 (1983); Freter, J. Exp. Med., 104:411 (1956); Formal y col., J. Bact., 85:119 (1963); LaBrec y col., J. Bact. 88:1503 (1964); Takeuchi y col., Am. J. Pathol., 47:1011 (1965)).

40 Los ratones y las ratas se han utilizado ampliamente en estudios experimentales realizados con *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (Naughton y col., J. Appl. Bact., 81:651 (1996); Carter y Collins, J. Exp. Med., 139:1189 (1974); Collins, Infect. Immun., 5:191 (1972); Collins y Carter, Infect. Immun., 6:451 (1972)).

45 Los ratones y las ratas son modelos experimentales bien establecidos para la infección por el virus *Sendai* (Jacoby y col., Exp. Gerontol., 29:89 (1994); Massion y col., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9:361 (1993); Castleman y col., Am. J. Path., 129:277 (1987); Castleman, Am. J. Vet. Res., 44:1024 (1983); Mims y Murphy, Am. J. Path., 70:315 (1973)).

50 La infección por el virus *Sindbis* de ratones habitualmente se lleva a cabo mediante inoculación intracerebral de ratones recién nacidos. Como alternativa, ratones recién destetados se inocularon por vía subcutánea en la almohadilla de la pata (Johnson y col., J. Infect. Dis., 125:257 (1972); Johnson, Am. J. Path., 46:929 (1965)).

55 Se prefiere que los animales se alojen durante 3-5 días para descansar del viaje y adaptarse al nuevo entorno de alojamiento antes de su uso en los experimentos. Al principio de cada experimento, los animales de control se

sacrificaron y el tejido se recogió para establecer los parámetros iniciales. Los animales se anestesiaron mediante cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, que incluyen, pero no de forma limitativa, la inhalación de isoflurano durante procedimientos cortos o una inyección de ketamina/xilazina para procedimientos más largos).

| Tabla 3 | | | | | |
|--|-----------------------------|-------------------------------|------|--------|------------------|
| Modelos animales de enfermedades infecciosas | | | | | |
| Microorganismo | Especia experimental animal | Cepas experimentales animales | Sexo | Edad | Vía de infección |
| <i>Francisella philomiraga</i> | ratón | BALB/C | M | 6 W | Intraperitoneal |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | ratón | BALB/C | F | 6-10 W | Intraperitoneal |
| | ratas | COBS/CD | M/F | 4 D | Intranasal |
| <i>Streptococcus pneumonia</i> | ratón | BALB/C | F | 6 W | Intranasal |
| | ratas | COBS/CD | M | 6-8 W | Intranasal |
| | cobayas | Hartley | M/F | 4-5 W | Intranasal |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | ratón | BALB/C | F | 6 W | Intranasal |
| <i>Virus de la gripe</i> | ratón | BALB/C | F | 6 W | Intranasal |
| <i>Sendai virus</i> | ratón | CD-1 | F | 6 W | Intranasal |
| | ratas | Sprague-Dawley | M | 6-8 W | Intranasal |
| <i>Sindbis</i> | ratón | CD-1 | M/F | 1-2 D | Intracerebral/SC |
| <i>Vaccinia</i> | ratón | BALB/C | F | 2-3 W | Intradérmica |

5 E. Ensayos de evaluación de vacunas (no forma parte de la invención reivindicada)

Las vacunas en nanoemulsión candidatas se pueden evaluar usando uno de varios sistemas modelo adecuados. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias mediadas por células se pueden evaluar *in vitro*. Además, se puede usar un modelo animal para evaluar la respuesta inmunitaria *in vivo* y la inmunidad frente a un desafío de patógenos. Se puede utilizar cualquier modelo animal, que incluyen, pero no de forma limitativa, los descritos en la Tabla 3.

- 10 Antes de someter a ensayo una vacuna en nanoemulsión en un sistema animal, se investiga la cantidad de exposición del patógeno a una nanoemulsión suficiente para inactivar el patógeno. Se contempla que patógenos tales como esporas bacterianas requieren periodos de tiempo más prolongados para inactivar mediante la nanoemulsión para que quede suficientemente neutralizado para permitir la inmunización. El periodo de tiempo necesario para la inactivación se puede investigar usando cualquier procedimiento adecuado, que incluyen, pero no de forma limitativa, los descritos en los ejemplos ilustrativos siguientes.

Además, se evaluó la estabilidad de las vacunas desarrolladas en emulsión, especialmente en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento, para garantizar que las vacunas son eficaces a largo plazo. La capacidad de otros materiales estabilizantes (*por ejemplo*, polímeros dendríticos) para potenciar la estabilidad y la inmunogenicidad de las vacunas se evaluó también.

- 20 Una vez se ha formulado una vacuna dada de nanoemulsión/patógeno para dar como resultado la inactivación del patógeno, se optimiza la capacidad de la vacuna para desencadenar una respuesta inmunitaria y proporcionar inmunidad. Los ejemplos no limitantes de los procedimientos para someter a ensayo la eficacia de la vacuna se han descrito en los Ejemplos 1-4 siguientes. Por ejemplo, se determinaron la programación y la dosis de la vacuna se pueden variar y se determinó la dosis más eficaz y el calendario de administración. El nivel de respuesta inmune se cuantificó midiendo los niveles de anticuerpo en suero. Además, los ensayos *in vitro* se utilizaron para realizar un seguimiento de la actividad de proliferación midiendo la captación de H³-timidina. Además de la proliferación, las respuestas de las citoquinas Th1 y Th2 (por ejemplo, incluyendo pero sin limitación, los niveles de IL-2, TNF- γ , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, etc.) se miden para evaluar cualitativamente la respuesta inmunitaria.

- 30 Finalmente, se utilizaron modelos animales para evaluar el efecto de una vacuna mucosal en nanoemulsión. Los patógenos purificados se mezclaron en emulsiones (o las emulsiones se ponen en contacto con un animal preinfectado), se administran, y se determina la respuesta inmunitaria. El nivel de protección se evalúa después estimulando el animal con el patógeno específico y evaluando posteriormente el nivel de síntomas de la enfermedad. El nivel de inmunidad se mide con el tiempo para determinar la necesidad y la separación de las inmunizaciones de refuerzo.

35

III. Composiciones terapéuticas y profilácticas

Las composiciones inmunógenas de las reivindicaciones 1-9 son para uso en el tratamiento o la prevención de la infección por VSR como se reivindica en la reivindicación 12. Adicionalmente, las composiciones inmunógenas de las reivindicaciones 1-9 pueden estar comprendidas por una vacuna, que a su vez puede formularse para administración a una superficie mucosal como se define en las reivindicaciones 10-11. El tratamiento del cuerpo humano o animal no está comprendido por la presente invención.

Una composición de la presente invención puede inducir (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto) inmunidad sistémica y mucosal. De esta manera, la administración de una composición de la presente invención a un sujeto puede ser como protección frente a una exposición (por ejemplo, una exposición mucosal) al VSR. La administración mucosal (por ejemplo, la vacunación) parece proporcionar protección frente al VSR (por ejemplo, que se inicia en una superficie mucosal). Aunque hasta ahora se ha demostrado difícil estimular respuestas de IgA secretoras y protección contra patógenos que invaden las superficies mucosales (véase, por ejemplo, Mestecky y col., *Mucosal Immunology*, 3ª ed. (Academic Press, San Diego, 2005)), las presentes composiciones parecen estimular la inmunidad mucosal (por ejemplo, una respuesta de IgA protectora) de un patógeno en un sujeto.

La composición (por ejemplo, una composición que comprende una NE y antígenos de proteínas inmunógenas procedentes del VSR (por ejemplo, el péptido M2, la proteína F, y/u otra proteína/antígeno peptídico o factor de virulencia) puede servir como vacuna mucosal. Este material puede producirse fácilmente con NE y M2, la proteína F, y/u otra proteína/péptido (por ejemplo, proteína derivada de virus, proteína derivada de vector de virus vivo, proteína recombinante, proteína desnaturalizada recombinante/antígenos, segmentos peptídicos pequeños de proteína/antígeno, e induce inmunidad mucosal y sistémica). La capacidad de producir esta formulación rápidamente y administrarla mediante instilación mucosal (por ejemplo, nasal) proporciona una vacuna que se puede usar en administraciones a gran escala (por ejemplo, a una población de un pueblo, aldea, ciudad, estado o país).

Una composición que comprende una NE y un inmunógeno (por ejemplo, una proteína o un derivado aislado o sintético purificado, una variante, o uno de sus análogos; o, uno o más serotipos de VSR inactivados por la nanoemulsión) pueden generar una respuesta inmunitaria. Cuando se administra a un sujeto, una composición puede estimular una respuesta inmunitaria frente al inmunógeno en el sujeto. La generación de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, resultante de la administración de una composición que comprende una nanoemulsión y un inmunógeno) puede proporcionar una inmunidad total o parcial al sujeto (por ejemplo, de los signos, síntomas o dolencias de una enfermedad (por ejemplo, VSR)). La protección y/o la inmunidad de la enfermedad (por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario de un sujeto de prevenir o atenuar (por ejemplo, suprimir) un signo, síntoma o dolencia de la enfermedad) tras la exposición a una composición inmunógena puede deberse a respuestas inmunes adaptativas (por ejemplo, adquiridas) (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos B y linfocitos T tras la exposición a una NE que comprende un inmunógeno de la presente divulgación (por ejemplo, respuestas inmunitarias que presentan una especificidad y reactividad aumentadas hacia el VSR). De esta manera, las composiciones se usan profiláctica o terapéuticamente para atenuar un signo, síntoma o dolencia asociada con VSR.

Una NE que comprende un inmunógeno (por ejemplo, una proteína de VSR recombinante) puede administrarse sola. Una composición que comprende una NE y un inmunógeno (por ejemplo, una proteína de VSR recombinante) puede comprender uno o más agentes diferentes (por ejemplo, un transportador, adyuvante, excipiente, y similares farmacéuticamente aceptables). Se puede administrar una composición para estimular una respuesta inmunitaria de manera que induzca una respuesta inmunitaria humoral. Se puede administrar una composición para estimular una respuesta inmunitaria de manera que induzca una respuesta inmunitaria celular (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), en lugar de una respuesta humoral. Una composición que comprende una NE y un inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral.

Además del VSR, se conocen en la técnica anterior otros virus, por ejemplo, el tipo o la cepa de virus de la familia *paramyxoviridae* (por ejemplo, un virus *Paramyxovirinae* (por ejemplo, *Paramyxovirus*, *Rubulavirus* y/o *Morbillivirus*). Cada miembro de la familia de la familia *paramyxoviridae*, en solitario, o en combinación con otro miembro de la familia, se puede usar para generar una composición que comprende una NE y un inmunógeno (por ejemplo, utilizado para generar una respuesta inmunitaria). la cepa A2 del VSR está disponible de la ATCC, Manassas, VA, ATCC n.º de registro VR-1540). La cepa del virus puede ser la cepa B del VSR (B WV/14617/85, ATCC n.º de registro VR-1400), la cepa 9320 del VSR (n.º de registro ATCC VR-955), la cepa 18537 del VSR (n.º de registro ATCC VR-1580), la cepa Long del VSR (n.º de registro ATCC VR-26), o la cepa Line 19 del VSR (véase, por ejemplo, Lukacs y col., *Immunopathology and Infection*, 169, 977-986 (2006)). De esta manera, la cepa del virus (VSR) utilizada puede ser una cepa modificada (por ejemplo, modificada genéticamente (por ejemplo, modificada naturalmente mediante selección natural o modificada utilizando técnicas genéticas recombinantes)) que muestra una mayor capacidad patogénica (por ejemplo, produce una enfermedad inducida por VSR más grave (por ejemplo, que comprende hiperreactividad potenciada de las vías aérea y/o producción en exceso de moco)). Una composición que comprende una NE y un inmunógeno puede comprender una o más cepas del VSR y/u otro tipo de virus *paramyxoviridae*. Adicionalmente, una composición que comprende una NE y un inmunógeno puede comprender una o más cepas del VSR y, además, una o más cepas de un virus no VSR inmunógeno.

El inmunógeno puede comprender uno o más antígenos derivados de un patógeno (VSR). Por ejemplo, el inmunógeno es una proteína purificada, recombinante, sintética, o aislada de otra forma (por ejemplo, añadida a la NE para generar una composición inmunógena). De manera similar, la proteína inmunógena puede ser un derivado, análogo o modificado de otra forma (por ejemplo, PEGilado) procedente de una proteína de un patógeno.

5 La presente invención no está limitada por la formulación concreta de una composición que comprende un VSR inactivado con una NE como se define en las reivindicaciones. De hecho, dicha composición puede comprender uno o más agentes diferentes además del VSR inactivado con la NE. Estos agentes o cofactores incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, tensioactivos, aditivos, tampones, solubilizantes, quelantes, aceites, sales, agentes terapéuticos, fármacos, agentes bioactivos, antibacterianos, y agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos, antivíricos, etc.). Una composición que comprende un VSR inactivado con una NE puede comprender un agente y/o cofactor que potencie la capacidad del inmunógeno de inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, un adyuvante). La presencia de uno o más cofactores o agentes puede reducir la cantidad de inmunógeno requerida para la inducción de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora (por ejemplo, inmunización protectora)). La presencia de uno o más cofactores o agentes se puede usar para desviar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta inmunitaria celular (por ejemplo, mediada por linfocitos T) o una respuesta inmunitaria humoral (por ejemplo, mediada por anticuerpos).

Los adyuvantes se describen en general in *Vaccine Design--the Subunit and Adjuvant Approach*, editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como un gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio. Un adyuvante puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados de forma catiónica o aniónica, o polifosfocenos.

Se prefiere que una composición que comprende NE y un inmunógeno comprenda uno o más adyuvantes que induzca una respuesta de tipo Th1 o una respuesta de tipo Th2.

25 Por lo general, se genera una respuesta inmunitaria hacia un antígeno a través de la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. Las respuestas inmunitarias pueden clasificarse ampliamente en dos categorías: respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células (por ejemplo, caracterizadas tradicionalmente por un anticuerpo y mecanismos efectores celulares de protección, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo Th1 (respuesta mediada por célula), y respuestas inmunitarias de tipo Th2 (respuesta humoral).

30 La estimulación de una respuesta inmunitaria puede ser el resultado de una respuesta directa o indirecta de una célula o componente del sistema inmunitario a una intervención (por ejemplo, la exposición a un inmunógeno). Las respuestas inmunitarias se pueden medir de muchas maneras incluyendo la activación, proliferación o diferenciación de células del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, APC, macrófagos, linfocitos NK, linfocitos NKT etc.); la expresión regulada por exceso o regulada por defecto de los marcadores y las citoquinas; la estimulación de títulos de IgA, IgM, o IgG; esplenomegalia (incluyendo el aumento de la celularidad del bazo); hiperplasia en infiltraciones celulares mixtas en diversos órganos. Se conocen en la técnica otras respuestas, células, y componentes del sistema inmunitario que se pueden evaluar con respecto a la estimulación inmunitarias.

40 Las composiciones de la presente invención pueden inducir la expresión y la secreción de citoquinas (por ejemplo, por los macrófagos, células dendríticas y linfocitos CD4+ T). Se puede producir la modulación de la expresión de una citoquina concreta local o sistémicamente. Se sabe que los perfiles de las citoquinas pueden determinar las funciones reguladoras y efectoras de los linfocitos T en respuestas inmunitarias. Se pueden inducir las citoquinas de tipo Th1, y, de este modo, las composiciones inmunoestimuladoras de la presente invención como se definen en las reivindicaciones pueden estimular una respuesta inmunitaria de tipo Th1 específica de antígeno incluyendo los linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, evitando de esta forma las respuestas inmunitarias de tipo Th2 no deseadas (por ejemplo, la generación de citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-13) implicadas en la potenciación de la gravedad de la enfermedad (por ejemplo, la inducción de la formación de moco por IL-13))).

50 Las citoquinas pueden jugar un papel en dirigir la respuesta de los linfocitos T. Los linfocitos T auxiliares (CD4+) orquestan la respuesta inmunitaria de los mamíferos a través de la producción de factores solubles que actúan sobre otras células del sistema inmunitario, incluyendo los linfocitos B y otros linfocitos T. Los linfocitos T auxiliares CD4+ expresan uno de los dos perfiles de citoquinas: Th1 o Th2. Los linfocitos T CD4+ de tipo Th1 secretan IL-2, IL-3, IFN- γ , GM-CSF y elevados niveles de TNF- α . Las células Th2 expresan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF y bajos niveles de TNF- α . Las citoquinas de tipo Th1 promueven la inmunidad mediada por células, y la inmunidad humoral que se caracteriza por el cambio de clase de la inmunoglobulina a IgG2a en ratones y a IgG1 en seres humanos. Las respuestas de tipo Th1 pueden asociarse también con hipersensibilidad de tipo retardado y las enfermedades autoinmunes. Las citoquinas de tipo Th2 inducen principalmente inmunidad humoral e inducen el cambio de clase a IgG1 e IgE. Los isotipos del anticuerpo asociados con respuestas de tipo Th1 tienen generalmente capacidades neutralizantes y opsonizantes mientras que los asociados con respuestas de tipo Th2 se asocian más con respuestas alérgicas.

Se ha demostrado que algunos factores afectan a la desviación de una respuesta inmunitaria tanto hacia una respuesta de tipo Th1 o una respuesta de tipo Th2. Los reguladores mejor caracterizados son las citoquinas. IL-12 e IFN- γ son reguladores Th1 positivos y reguladores Th2 negativos. IL-12 promueve la producción de IFN- γ , e IFN- γ proporciona retroalimentación positiva para IL-12. IL-4 e IL-10 parecen importantes para el establecimiento del perfil de citoquinas Th2 y para regular por defecto la producción de citoquinas Th1.

De esta manera, se puede proporcionar la estimulación de una respuesta inmune de tipo Th1 en un sujeto administrando al sujeto una composición que comprende una NE y un inmunógeno. Adicionalmente, se puede proporcionar la estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en un sujeto (por ejemplo, si se desea equilibrar una respuesta mediada por linfocitos T) administrando a un sujeto una composición que comprende una NE y un inmunógeno. Se pueden usar adyuvantes (por ejemplo, se pueden administrar simultáneamente con una composición) para desviar una respuesta inmunitaria hacia cualquiera de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 o Th2. Por ejemplo, los adyuvantes que inducen respuestas débiles de tipo Th2 o Th1 incluyen, pero sin limitación, alum, saponinas, y SB-As4. Los adyuvantes que inducen respuestas de tipo Th1 incluyen, pero no de forma limitativa MPL, MDP, ISCOMS, IL-12, IFN- γ , y SB-AS2.

Se pueden usar algunos otros tipos de inmunógenos de tipo Th1 (por ejemplo, como un adyuvante). Estos incluyen, pero sin limitación, los siguientes. Monofosforil lípido A (por ejemplo, en particular, se puede utilizar monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL)). 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribic Immunochem, Montana. Químicamente, se suministra a menudo como una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con cualquiera de 4, 5, o 6 cadenas aciladas. Se puede usar difosforil lípido A, y sus variantes 3-O-desaciladas. Cada uno de estos inmunógenos se puede purificar y prepararse mediante los procedimientos descritos en el documento GB 2122204B. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.005.099 y el documento EP 0 729 473; Hilgers y col., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers y col., 1987, Immunology, 60(1):141-6; y el documento EP 0 549 074). 3D-MPL se puede usar en forma de una formulación particulada (por ejemplo, que tiene un tamaño de partícula pequeña menor de 0,2 μm de diámetro, descrito en el documento EP 0 689 454).

Se conocen también las saponinas como inmunógeno (por ejemplo, un adyuvante de tipo Th1) en una composición. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos (Véase, por ejemplo, Lacaille-Dubois y Wagner (1996) *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Los ejemplos de saponinas incluyen Quil A (derivada de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y sus fracciones (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.057.540; Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55; y el documento EP 0 362 279). Se contemplan también por ser útiles las saponinas hemolíticas QS7, QS17, y QS21 (fracciones purificadas mediante HPLC de Quil A; Véase, por ejemplo, Kensil y col. (1991). *J. Immunology* 146,431-437, patente de Estados Unidos N.º 5.057.540; documentos WO 96/33739; WO 96/11711 A1 y EP 0 362 279 A1). Se contemplan también por ser útiles combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (Véase, por ejemplo, documento WO 99/10008).

Se puede usar un oligonucleótido inmunógeno que contiene dinucleótidos CpG sin metilar ("CpG") como adyuvante. CpG es una abreviatura de los motivos dinucleótidos de citosina-guanosina presentes en el ADN. Se conoce en la técnica CpG como un adyuvante cuando se administra por rutas sistémicas y mucosales (Véanse, por ejemplo, documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis y col., *J. Immunol*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6; y la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20050238660). Por ejemplo, la secuencia inmunoestimuladora es purina-purina-C-G-pirimidina-pirimidina; en el que el motivo CG no está metilado.

La presencia de uno o más oligonucleótidos CpG parece activar varios subgrupos inmunes incluyendo linfocitos citolíticos naturales (que producen IFN- γ) y macrófagos. Se pueden formular oligonucleótidos CpG en una composición para inducir una respuesta inmunitaria. Se puede administrar simultáneamente una solución exenta de CpG junto con un antígeno (por ejemplo, presente en una solución de NE (Véase, por ejemplo, documento WO 96/02555). Se puede conjugar de forma covalente un oligonucleótido CpG con un antígeno (Véase, por ejemplo, documento WO 98/16247), o formularse con un transportador tal como hidróxido de aluminio (Véase, por ejemplo, Brazolot-Millan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 1998, 95(26), 15553-8).

Adyuvantes tales como adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, citoquinas (por ejemplo, interleuquinas (por ejemplo, IL-2, IFN- γ , IL-4, etc.), factor estimulador de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc.), mutantes detoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriano tal como una toxina del cólera (TC), una toxina pertussis (PT), o una toxina de *E. Coli* térmicamente lábil (TL), particularmente LT-K63 (donde lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 63) LT-R72 (donde arginina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 72), CT-S109 (donde serina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 109), y PT-K9/G129 (donde lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 9 y glicina sustituida en la posición 129) (Véanse, por ejemplo, los documentos WO93/13202 y WO92/19265), y se pueden usar otras sustancias inmunógenas (por ejemplo, que potencian la eficacia de una composición de la presente invención) con la composición como se define en las reivindicaciones.

Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden encontrar uso incluyen poli(di(carboxilatofenoxi)fosfaceno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE.UU.); derivados de lipopolisacáridos tales como monofosforil lípido A (MPL; Ribic Immunochem Research, Inc., Hamilton, Mont.), dipéptido de muramilo (MDP; Ribic) y dipéptido de treonil-

muramilo (t-MDP; Ribi); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con el lípido A; OM Pharma SA, Meyrin, Suiza); y el factor de alargamiento de Leishmania (una proteína de Leishmania purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.).

5 Se pueden añadir adyuvantes a una composición que comprende VSR inactivado con NE, o, el adyuvante puede formularse con transportadores, por ejemplo, liposomas, o sales metálicas (por ejemplo, sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio)) antes de combinar con o la administración simultánea con dicha composición.

10 Una composición que comprende un VSR inactivado con NE puede comprender un único adyuvante, o dos o más adyuvantes (Véanse, por ejemplo, documentos WO 94/00153; documentos WO 95/17210; documentos WO 96/33739; documentos WO 98/56414; documentos WO 99/12565; documentos WO 99/11241; y el documento WO 94/00153).

15 Una composición que comprende un VSR inactivado con NE puede comprender uno o más mucoadhesivos (Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20050281843). Se contemplan por su utilidad una variedad de mucoadhesivos incluyendo, pero no de forma limitativa, derivados reticulados de poli(ácido acrílico) (por ejemplo, carbopol y policarbofil), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos (por ejemplo, alginato y quitosán), hidroxipropil metilcelulosa, lectinas, proteínas fimbrias, y carboximetilcelulosa. El uso de un mucoadhesivo (por ejemplo, en la composición reivindicada) puede potenciar la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, al que se ha administrado una composición de la presente invención) debido a un aumento en la duración y/o la cantidad de exposición a un inmunógeno que un sujeto experimenta cuando se usa un mucoadhesivo en comparación con la duración y/o la cantidad de exposición a un inmunógeno en ausencia de utilizar el mucoadhesivo.

20 Una composición como se define en las reivindicaciones puede comprender preparaciones acuosas estériles. Los vehículos y disolventes aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite mineral o no mineral fijo blando incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico son de utilidad en la preparación de sustancias inyectables. Se pueden encontrar formulaciones transportadoras adecuadas para la administración mucosal, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, o mediante otras rutas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

25 Se puede usar terapéuticamente una composición como se define en las reivindicaciones (por ejemplo, para potenciar una respuesta inmunitaria) o como profiláctico (por ejemplo, para la inmunización (por ejemplo, para prevenir signos o síntomas de la enfermedad)). Se puede administrar una composición como se define en las reivindicaciones a un sujeto mediante numerosas rutas y procedimientos de administración diferentes.

30 Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, mucosalmente (por ejemplo, mucosa nasal, mucosa vaginal, etc.)) mediante procedimientos múltiples, que incluyen, pero no de forma limitativa: suspenderse en una solución y aplicarse a una superficie; suspenderse en una solución y pulverizarse sobre una superficie utilizando un aplicador de pulverización; mezclarse con un mucoadhesivo y aplicarse (por ejemplo, pulverizarse o frotarse) sobre una superficie (por ejemplo, superficie mucosal); colocarse sobre o impregnarse sobre un aplicador nasal y/o vaginal y aplicarse; aplicarse mediante un mecanismo de liberación controlada; aplicarse como un liposoma; o aplicarse sobre un polímero.

35 Las composiciones se pueden administrar mucosalmente (por ejemplo, usando técnicas convencionales; Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición, 1995 (por ejemplo, para las técnicas de administración mucosal, incluyendo las técnicas intranasal, pulmonar, vaginal y rectal), así como la publicación europea N.º 517.565 e Illum y col., J. Controlled Rel., 1994, 29:133-141 (por ejemplo, para las técnicas de administración intranasal)). Como alternativa, las composiciones pueden administrarse dérmica o transdérmicamente, utilizando técnicas normalizadas (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición, 1995).

40 La vacunación mucosal parece ser la ruta de administración preferida ya que se ha mostrado que la administración mucosal de antígenos tiene una mayor eficacia para inducir respuestas inmunitarias protectoras en las superficies mucosales (por ejemplo, inmunidad mucosal), la ruta de entrada de muchos patógenos. Además, la vacunación mucosal, tal como la vacunación intranasal, puede inducir la inmunidad mucosal no solo en la mucosa nasal, sino también en sitios mucosales distantes tales como la mucosa genital (Véase, por ejemplo, Mestecky, Journal of Clinical Immunology, 7:265-276, 1987). Más ventajosamente, además de inducir respuestas inmunitarias mucosales, la vacunación mucosal puede inducir también inmunidad sistémica. La administración no parenteral (por ejemplo, la administración mucosal de vacunas) puede proporcionar un medio eficaz y conveniente para reforzar la inmunidad sistémica (por ejemplo, inducida por la vacunación parenteral o mucosal (por ejemplo, en los casos donde se usan múltiples refuerzos para sostener una inmunidad sistémica vigorosa)).

45 Se puede usar una composición como se define en las reivindicaciones para proteger o tratar a un sujeto susceptible de, padecer, una enfermedad mediante la administración de dicha composición a través de una ruta mucosal (por

ejemplo, una ruta alimentaria oral o nasal). Las rutas mucosales alternativas incluyen rutas intravaginales e intrarrectales. Se puede usar una ruta de administración nasal, denominada "administración intranasal" o "vacunación intranasal" en el presente documento. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos de vacunación intranasal, incluyendo la administración en forma de gotícula o pulverización de la vacuna en la nasofaringe de un sujeto que se va a inmunizar. puede proporcionarse una composición nebulizada o aerosolizada que comprende un VSR inactivado con NE. Formulaciones entéricas tales como cápsulas gastroresistentes para la administración oral, son también una opción los supositorios para la administración rectal o vaginal. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse también por vía oral. En estas circunstancias, una composición que comprende VSR inactivado con NE puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o incluye tampones alcalinos, o cápsulas entéricas. Las formulaciones para la administración nasal pueden incluir aquellas con dextrano o ciclodextrano y saponina como un adyuvante.

Se pueden administrar también las composiciones que se definen en las reivindicaciones mediante una ruta vaginal. En esos casos, dicha composición puede comprender excipientes y/o emulsionantes farmacéuticamente aceptables, polímeros (por ejemplo, CARBOPOL), y otros estabilizantes conocidos de cremas vaginales y/o supositorios. Dichas composiciones pueden administrarse mediante una ruta rectal. En esos casos, dicha composición puede comprender excipientes y/o ceras y polímeros conocidos en la materia para formar supositorios rectales.

Puede seleccionarse la misma ruta de administración (por ejemplo, administración mucosal) para una vacunación de cebado y refuerzo. Se pueden utilizar múltiples rutas de administración (por ejemplo, al mismo tiempo, o, como alternativa, secuencialmente) para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, utilizando una composición como se define en las reivindicaciones).

Por ejemplo, se puede administrar una composición como se define en las reivindicaciones a una superficie mucosal de un sujeto tanto en un régimen de vacunación de cebado o refuerzo. Como alternativa, dicha composición puede administrarse sistémicamente en cualquier régimen de vacunación de cebado o refuerzo. Se puede administrar una composición como se define en las reivindicaciones a un sujeto en un régimen de vacunación de cebado mediante la administración mucosal y en un régimen de refuerzo mediante administración sistémica. Se puede administrar una composición como se define en las reivindicaciones a un sujeto en un régimen de vacunación de cebado mediante administración sistémica y en un régimen de refuerzo mediante administración mucosal. Los ejemplos de rutas de administración sistémicas incluyen, pero sin limitación, la administración parenteral, intramuscular, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Se puede usar una composición como se define en las reivindicaciones para fines profilácticos y terapéuticos.

Se pueden administrar composiciones como se define en las reivindicaciones mediante administración pulmonar. Por ejemplo, se puede administrar una composición a los pulmones de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) mediante inhalación (por ejemplo, atravesando por tanto el revestimiento epitelial del pulmón al torrente sanguíneo (Véase, por ejemplo, Adjei, y col. *Pharmaceutical Research* 1990; 7:565-569; Adjei, y col. *Int. J. Pharmaceutics* 1990; 63:135-144; Braquet, y col. *J. Cardiovascular Pharmacology* 1989 143-146; Hubbard, y col. (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212; Smith, y col. *J. Clin. Invest.* 1989;84:1145-1146; Oswein, y col. "Aerosolization of Proteins", 1990; *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado*; Debs, y col. *J. Immunol.* 1988; 140:3482-3488; y la patente de Estados Unidos N.º 5.284.656 de Platz, y col.). Se describe un procedimiento y una composición para la administración pulmonar de fármacos para efectos sistémicos en la patente de Estados Unidos N.º 5.451.569 de Wong; Véase también la patente de Estados Unidos N.º 6.651.655 de Licalsi y col.).

Se contemplan además para el uso en la práctica un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para la administración mucosal pulmonar y/o nasal de agentes farmacéuticos incluyendo, pero no de forma limitativa, nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores en polvo, todos ellos conocidos de los expertos en la materia. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de la presente invención son el nebulizador Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); el nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, Colo.); el inhalador de dosis medida Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); y el inhalador para polvo Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, Mass.). Todos los mencionados dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del agente terapéutico. Normalmente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente adecuado, además de los diluyentes usuales, adyuvantes, tensoactivos, transportadores y/u otros agentes útiles en el tratamiento. Asimismo, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de transportadores.

De esta manera, se puede usar una composición para proteger y/o tratar a un sujeto susceptible a, o que padece, una enfermedad mediante la administración de dichas composiciones mediante la ruta mucosal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, pulmonar, intravenosa, subcutánea u otra ruta de administración descrita en el presente documento. Los procedimientos de administración sistémica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringuillas y agujas, o dispositivos para la administración balística de vacunas sólidas (Véase, por ejemplo, documento WO 99/27961), o un dispositivo inyector de líquido a presión sin aguja (Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 4.596.556; patente de Estados Unidos N.º 5.993.412), o parches transdérmicos (Véanse, por ejemplo, documentos WO 97/48440; documento WO 98/28037). La inmunogenicidad de los antígenos se puede

potenciar mediante la aplicación a la piel (administración transdérmica o transcutánea, Véase, por ejemplo, los documentos WO 98/20734; WO 98/28037). De esta manera, se puede usar un dispositivo de administración para la administración sistémica, precargado con la composición de vacuna.

5 Se contemplan una amplia variedad de sujetos para beneficiarse de la administración de una composición como se define en las reivindicaciones. El sujeto puede ser un ser humano. Los sujetos humanos pueden ser de cualquier edad (por ejemplo, adultos, niños grandes, niños pequeños, etc.) que se han expuesto o que han llegado probablemente a estar expuestos al VSR). Los sujetos humanos pueden ser sujetos con mayor probabilidad de recibir una exposición directa al VSR o que es más probable que muestren signos y síntomas de la enfermedad del VSR tras la exposición al VSR (por ejemplo, sujetos inmunosuprimidos). Se puede administrar al público general (por ejemplo, vacunado con) una composición de la presente invención (por ejemplo, para prevenir la incidencia o la diseminación de la enfermedad). Por ejemplo, se utilizan composiciones como se definen en las reivindicaciones para vacunar un grupo de personas (por ejemplo, una población de una región, ciudad, estado y/o país) para su propia salud (por ejemplo, para prevenir o tratar la enfermedad). Los sujetos pueden ser mamíferos no humanos (por ejemplo, cerdos, ganado, cabras, caballos, ovejas, u otra ganadería; o ratones, ratas, conejos u otros animales). Se pueden utilizar composiciones como se define en las reivindicaciones en escenarios de investigación (por ejemplo, con animales de investigación).

20 Se puede formular una composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones para la administración mediante cualquier ruta, tal como la ruta mucosal, oral, tópica, parenteral u otra ruta descrita en el presente documento. Las composiciones pueden estar en una cualquiera o más formas diferentes incluyendo, pero no de forma limitativa, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, espumas, cremas o preparaciones líquidas.

Se pueden presentar formulaciones tópicas como, por ejemplo, pomadas, cremas o lociones, espumas, y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales adecuados tales como conservantes, disolventes (por ejemplo, para ayudar a la penetración), y emolientes en pomadas y cremas.

25 Las formulaciones tópicas pueden incluir también agentes que potencian la penetración de los principios activos a través de la piel. Los agentes ilustrativos incluyen una combinación binaria de N-(hidroxietil) pirrolidona y un compuesto que desordena la envoltura celular, un éster de azúcar en combinación con un sulfóxido u óxido de fosfina, y monooleato de sacarosa, decil metil sulfóxido, y un alcohol.

30 Otros materiales ilustrativos que aumentan la penetración en la piel incluyen tensioactivos o agentes mojantes que incluyen, pero no de forma limitativa, monooleato de sorbitán polioxietilenado (Polisorbato 80); monooleato de sorbitán (Span 80); polímero de fenol-p-isooctilo polioxietilenado (Triton WR-1330); trioleato de sorbitán polioxietilenado (Tween 85); sulfosuccinato de dioctil sodio; y sarcosinato de sodio (Sarcosil NL-97); y otros tensioactivos farmacéuticamente aceptables.

35 Las composiciones pueden comprender además uno o más alcoholes, compuestos que contienen cinc, emolientes, humectantes, agentes espesantes y/o gelificantes, agentes neutralizantes, y tensioactivos. El agua usada en las formulaciones es agua preferentemente desionizada que tiene un pH neutro. Los aditivos adicionales en las formulaciones tópicas incluyen, pero sin limitación, fluidos de silicona, colorantes, fragancias, ajustadores del pH, y vitaminas.

40 Las formulaciones tópicas pueden contener también transportadores compatibles, tales como bases de crema o de pomada y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos transportadores pueden estar presentes de aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 98 % de la formulación. La base de pomada puede comprender uno o más de vaselina, aceite mineral, ceresina, alcoholes de lanolina, pantenol, glicerina, bisabolol, manteca de cacao y similares.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse y utilizarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero no de forma limitativa, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas y liposomas. Aunque básicamente similares en la naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y en la consistencia del producto final.

50 Las composiciones de la presente invención como se define en las reivindicaciones puede contener otros componentes adyuvantes que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas. De esta manera, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos convencionales adicionales, compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, preferentemente no interfieren indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares)

que no interactúan perjudicialmente con el VSR inactivado con NE de la formulación. Las composiciones inmunoestimuladoras se pueden administrar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan las sales, deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden utilizarse convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y benceno sulfónico. Asimismo, dichas sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, sales de potasio o de calcio del grupo del ácido carboxílico.

5 Los agentes tamponantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados pueden incluir cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

10 Se puede administrar simultáneamente una composición que comprende VSR inactivado con NE con uno o más antibióticos. Por ejemplo, se pueden administrar uno o más antibióticos con, antes y/o después de la administración de una composición que comprende una NE y un inmunógeno. Se pueden administrar simultáneamente una variedad de antibióticos que incluye, pero no de forma limitativa, antibióticos de β -lactama, penicilinas (tales como penicilinas naturales, aminopenicilinas, penicilinas resistentes a las penicilinasas, carboxi penicilinas, ureido penicilinas), cefalosporinas (primera generación, segunda generación, y cefalosporinas de tercera generación), y otras β -lactamas (tales como imipenemo, monobactamas), inhibidores de la β -lactamasa, vancomicina, aminoglicósidos y espectinomina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, clindamicina, rifampina, metronidazol, polimixinas, doxiciclina, quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina), sulfonamidas, trimetoprim, y quinolinas.

15 Existen una enorme cantidad de agentes antimicrobianos actualmente disponibles para uso en el tratamiento de las infecciones bacterianas, fúngicas y víricas. Para un tratamiento comprehensivo de las clases generales de dichos fármacos y sus mecanismos de acción, los técnicos expertos se refieren a Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Eds. Hardman y col., 9ª Edición, publicada McGraw Hill, capítulos 43 a 50, 1996. En general, estos agentes incluyen agentes que inhiben la síntesis de la pared celular (*por ejemplo*, penicilinas, cefalosporinas, cicloserina, vancomicina, bacitracina); y los agentes antifúngicos de imidazol (*por ejemplo*, miconazol, ketoconazol y clotrimazol); los agentes que actúan directamente perturban la membrana celular del microorganismo (*por ejemplo*, detergentes tales como polimixina y colistimetato y la nistatina y anfotericina B antifúngicas); los agentes que afectan las subunidades ribosómicas inhiben la síntesis de proteínas (*por ejemplo*, cloranfenicol, las tetraciclinas, eritromicina y clindamicina); agentes que alteran la síntesis de proteínas y conducen a la muerte celular (*por ejemplo*, aminoglicósidos); agentes que afectan al metabolismo del ácido nucleico (*por ejemplo*, las rifamicinas y las quinolonas); los antimetabolitos (*por ejemplo*, trimetoprim y sulfonamidas); y los análogos de ácidos nucleicos tales como zidovudina, gangciclovir, vidarabina, y aciclovir que actúa para inhibir las enzimas víricas esenciales para la síntesis del ADN. Se pueden emplear varias combinaciones de agentes antimicrobianos.

20 La administración simultánea de una composición como se define en las reivindicaciones con uno o más principios activos adicionales y/o agentes inmunoestimuladores (por ejemplo, una composición que comprende una NE y un inmunógeno diferente, un antibiótico, antioxidante, etc.) también parece ser una opción. Pueden potenciarse los procedimientos inmunoestimuladores de la técnica anterior (por ejemplo, los procedimientos de inmunización) y/o las composiciones farmacéuticas mediante la administración simultánea de una composición de la presente invención. En los procedimientos de administración simultánea, los agentes se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse antes de los otro(s) principio(s) activo(s). Las formulaciones farmacéuticas y los modos de administración pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Además, los dos o más agentes administrados simultáneamente pueden administrarse cada uno utilizando diferentes modos (por ejemplo, rutas) o diferentes formulaciones. Los agentes adicionales que se van a administrar simultáneamente (por ejemplo, antibióticos, adyuvantes, etc.) pueden ser cualquiera de los agentes bien conocidos en la materia, que incluyen, pero no de forma limitativa, aquellos que están actualmente en uso clínico.

25 Se puede administrar una composición como se define en las reivindicaciones a un sujeto mediante más de una ruta. Por ejemplo, un sujeto que se beneficiaría de tener una respuesta inmunitaria protectora (por ejemplo, inmunidad) hacia un microorganismo patógeno puede beneficiarse de recibir la administración mucosal (por ejemplo, la administración nasal u otras rutas mucosales descritas en el presente documento) y, adicionalmente, recibir una o más rutas de administración diferentes (por ejemplo, administración parenteral o pulmonar (por ejemplo, mediante un nebulizador, inhalador, u otros procedimientos descritos en el presente documento). La administración mediante la ruta mucosal puede ser suficiente para inducir la inmunidad mucosal, así como la sistémica hacia un inmunógeno u organismo a partir del cual se deriva el inmunógeno. La administración mediante múltiples rutas puede servir para proporcionar la inmunidad mucosal y sistémica. Se contempla que un sujeto al que se ha administrado una composición mediante múltiples rutas de administración (por ejemplo, inmunización (por ejemplo, mucosal, así como administración a través de las vías aéreas o parenteral) puede tener una respuesta inmunitaria más fuerte a un

inmunógeno que un sujeto al que se ha administrado una composición mediante solamente una ruta.

Otros sistemas de administración pueden incluir los sistemas de liberación temporalizada, liberación retardada o liberación continua. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las composiciones, aumentando la conveniencia al sujeto y al médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de la liberación y son conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxi-butírico, y polianhídridos. Se describen las microcápsulas de los anteriores polímeros que contienen fármacos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.075.109. Los sistemas de administración incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como monoglicéridos, diglicéridos y triglicérido; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos cerosos; comprimidos fabricados por compresión utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no de forma limitativa: (a) sistemas erosionables en los que está contenido un agente de la invención en una forma comprendida en una matriz tal como la descrita en las patentes de Estados Unidos números 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de Estados Unidos números 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de administración mediante bomba, algunos de los cuales se están adaptados para su implante.

Una composición que comprende el VSR inactivado con NE puede comprender una cantidad adecuada de dicho inmunógeno para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se administra al sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser suficiente para proporcionar la protección del sujeto (por ejemplo, protección inmunitaria) frente a una posterior exposición al inmunógeno o al microorganismo (VSR) a partir del cual se deriva el inmunógeno. Se puede seleccionar la cantidad de inmunógeno como la cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios graves significativos. La cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico o combinación del mismo se emplea, y puede variar de sujeto a sujeto, dependiendo de numerosos factores que incluyen, pero no de forma limitativa, la especie, edad y dolencia general (por ejemplo, salud) del sujeto, y del modo de administración. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para determinar la cantidad adecuada de inmunógeno administrada a un sujeto para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora (por ejemplo, inmunidad protectora)) en un sujeto.

Se espera que cada dosis comprenda 0,05-5000 µg de cada inmunógeno (por ejemplo, proteína recombinante y/o purificada), por ejemplo, cada dosis comprenderá 1-500 µg, 350-750 µg, 50-200 µg, o 25-75 µg de inmunógeno. Cada dosis puede comprender una cantidad suficiente del inmunógeno para generar una respuesta inmunitaria. Una cantidad eficaz del inmunógeno en una dosis necesaria no necesita cuantificarse, siempre que la cantidad de inmunógeno genere una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se administra al sujeto. Un experto en la técnica puede discernir una cantidad opcional para una administración concreta (por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora (por ejemplo, inmunidad protectora))) utilizando estudios normalizados que implican la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas en sujetos.

Se espera que cada dosis sea de 0,001 a 15 % o más (por ejemplo, 0,001-10 %, 0,5-5 %, 1-3 %, 2 %, 6 %, 10 %, 15 % o más) en peso de inmunógeno. Una dosis de administración inicial o de cebado puede contener uno o más inmunógenos que una dosis de refuerzo posterior.

Cuando se utiliza una NE para inactivar un microorganismo vivo (VSR), se espera que cada dosis (por ejemplo, administrada a un sujeto induzca una respuesta inmunitaria) comprenda entre 10^1 y 10^9 ufp del virus por dosis; entre 10^5 y 10^8 ufp del virus por dosis; entre 10^3 y 10^5 ufp del virus por dosis; entre 10^2 y 10^4 ufp del virus por dosis; 10^1 ufp del virus por dosis; 10^4 ufp del virus por dosis más de 10^9 ufp del virus por dosis o 10^3 ufp del virus por dosis.

Para inactivar los microorganismos vivos (VSR), se puede usar un 0,1 % - 5 % de solución de NE, se puede usar un 5 %-20 % de solución de NE, se puede usar un 20 % de solución de NE, y se puede usar una solución de NE mayor del 20 % a fin de inactivar un microorganismo patógeno. En particular, se puede usar un 15 % de solución de NE.

El microorganismo puede incubarse durante 1-3 horas en NE, durante 3-6 horas en NE, durante más de 6 horas en NE, o durante 3 horas en NE (por ejemplo, un 10 % de solución de NE). La incubación puede llevarse a cabo a 37°C, o a una temperatura mayor que o menor de 37°C. La cantidad de microorganismo utilizado para la inactivación puede depender de numerosos factores que incluyen, pero no de forma limitativa, la cantidad total de composición inmunógena deseada, la concentración de la solución deseada (por ejemplo, antes de la dilución para la administración), el microorganismo y la NE. La cantidad de microorganismo utilizada en el procedimiento de inactivación puede ser la cantidad que produce la cantidad deseada de inmunógeno como se describe en el presente documento que se va a administrar en una única dosis (por ejemplo, diluida a partir de una disolución madre concentrada) a un sujeto.

Se puede formular una composición como se define en las reivindicaciones en una dosis concentrada que se puede diluir antes de la administración a un sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar diluciones de una composición

concentrada a un sujeto de tal manera que el sujeto reciba una cualquiera de más de las dosificaciones específicas proporcionadas en el presente documento. Puede prepararse una dilución de una composición concentrada de tal manera que se administre a un sujeto (por ejemplo, en una única dosis) una composición que comprenda 0,5-50 % del VSR inactivado con NE presente en la composición concentrada. Se puede administrar a un sujeto en una única dosis una composición que comprende un 1 % del VSR inactivado con NE presente en la composición concentrada. Se contempla que las composiciones concentradas sean útiles en un escenario en el que se puede administrar a grandes cantidades de sujetos una composición de la presente invención (por ejemplo, un centro de vacunación, hospital, escuela, etc.). Una composición que comprende un VDR inactivado con NE (por ejemplo, una composición concentrada) puede ser estable a temperatura ambiente durante más de 1 semana, durante más de 2 semanas, durante más de 3 semanas, durante más de 4 semanas, durante más de 5 semanas, y durante más de 6 semanas.

En general, las composiciones en emulsión pueden comprender al menos 0,001 % a 100 %, preferentemente 0,01 a 90 %, de emulsión por ml de composición líquida. Se considera que las formulaciones pueden comprender aproximadamente un 0,001 %, aproximadamente un 0,0025 %, aproximadamente un 0,005 %, aproximadamente un 0,0075 %, aproximadamente un 0,01 %, aproximadamente un 0,025 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,075 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,25 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 1,0 %, aproximadamente un 2,5 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 7,5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 12,5 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 100 % de emulsión por ml de composición líquida. Debe entenderse que se contempla específicamente que un intervalo entre cualquiera de dos figuras relacionadas anteriormente se encuentre abarcado dentro de las medidas y límites de la presente divulgación. Se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia del patógeno específico y del sujeto que se está inmunizando.

Tras una administración inicial de una composición de la presente invención como se define en las reivindicaciones (por ejemplo, una vacunación inicial), un sujeto puede recibir una o más administraciones de refuerzo (por ejemplo, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 4 semanas, alrededor de 5 semanas, alrededor de 6 semanas, alrededor de 7 semanas, alrededor de 8 semanas, alrededor de 10 semanas, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 9 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 5 años, alrededor de 10 años) posteriormente a una primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, y/o más de la décima administración. La reintroducción de un inmunógeno en una dosis de refuerzo parece permitir una inmunidad sistémica vigorosa en un sujeto. El refuerzo puede realizarse con la misma formulación dada para la primera respuesta inmunitaria, o puede ser con una diferente formulación que contiene el inmunógeno. El régimen de dosificación tendrá, al menos en parte, que determinarse por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio de un especialista médico.

Las unidades de dosificación pueden aumentar o disminuir proporcionadamente basándose en diversos factores que incluyen, pero no de forma limitativa, el peso, la edad, y el estado de salud del sujeto. Además, se pueden aumentar o disminuir las unidades de dosificación para las posteriores administraciones (por ejemplo, las administraciones de refuerzo).

Se contemplará que las composiciones de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones encontrarán uso en diversos escenarios, incluyendo escenarios de investigación. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, serán de utilidad en los estudios del sistema inmunitario (por ejemplo, la caracterización de respuestas inmunitarias adaptativas (por ejemplo, respuestas inmunitarias protectoras (por ejemplo, inmunidad mucosal o sistémica))). Los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, abarca sujetos humanos y no humanos y muestras de estos sujetos, y abarcan también las aplicaciones de investigación que utilizan estos sujetos. Las composiciones de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, son también útiles en el estudio y la optimización de las nanoemulsiones, inmunógenos, y otros componentes y para la selección de nuevos componentes.

Las formulaciones pueden someterse a ensayo *in vivo* en numerosos modelos animales desarrollados para el estudio de las rutas de administración mucosales y otras rutas. Como es fácilmente evidente, las composiciones de la presente invención que se definen en las reivindicaciones son útiles para la prevención y/o el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades e infecciones producidas por virus, bacterias, parásitos, y hongos, así como para estimular una respuesta inmunitaria frente a una variedad de antígenos. No solamente pueden las composiciones utilizarse profiláctica o terapéuticamente, como se ha descrito anteriormente, las composiciones se pueden usar también para preparar anticuerpos, policlonales y monoclonales (por ejemplo, para fines diagnósticos), así como para la inmunopurificación de un antígeno de interés. Si se desean anticuerpos policlonales, se puede inmunizar un mamífero seleccionado (por ejemplo, un ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con las composiciones de la presente invención. El animal se refuerza usualmente 2-6 semanas después con una o más administraciones del antígeno. A continuación se pueden obtener antisueros policlonales procedentes de los animales inmunizados y usarse de acuerdo con los procedimientos conocidos (Véase, por ejemplo, Jurgens y col., J. Chrom. 1985, 348:363-370).

5 Puede proporcionarse un kit que comprende una composición que comprende un VSR inactivado con NE. Dicho kit puede proporcionar además un dispositivo para administrar la composición. No existen límites con respecto al tipo de dispositivo incluido en el kit. El dispositivo puede configurarse para la aplicación nasal de la composición (por ejemplo, un aplicador nasal (por ejemplo, una jeringuilla) o inhalador nasal o nebulizador nasal). Un kit puede comprender una composición como se define en las reivindicaciones en una forma concentrada (por ejemplo, que se puede diluir antes de la administración a un sujeto).

10 Todos los componentes del kit pueden estar presentes en un único recipiente (por ejemplo, vial o tubo). Cada componente del kit puede localizarse en un único recipiente (por ejemplo, vial o tubo). Uno o más componentes del kit pueden localizarse en un único recipiente (por ejemplo, vial o tubo) localizándose otros componentes del mismo kit en un recipiente separado (por ejemplo, vial o tubo). Un kit puede comprender un tampón. El kit puede comprender además instrucciones para el uso.

Ejemplos

15 En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); μ (micra); M (Molar); μ M (micromolar); mM (milimolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); ng (nanogramos); l (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nM (nanomolar); °C (grados centígrados); y PBS (solución salina tamponada con fosfato).

Ejemplo 1

20 **Composiciones que comprenden el virus sincitial respiratorio inactivado con una nanoemulsión y procedimientos para utilizar las mismas**

Materiales y procedimientos

Ratones. Los ratones Balb/c se adquirieron a Jackson Laboratories. Todas las operaciones con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la política de la University of Michigan Committee on Use and Care of Animals.

25 Ensayo de placas víricas. Se extrajo el lóbulo derecho de los pulmones de ratones infectados y se molió con arena usando un mortero y un almirez. Las muestras de los pulmones se agitaron 2x o se tomaron tras incubación con nanoemulsión y sobrenadantes diluidos en serie sobre una monocapa confluyente al ~90 % de células Vero. Las muestras se incubaron a 37' con rotación suave durante 2 h, a continuación, los sobrenadantes infectados se retiraron y se sustituyeron con 0,9 % de metilcelulosa. Tras la incubación a 37 °C durante 5 días, se retiró la metilcelulosa, se sustituyó con metanol, y se incubó a -80° C durante 1 h. Tras la retirada del metanol, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el revelado de la placa. Las placas se revelaron usando un protocolo ELISA modificado. En resumen, se bloquearon las células durante 1 h a 37 °C con 25 % de Blotto (leche en polvo diluida con solución salina tamponada con fosfato), se lavaron y se incubaron durante 1 h a 37 °C con Ab policlonal de cabra dirigido contra VSR humano (Chemicon International). Las células se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 h con IgG de oveja dirigido contra IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Serotec). Se lavaron las células y se incubaron a temperatura ambiente con cloronaftol y se enumeraron las placas.

35 Preparación de nanoemulsión de VSR. VSR (cepa Line 19 de VSR (Véase, por ejemplo, Lukacs y col., Immunopathology and Infection, 169, 977-986 (2006)) (2×10^6 ufp) se incubó con 15 % W₈₀5EC nanoemulsión durante 60 minutos, un tiempo determinado en experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la invención para inactivar el virus completamente. La preparación de la vacuna de VSR se realizó de forma reciente para cada una de las inmunizaciones. Cada animal recibió 10 μ l de la emulsión o la emulsión + VSR en el orificio nasal izquierdo en el día 0 y en el día 28. Esto significa que se usó un total de 1×10^4 ufp para la vacunación/ratón.

45 Medida de citoquinas en el lavado broncoalveolar. Se llevó a cabo el lavado broncoalveolar (BAL) en ratones infectados usando 1 ml de PBS estéril. Se centrifugaron las suspensiones celulares y se recogieron los sobrenadantes para el análisis de las citoquinas mediante Bioplex utilizando los kits adquiridos de R&D systems.

50 Dispersión pulmonar y reestimulación de VSR in vitro. Se extrajeron los pulmones después de un lavado con 1 ml de PBS-EDTA y se dispersaron con colagenasa (0,2 %, Tipo IV, Sigma) durante 45 minutos en un baño de agua rotatorio (37 °C). A continuación se contaron las células dispersas. A continuación se sembró en placa la suspensión de células individuales a una concentración de 2×10^6 /ml y se incubó con VSR (MOI-0,5). Se recogieron los sobrenadantes exentos de células después de 36 h y se evaluaron mediante Bioplex para los niveles de citoquinas que se produjeron. Este ensayo permitió a los inventores evaluar la respuesta global en los pulmones de los grupos de ratones vacunados frente a los grupos de ratones no vacunados.

Ejemplo 2**La nanoemulsión inactiva eficazmente el VSR**

A fin de someter a ensayo la capacidad de la emulsión de inactivar VSR, se incubó el VSR (10^6 unidades formadoras de partículas (UFP) con una nanoemulsión a concentraciones variables (0 % - 20 %) y tiempos variables (1 h - 3 h) (Véase la Figura 1). Se determinó el número de virus infeccioso mediante un ensayo de placas utilizando células Vero. Se usó el virus incubado con la nanoemulsión para infectar células Vero subconfluentes. Se visualizaron las placas de VSR utilizando técnicas inmunohistoquímicas. En tan poco como un 1 % de nanoemulsión incubada durante 3 h, no hubo detección de virus activos como se evaluó mediante el ensayo de placas normalizado (Véase la Figura 1). De esta manera, la nanoemulsión es eficaz para destruir completamente el VSR a una concentración del 2 % en tan poco como una hora, o tan poco como un 1 % en tres horas. De acuerdo con ello, se ha proporcionado una nanoemulsión que es eficaz en reducir y/o inactivar completamente la infectividad por VSR.

Ejemplo 3**La inmunización con la nanoemulsión potencia la inmunidad tras el estímulo del VSR**

Se determinó a continuación si la nanoemulsión podría utilizarse como un agente inmunopotenciador para inducir respuestas inmunitarias importantes para la protección frente a la infección por un virus. Para examinar este aspecto, se utilizó un protocolo de inmunización que comprendía la inmunización de animales mediante sensibilización intranasal con un virus inactivado con una nanoemulsión (mezcla de VSR nanoemulsión (15 %) (10 μ l total, 5 μ l /orificio de la nariz)) en el día 0 y se reforzó en el día 28 o la nanoemulsión sola sin VSR como grupo control. A continuación, los animales se estimularon con VSR infeccioso vivo en el día 56 (8 semanas) y se evaluaron para determinar la evidencia de inmunidad protectora. Un objetivo era vigilar la producción de anticuerpos específicos de VSR durante el protocolo de inmunización. Se determinó la inversa del título de anticuerpos específicos de VSR en suero mediante ensayo de inmunoadsorción (ELISA) frente al extracto de proteínas de VSR. Se extrajo la sangre y se recogió el suero en puntos temporales específicos tras la inmunización incluyendo el día 0, 1 semana, 4 semanas y 8 semanas (en el momento del estímulo del VSR) y se evaluó la IgG en suero total específica de VSR. Tal como se muestra en la Figura 2, el título de IgG dirigido contra VSR no se pudo detectar 1 semana después de la inmunización, aumentó después de 4 semanas antes del refuerzo y aumentó significativamente en las 8 semanas después de la inmunización inicial. De esta manera, la inmunización (por ejemplo, la inmunización intranasal) de un sujeto con VSR inactivado mediante nanoemulsión induce una respuesta inmunitaria dirigida contra VSR en un sujeto. Se indujo una respuesta inmunitaria dirigida contra VSR en un sujeto en las cuatro semanas tras la administración al sujeto del VSR inactivado con la nanoemulsión. Se indujo una respuesta inmunitaria dirigida contra VSR en un sujeto tras una segunda administración al sujeto del VSR inactivado con la nanoemulsión (por ejemplo, tras la administración de un "refuerzo"). Se ha proporcionado una composición que comprende un VSR inactivado con una nanoemulsión útil para generar una respuesta inmunitaria específica dirigida contra VSR en un sujeto al que se administró la composición.

Ejemplo 4**La inmunización con la nanoemulsión de VSR induce respuestas inmunitarias antivíricas citotóxicas y de tipo Th1.**

Debido a los graves problemas asociados con otros tipos de vacunas para el VSR (por ejemplo, la generación de una enfermedad exacerbada grave tras infección después de la administración a sujetos de VSR inactivado con formol), se determinó a continuación qué tipo de respuesta inmunitaria se generó tras la administración a sujetos de un VSR inactivado con una nanoemulsión.

La administración de NE-VSR potenció las citoquinas antivíricas en el fluido BAL procedente de las vías aéreas de ratones a los que se estimuló con VSR. Se utilizó 1 ml de lavado de PBS de las vías aéreas y se determinaron los niveles de citoquinas en los pulmones mediante el análisis multiplexado del fluido BAL (Bioplex, R&D systems) procedente de pulmones en el día 8 después del estímulo, un tiempo en el que las citoquinas de los linfocitos T alcanzan un máximo.

Tal como se muestra en la Figura 3, los sujetos a los que se administró (por ejemplo, por vía nasal) VSR inactivado con nanoemulsión, presentó cantidades crecientes de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos del péptido M2 en comparación con el grupo control de inmunización de la nanoemulsión. Se determinó el número de linfocitos T CD8⁺ específicos de M82-90 de VSR mediante análisis citométrico de flujo pulmonar enzimáticamente digerido en el día 4 después del estímulo usando un tetrámero de clase I específico de MHC que reconoce específicamente el TCR del péptido inmunodominante de M82-90. Además, la evaluación de un entorno antivírico en las vías aéreas utilizando el fluido BAL indicó una producción aumentada de IFN- γ e IL-17 en los sujetos, pero no un aumento en las citoquinas Th2 patógenas, IL-4, IL-5 y IL-13, durante la etapa de estimulación vírica (Véase la Figura 4). Tal como se ha descrito anteriormente, se ha identificado que las citoquinas de tipo Th2 tienen un papel causativo en los ensayos de vacunas anteriores llevados a cabo con VSR inactivado con formol. Además, la citoquina Th2, interleuquina-13 (IL-13), es un mediador de la secreción de moco pulmonar (Véase Hershey, G. K. 2003. J. Allergy Clin. Immunol. 111:677-690, Walter y col., 2001 J. Immunol. 167:4668-4675; Zhu y col., 1999 J. Clin. Investig. 103:779-788) y se

encuentran linfocitos T específicos de VSR que expresan IL-13 en bronquiolitis por VSR (deWaal, 2003 J. Med. Virol. 70:309-318). De esta manera, se han proporcionado composiciones inmunógenas que comprenden NE inactivan VSR y los procedimientos para utilizar las mismas generan respuestas inmunitarias a VSR en un sujeto sin producción potenciada de moco, constricción de las vías aéreas, hipersensibilidad de las vías aéreas, atrapamiento de aire, hipoxia y/o el colapso parcial del pulmón (por ejemplo, dando como resultado la expresión potenciada de citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-13)).

Para evaluar adicionalmente la respuesta de las citoquinas en sujetos que recibieron NE-RSV, se aislaron pulmones de animales que o bien no estaban infectados, o bien se habían vacunado y estimulado y se compararon con animales sin vacunar y estimulados con VSR. Se extirparon los pulmones y se dispersaron con colagenasa en una suspensión de células individuales seguido por una reestimulación in vitro con el virus. Los leucocitos pulmonares totales se aislaron de pulmones de ratones de control sin infectar (UC), vacunados y estimulados (Vaccine), o ratones de control estimulados con VSR (sin vacunar). Se cultivaron las células a una concentración de 2×10^6 /ml durante 36 horas en presencia de VSR vivo (MOI = 0,5). Se midieron las concentraciones de citoquina en los sobrenadantes mediante el ensayo multiplexado bioplex.

Se observó que aunque la producción de IL-17 se reguló de nuevo significativamente en exceso y aumentó IFN, la citoquina IL-4 de tipo Th2 no se alteró (Véase la Figura 5). De esta manera, la vacunación con NE-VSR no presensibiliza a los ratones a una respuesta más patógena (por ejemplo, en contraste con los resultados obtenidos con el VSR inactivado con formol). Un aumento en IFN- γ e IL17 parece reflejar un entorno inmunitario antivírico inducido por un protocolo de inmunización con VSR inactivado con una nanoemulsión.

Muy importante para el resultado de cualquier protocolo de inmunización es determinar si existe un aumento en el aclaramiento vírico después de la inmunización y exposición al virus vivo. Se inmunizaron los ratones dos veces por vía intranasal por separado durante cuatro semanas con 10^6 UFP de VSR en 15 % de NE (NE-VSR), o 15 % de NE sola (NE) como control. A continuación se estimularon los ratones cuatro semanas después de la segunda vacunación (un total de ocho semanas), y se determinó el número de partículas de virus viables mediante ensayo de placas de los pulmones del lado derecho. Cuando se evaluaron los sujetos mediante el ensayo de placas para determinar los recuentos de virus vivos presentes en los pulmones de sujetos vacunados y posteriormente infectados víricamente, los sujetos inmunizados con VSR en nanoemulsión demostraron un aclaramiento aumentado significativo (placas víricas disminuidas) en comparación con los sujetos sin inmunizar (véase la Figura 6). De esta manera, la administración de VSR inactivado con nanoemulsión (NE-VSR) establece una respuesta protectora en sujetos.

Ejemplo 5

Inmunización de VSR con la nanoemulsión y asma alérgica

Los estudios epidemiológicos han sugerido un vínculo entre la infección grave inicial por VSR y el posterior desarrollo del asma alérgica. De esta manera, para determinar si la vacunación con NE-VSR seguida por el estímulo con el virus vivo afectaría a la posterior respuesta a un modelo de asma alérgica, los ratones se vacunaron dos veces con NE-RSV, se estimularon intranasalmente con 10^5 UFP de VSR, y se sensibilizaron con el alérgeno de la cucaracha. En este modelo, los ratones reciben una administración intraperitoneal/subcutánea de alérgeno de cucaracha de calidad de ensayo clínico cutáneo (100 Ig) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund en el día 21 después del estímulo del VSR. Los ratones recibieron a continuación un estímulo intranasal cuarenta días después (15 Ig) y dos estímulos intratraqueales (40 Ig) cinco y siete días después del estímulo intranasal. Se evaluaron los ratones para determinar la enfermedad alérgica 24 horas después del último estímulo intratraqueal.

Uno de los hitos de la enfermedad pulmonar alérgica es la hipersecreción de moco. En comparación con los ratones sin vacunar, los ratones NE-VSR vacunados presentaron respuestas mucosales atenuadas inducidas por alérgenos como se evaluó mediante la tinción de Schiff ácida periódica (PAS) de secciones histológicas de pulmón (Véase la Figura 8), así como la expresión reducida del gen del moco *Gob5* en el ARN total de pulmón (Véanse las Figuras 7 y 8). Análogamente al estímulo vírico solo, los animales vacunados con NE-VSR estimulado con alérgeno tuvieron una inducción significativamente mayor de IL-17 en los pulmones, como se evaluó mediante QPCR (Véase la Figura 9A). Las citoquinas Th2 son importantes para promover la enfermedad pulmonar alérgica. Los ratones vacunados con NE-VSR presentaron una producción atenuada de citoquinas de tipo Th2, incluyendo IL-4 (pulmones homogeneizados y BAL) e IL-5 (pulmones) (Véase la Figura 9B). Se señaló una tendencia hacia la disminución del ARNm de IL-13, también. No hubo potenciación de la enfermedad alérgica en animales vacunados con NE-VSR. Adicionalmente, los ratones vacunados tuvieron una expresión significativamente menor del marcador de macrófagos activado alternativamente Fizz-1. Como alternativa, los macrófagos activados se asociaron con respuesta de tipo Th2, así como enfermedad fibrótica. La disminución en Fizz-1 parece reflejar una consecuencia de la disminución de citoquinas Th2 en ratones vacunados, y proporciona también un mecanismo por el cual, la vacunación de NE-VSR protege frente al posterior desarrollo de la enfermedad pulmonar alérgica.

Ejemplo 6**La inmunización de VSR con la nanoemulsión induce la producción de anticuerpos específicos de VSR**

5 La vacunación intranasal de ratones con NE/VSR da como resultado la producción de anticuerpos específicos de VSR. Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención para determinar si la vacunación con NE-VSR estimularía respuestas de anticuerpos en sujetos a los que se administró la composición de NE-VSR (por ejemplo, implicada en la protección frente a la infección por el virus). Se utilizó un protocolo de inmunización con ratones vacunados que recibieron dos dosis intranasales de NE-RSV, separadas por 28 días. Se inmunizaron los ratones con NE/VSR que contenía 10^5 partículas del virus Line 19 en el día 0 y el día 28. Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos de VSR total en suero en el día 55 mediante ELISA utilizando extracto de proteína de VSR purificado. Tal como se muestra en la Figura 10, se generaron respuestas específicas de VSR significativas sistémicamente tras la vacunación con NE-VSR (Véase por ejemplo, Figura 10A). Estas incluyeron la inducción drástica de la Ig específica de VSR total, sin la potenciación en el título de IgE específica de VSR (Véase, por ejemplo, Figura 10A).

15 Se llevaron a cabo también experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención a fin de determinar si la vacunación promovería la inducción de anticuerpos específicos de VSR localmente en los pulmones. Se evaluó la presencia de Ig e IgA total específicas de VSR mediante ELISA de muestras de lavado broncoalveolar (BAL) en el día 2 después del estímulo intratraqueal con el VSR vivo (10^5). Específicamente, se determinaron los niveles de anticuerpos específicos de VSR total en suero en el día 55 mediante ELISA utilizando extracto de proteína de VSR purificado. Se evaluó la Ig medida a partir del suero en muestras diluidas 1:1600, se evaluaron otras muestras a 1:50. (B)

25 Como se muestra en la Figura 10B, en comparación con los ratones del control sin vacunar (Ctrl no expuesto anteriormente a tratamiento) y con los ratones que recibieron un estímulo primario con NE-VSR (VSR primario), los ratones vacunados recibieron dos dosis intranasales de NE-VSR separadas por 28 días (NE-VSR) que mostraron una IgA específica de VSR aumentada y una Ig total específica de VSR en el fluido de lavado broncoalveolar en el día 2 después del estímulo con el virus vivo (Véase, por ejemplo, Figura 10B). Estos datos demuestran claramente que la vacunación con NE-VSR induce anticuerpos específicos de VSR significativos, y potencia la inducción local de anticuerpos específicos de VSR tras el estímulo del virus vivo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende un virus sincitial respiratorio inactivado con una nanoemulsión (VSR).
- 5 2. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en la que la nanoemulsión utilizada para inactivar el virus sincitial respiratorio (VSR) comprende una fase acuosa, una fase oleosa, y un disolvente.
3. La composición inmunógena de la reivindicación 1 o 2, en la que la nanoemulsión utilizada para inactivar el virus sincitial respiratorio (VSR) comprende
 - 10 a) aproximadamente 5 % en vol. de TWEEN 80, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente 64 % en vol. de aceite, y aproximadamente 22 % en vol. de agua, o
 - b) aproximadamente un 5 % en vol. de TWEEN 20, aproximadamente 8 % en vol. de etanol, aproximadamente 1 % en vol. de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente 64 % en vol. de aceite, y aproximadamente 22 % en vol. de agua.
- 15 4. La composición inmunógena de la reivindicación 1 a 3, en la que la composición comprende 1,0 % - 10 %, 5 % - 15 %, 10 % - 20 %, 20 % - 30 %, 30 % - 40 %, 40 % - 50 %, o 50 % - 60 % de una solución en nanoemulsión.
5. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición comprende entre 10 y 10^{10} unidades formadoras de placa (PFU) del virus sincitial respiratorio.
6. La composición inmunógena de la reivindicación 5, en la que dicha composición comprende 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 unidades formadoras de placa (PFU) de virus sincitial respiratorio.
- 20 7. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición es térmicamente estable.
8. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además comprende un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. La composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un adyuvante.
10. Una vacuna que comprende la composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. La vacuna de la reivindicación 10 formulada para su administración a una superficie mucosa.
12. Una composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus sincitial respiratorio.

30

FIGURA 1

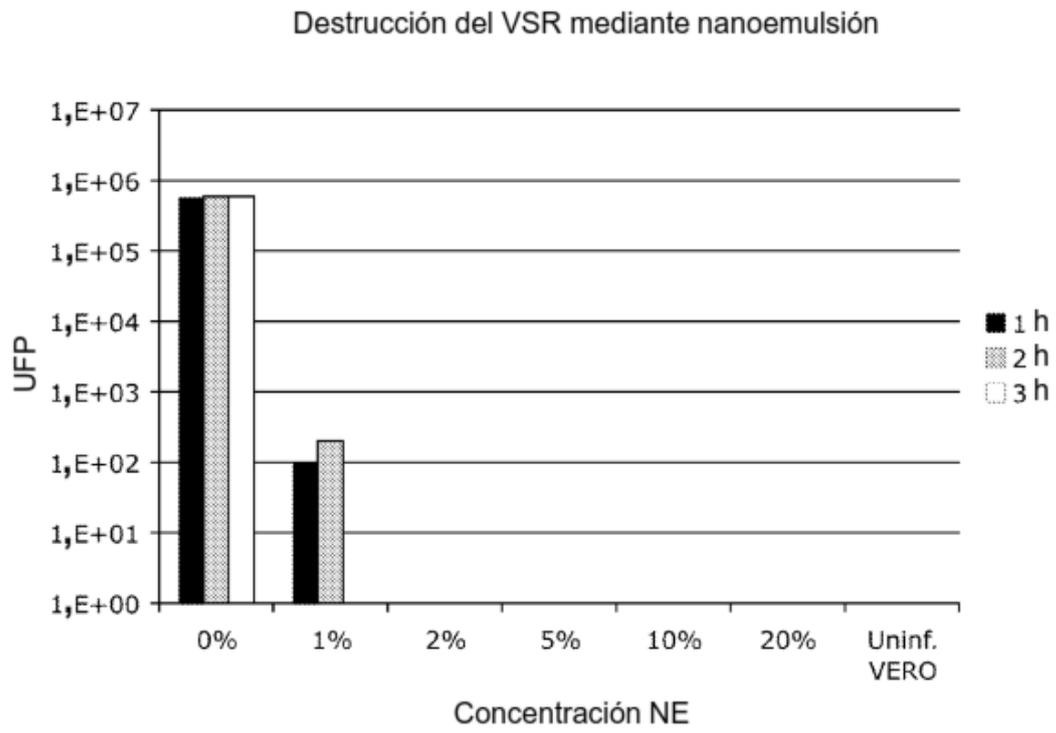


FIGURA 2

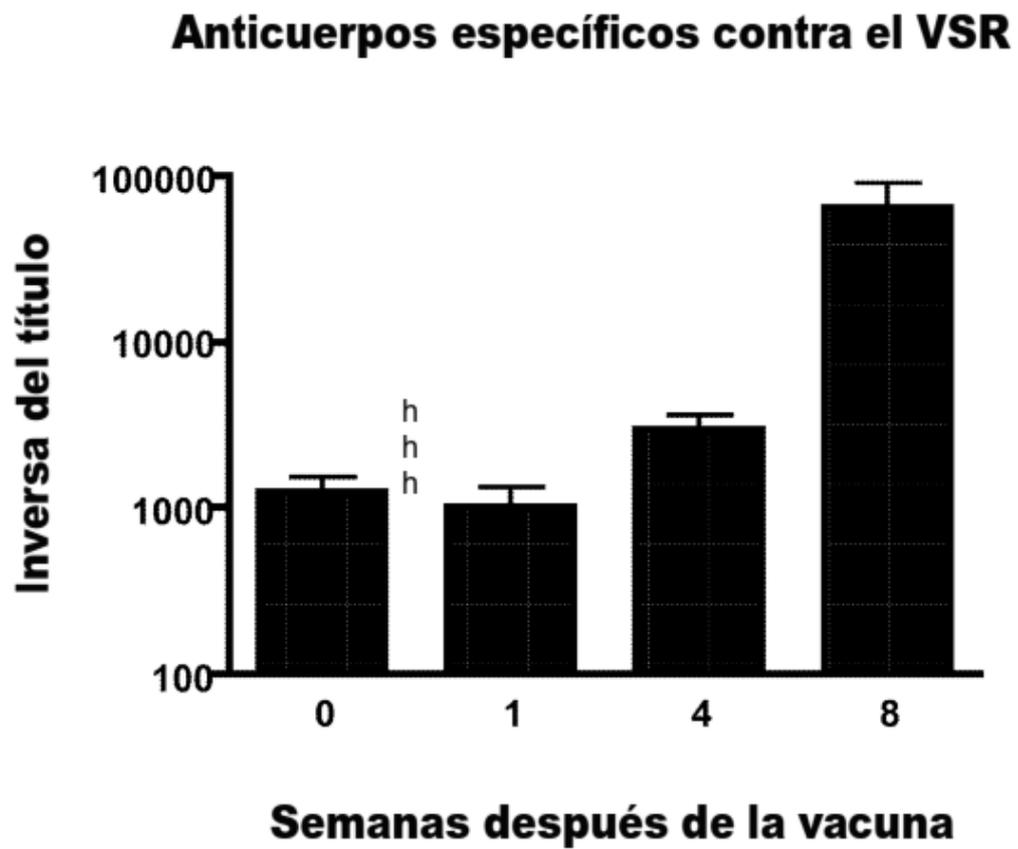


FIGURA 3

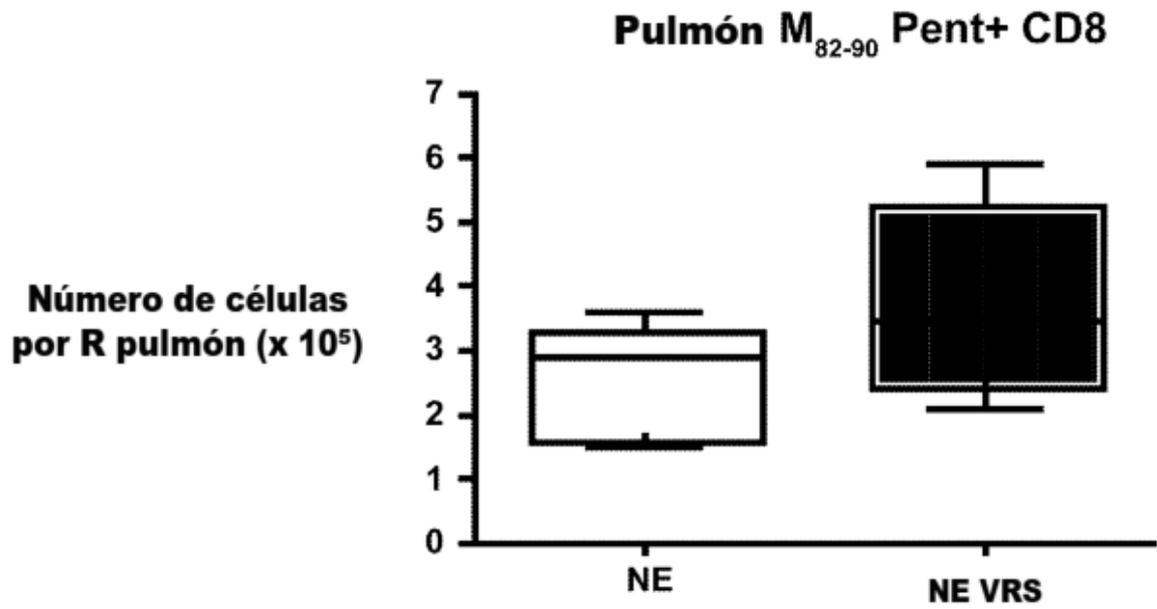


FIGURA 4

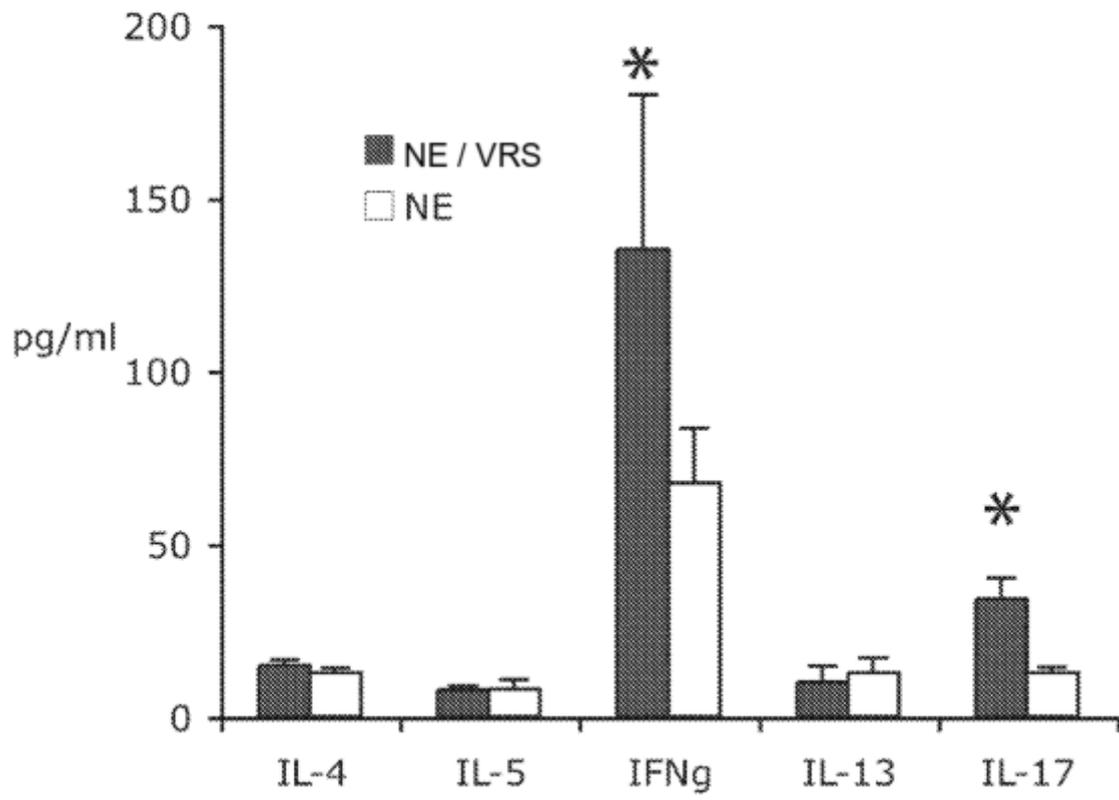


FIGURA 5

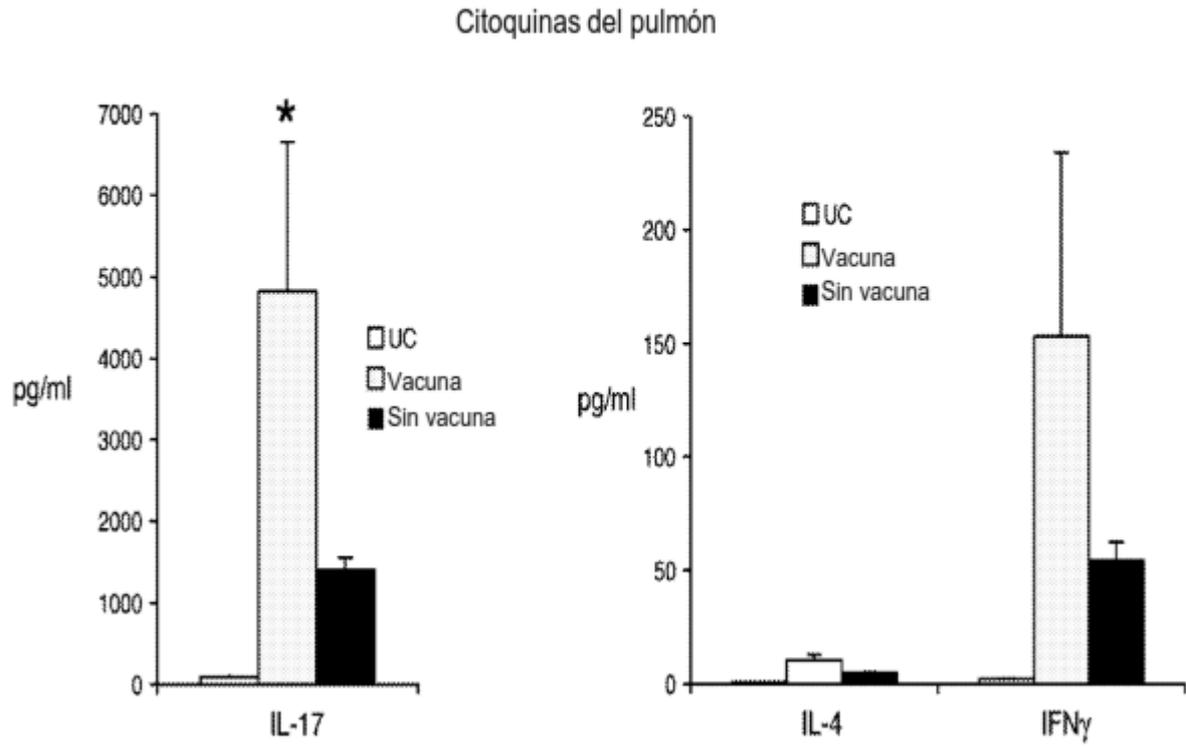


FIGURA 6

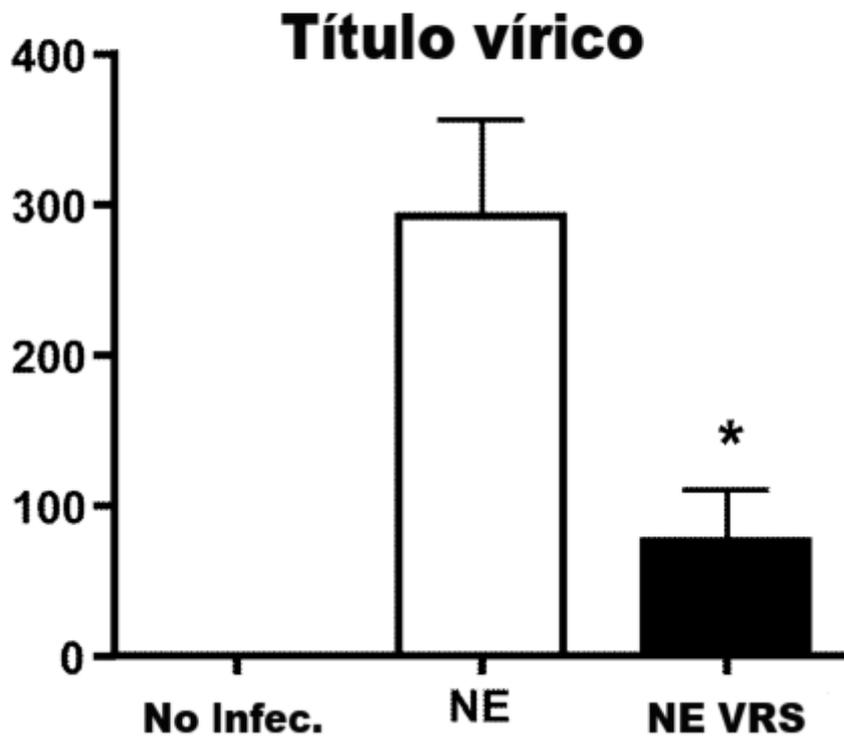


FIGURA 7

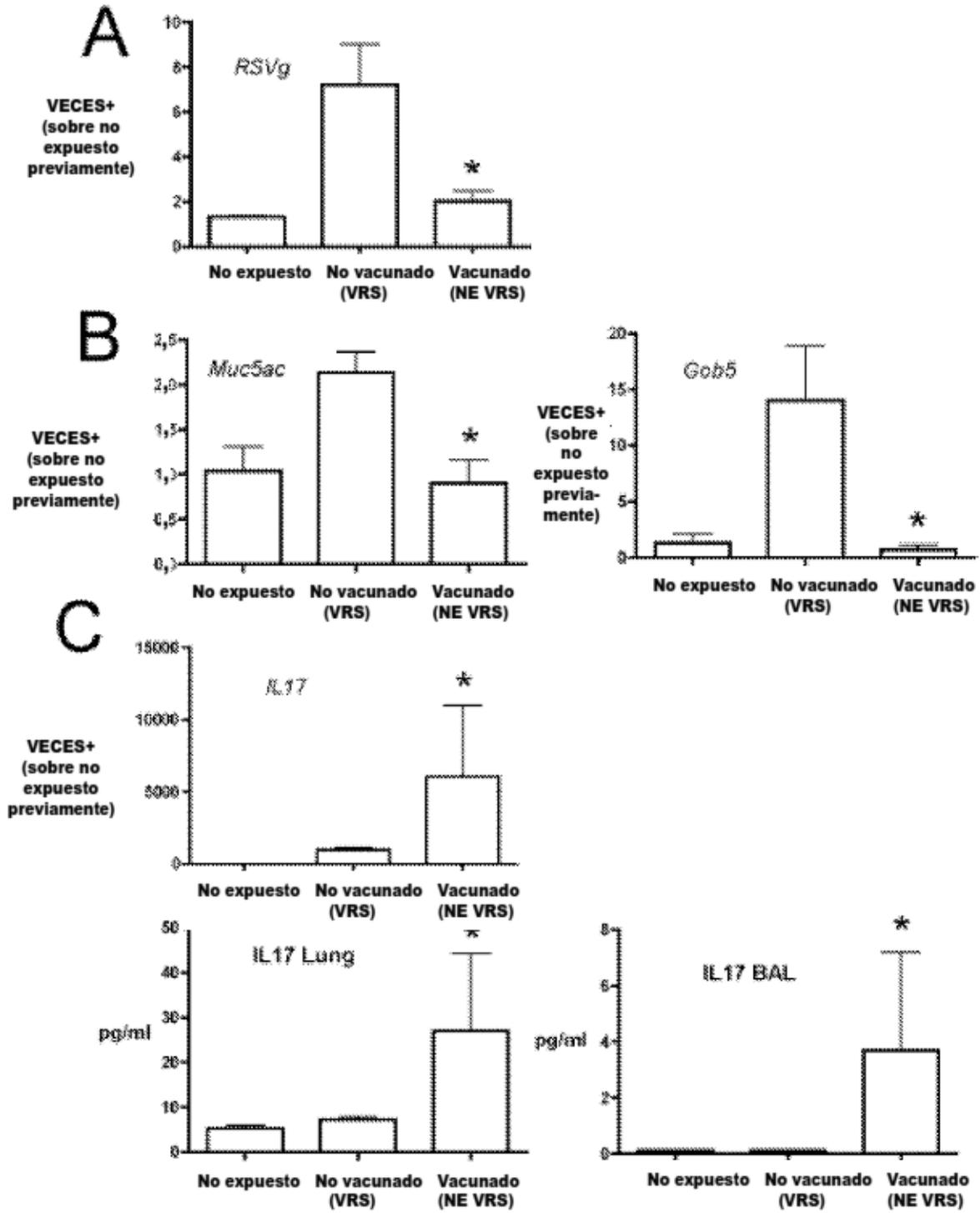


FIGURA 8

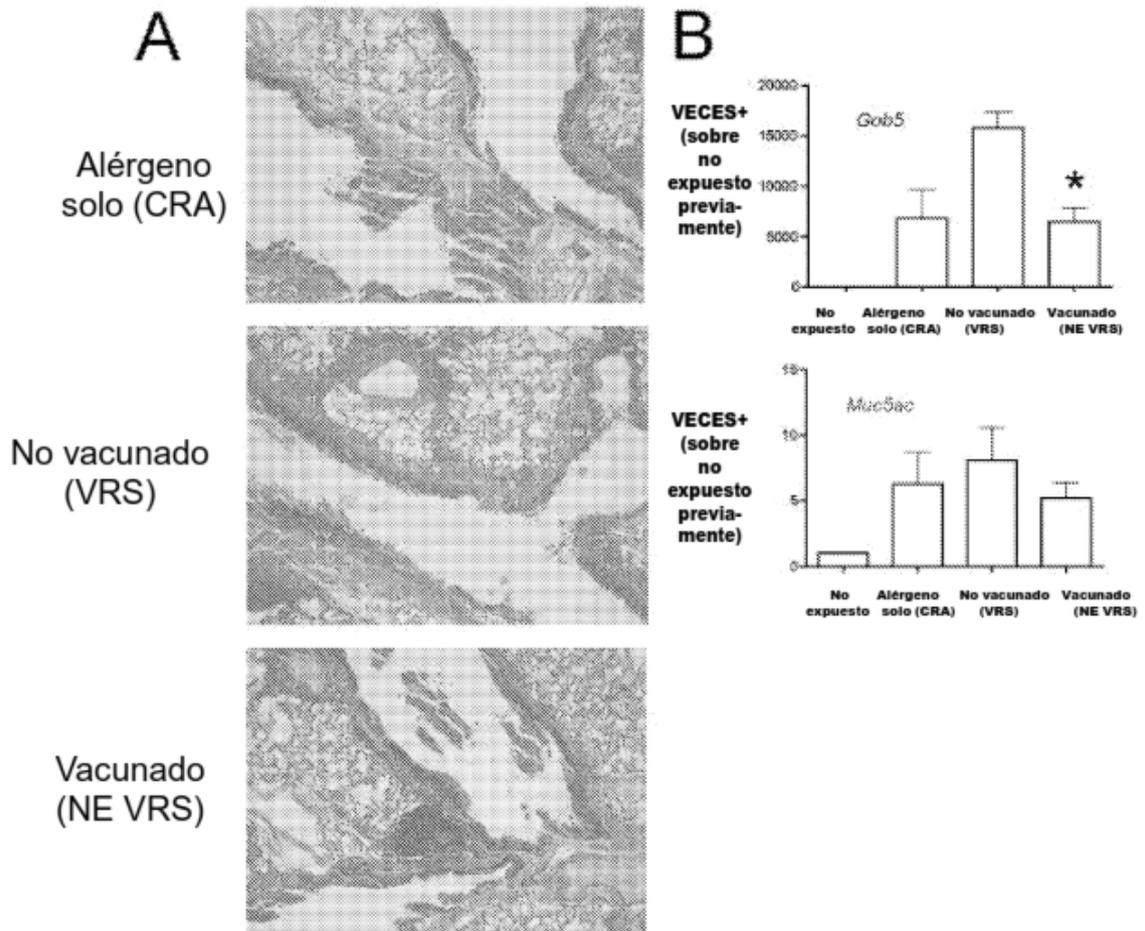
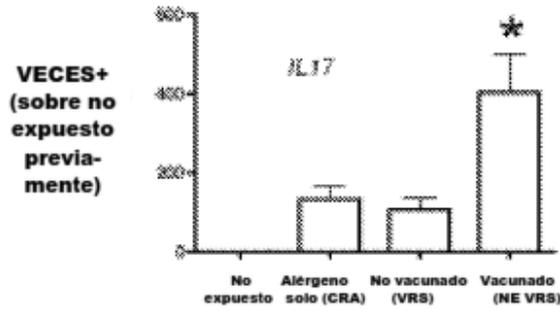


FIGURA 9

A



B

