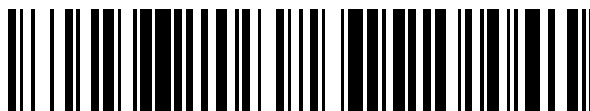


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 710**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010** **E 10812803 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2506834**

54 Título: **Circulación de componentes durante la homogeneización y de microfluidización de emulsiones**

30 Prioridad:

**03.12.2009 US 283518 P**

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

**09.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 573 710 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).

**Circulación de componentes durante la homogeneización y de microfluidización de emulsiones****Descripción**5 **ÁREA TÉCNICA**

[0001] Este invento es del área de fabricación de adyuvantes de emulsiones de aceite en agua para vacunas por medio de micro-fluidización.

10 **ANTECEDENTES DE LA INDUSTRIA**

15 [0002] El adyuvante de vacuna conocido como 'MF59' [1-3] es una emulsión de aceite en agua submicrónica de escualeno, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80), y trioleato de sorbitano (también conocido como Span 85). También podría incluir a iones de citrato, por ejemplo, 10 mM de amortiguador de citrato de sodio. La composición de la emulsión por volumen puede ser de alrededor de un 5% de escualeno, alrededor de un 0.5 por ciento de Tween 80 y alrededor de un 0.5 por ciento de Span 85. El adyuvante y su producción son descritos en mayor detalle en el capítulo 10 de la referencia 4, en el capítulo 12 de la referencia 5 y en el capítulo 19 de la referencia 6.

20 [0003] Tal como se describió en la referencia 7, MF59 es fabricado en una escala comercial al dispersar a Span 85 en la fase de escualeno y a Tween 80 en la fase acuosa, seguido por una mezcla a altas temperaturas para formar una emulsión gruesa. Esta emulsión gruesa es pasada entonces repetidamente a través de un microfluidizador para producir una emulsión que tiene un tamaño uniforme de gotas de aceite. Tal como se describió en la referencia 6, la emulsión microfluidizada es filtrada entonces a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para remover cualquier gota grande de aceite, y el tamaño medio de las gotas de la emulsión resultante permanece sin cambios durante por lo menos 3 años a 4 °C. El contenido de escualeno de la emulsión final puede medirse tal como se describió en la referencia 8.

30 [0004] Tal como se describió en la referencia 84, el MF59 puede ser utilizado como la partícula base en la formación de emulsiones submicrónicas con surfactantes iónicos para su uso en una preparación de micropartículas. Las mezclas escualeno/surfactante podrían ser emulsionadas con un 0.5 por ciento de Tween 80/H<sub>2</sub>O a 5 ml de escualeno/100 ml de H<sub>2</sub>O. Una pre-emulsión podría formarse por medio de homogeneización con un homogeneizador Silverson (5 minutos, 5000 revoluciones por minuto) y las emulsiones finales pueden ser hechas por medio de microfluidización (-10,000 psi), 5 pases, microfluidizador 110S).

35 [0005] Las emulsiones de aceite en agua contienen gotas de aceite. Las gotas más grandes de aceite contenidas en estas emulsiones podrían actuar como lugares para nucleación para aglutinamientos, que conllevan a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento.

40 [0006] Es un objetivo del invento el suministrar métodos adicionales y mejorados para la producción de emulsiones microfluidizadas de aceite en agua (tales como MF59), en particular métodos que son adecuados para su uso en una escala comercial y que suministran una homogeneización y microfluidización mejoradas para suministrar emulsiones con menos cantidad de partículas grandes.

45 **PRESENTACIÓN DEL INVENTO**

50 [0007] El invento suministra un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende a escualeno, el método comprende el paso de: (b) la microfluidización de una primera emulsión que tiene un primer tamaño promedio de gotas de aceite para formar una 2<sup>a</sup> emulsión que tiene un 2<sup>o</sup> tamaño promedio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño promedio de gotas de aceite, donde la 2<sup>a</sup> emulsión es formada al circular a los segundos componentes de emulsión al transferir a los segundos componentes de emulsión desde un primer contenedor de emulsiones, a través de un primer dispositivo de microfluidización a un 2<sup>o</sup> contenedor de emulsiones, y entonces a través de un 2<sup>o</sup> dispositivo de micro-fluidización, donde el primer y el 2<sup>o</sup> dispositivo de micro-fluidización son los mismos que se definieron en la reivindicación 1.

55 [0008] El método de este invento comprende a un paso anterior a (a) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño promedio de gotas de aceite.

60 [0009] Opcionalmente, el método de este invento comprende el paso de (c) la filtración de la 2<sup>a</sup> emulsión.

65 [0010] Tal como se describe en mayor detalle más adelante, la primera emulsión podría tener un tamaño promedio de gotas de aceite de 5000 nm o menos, por ejemplo, un tamaño promedio de entre 300 nm y 800 nm. El número de gotas de aceite en la primera emulsión con un tamaño menor que 1.2  $\mu\text{m}$  podría ser  $5 \times 10^{11}$ /mililitros o menos, tal como se describe más adelante. Las gotas de aceite con un tamaño menor que 1.2  $\mu\text{m}$  tienen desventajas puesto que pueden causar inestabilidad de la emulsión debido a la aglomeración y a la unión de las gotas [14].

[0011] Después de la formación, la primera emulsión es sujeta a por lo menos un pase de micro-fluidización para formar a la 2ª emulsión que tienen un tamaño reducido promedio de gotas de aceite. Tal como se describe más adelante, el tamaño promedio de las gotas de aceite de la 2ª emulsión podría ser de 500 nm o menos. El número de gotas de aceite en la 2ª emulsión tienen un tamaño menor que 1.2 µm pudiendo ser  $5 \times 10^{10}$ /mililitros o menos, tal como se describe más adelante. Para alcanzar estas características podría ser necesario pasar a los componentes de la emulsión a través de un dispositivo de micro-fluidización varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veces.

[0012] La 2ª emulsión podría ser filtrada entonces, por ejemplo, a través de una membrana hidrofílica de polietersulfona, para dar una emulsión de aceite en agua que puede ser adecuada para su uso como un adyuvante de vacuna. El tamaño promedio de gotas de aceite de la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración podría ser de 220 nm o menos, por ejemplo, entre 135-175 nm, entre 145-165 nm, o alrededor de 155 nm. El número de gotas de aceite que tienen un tamaño  $>1.2 \mu\text{m}$  presentes en la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración podría ser  $5 \times 10^8$ /mililitros o menos, por ejemplo,  $5 \times 10^7$ /mililitros o menos,  $5 \times 10^6$ /mililitros o menos,  $2 \times 10^6$ /mililitros o menos o  $5 \times 10^5$ /mililitros o menos.

[0013] La emulsión final de aceite en agua formada después de la filtración podría tener por lo menos  $10^2$  veces menos gotas de aceite que tienen un tamaño menor que 1.2 µm en comparación de la primera emulsión, e idealmente por lo menos  $10^3$  veces menos (por ejemplo,  $10^4$  veces menos).

[0014] En algunas secciones, más de un ciclo de los pasos (i) y (ii) son utilizados antes del paso (iii). Asimismo, varias repeticiones de los pasos individuales (i) y (ii) pueden utilizarse.

[0015] En general, el método es realizado entre temperaturas de 20-60 °C, e idealmente a  $40 \pm 5$  °C. Aunque el primer y el 2º componentes de emulsión podrían ser relativamente estables aun a temperaturas altas, la descomposición térmica de algunos componentes todavía puede ocurrir así que se prefieren temperaturas más bajas.

#### **Componentes de emulsiones**

[0016] El tamaño promedio de las gotas de aceite (es decir, el tamaño del diámetro promedio de las gotas de aceite de la emulsión) podría medirse utilizando una técnica dinámica de dispersión de luz, tal como se describe en la referencia 13. Un ejemplo de una máquina de medición dinámica de dispersión de luz es el analizador de tamaños de partículas submicrónicas Nicomp 380 (de Particle Sizing Systems).

[0017] El número de partículas que tienen un tamaño mayor que 1.2 µm podría medirse utilizando un contador de partículas tal como el Accusizer™ 770 (de Particle Sizing Systems).

[0018] Métodos del invento son utilizados en la fabricación de emulsiones de aceite en agua. Éstas emulsiones incluyen a 3 ingredientes principales: un aceite; un componente acuoso; y un surfactante.

[0019] Puesto que las emulsiones tienen el propósito de un uso farmacéutico, entonces el aceite comúnmente será biodegradable (capaz de metabolizarse) y biocompatible.

[0020] El aceite utilizado comprende a escualeno, un aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide ramificado y no saturado (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>; [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>))<sub>2</sub>=CHCH<sub>3</sub>)]<sub>2</sub>; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS 7683-64-9). RN

[0021] El aceite de este invento podría comprender a una mezcla (o combinación) de aceites que comprenden al escualeno y a por lo menos un aceite adicional.

[0022] Adicionalmente a usar escualeno, una emulsión podría comprender a un aceite o aceites incluyendo a aquellos de, por ejemplo, un animal (tal como pescados) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen a nueces, semillas y granos. El aceite de nuez, el aceite de soya, el aceite de coco y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, son ejemplos de aceite de nuez. El aceite de jojoba podría ser utilizado, por ejemplo, obtenido de los granos de jojoba. Los aceites de semillas incluyen al aceite de cártamo, el aceite de semillas de algodón, el aceite de semillas de girasol, el aceite de semillas de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más comúnmente disponible, pero el aceite de otros granos cereales tales como de trigo, de avena, de centeno, de arroz, de teff, de triticale y similares también pueden ser utilizados. Aunque los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y de 1,2-propanediol no ocurren naturalmente en aceites de semillas, podrían ser preparados por medio de hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados iniciando desde los aceites de nueces y de semillas. La grasa y los aceites de la leche de mamíferos son capaces de ser metabolizados y por lo tanto podrían ser utilizados. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la industria.

[0023] La mayoría de peces contienen aceites que son capaces de ser metabolizados que podrían ser obtenidos

fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígados de tiburones, y aceites de ballenas tales como esperma de ballena son algunos ejemplos de aceites de pescados que podrían ser utilizados de acuerdo a este documento. Un número de aceites de cadenas ramificadas son sintetizados bioquímicamente en unidades de isoprenos de 5-carbonos y son denominadas generalmente como terpenoides. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también puede ser utilizado. Los aceites de pescados, incluyendo el escualeno y el escualano, son fáciles de encontrar de fuentes comerciales o podrían ser obtenidos por métodos conocidos en la industria.

**[0024]** Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con el escualeno. Donde la fase de aceite de una emulsión incluye a un tocoferol, cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\xi$  pueden ser utilizados, pero los  $\alpha$ -tocóferoles son preferidos. El D- $\alpha$ -tocóferol y el DL- $\alpha$ -tocóferol pueden ser utilizados. Un  $\alpha$ -tocóferol preferido es el DL- $\alpha$ -tocóferol. El tocoferol puede tomar algunas formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen a sales orgánicas, tales como succinatos, acetatos, nicotinatos, etcétera. Si una sal de este tocoferol va a ser usada, la sal preferida es el succinato. Una combinación de aceites comprendida de escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- $\alpha$ -tocóferol) puede ser utilizada.

**[0025]** El componente acuoso puede ser simplemente agua (por ejemplo, w.f.i.) o puede incluir a componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, podría incluir a sales para formar un amortiguador, por ejemplo, sales de citrato o de fosfato, tales como sales de sodio. Amortiguadores comunes incluyen: un amortiguador de fosfato; un amortiguador de Tris; un amortiguador de borato; un amortiguador de succinato; un amortiguador de histidina; o un amortiguador de citrato. Los amortiguadores comúnmente estarán incluidos en un rango de 5-20 mM.

**[0026]** El surfactante es preferiblemente biodegradable (que puede metabolizarse) y biocompatible. Los surfactantes pueden ser clasificados por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo - hydrophile/lipophile balance), donde un HLB que está en el rango de 1-10 significa generalmente que el surfactante es más soluble en aceite que en agua, y un HLB en el rango de 10-20 es más soluble en agua que en aceite. Las emulsiones contienen preferiblemente a por lo menos un surfactante que tiene un HLB de por lo menos 10, por ejemplo, por lo menos 15, o preferiblemente por lo menos 16.

**[0027]** El invento puede ser utilizado con surfactantes incluyendo, pero sin limitarse a: los surfactantes de ésteres de sorbitano de polioxietileno (referidos comúnmente como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO - ethylene oxide), óxido de propileno (PO - propylene oxide), y/o óxido de etileno (BO - butylene oxide), vendido bajo la marca comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros lineares de bloques EO/PO; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos repetidores de etoxi (oxi-1,2-etanedilo) con octoxinol-9 (Tritón X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de un interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como surfactantes Brij), tales como éter de monolaurilo detrietilenglicol (Brij 30); éter de polioxietileno-9-laurilo; y ésteres de sorbitano (conocidos comúnmente como los SPANs), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Surfactantes preferidos para incluirse en las emulsiones son el polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de sorbitano de polioxietileno), el Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Tritón X-100.

**[0028]** Mezclas de surfactantes también pueden ser incluidas en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Tritón X 100. Una combinación de ésteres de sorbitano de polioxietileno tal como el monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80) y un octoxinol tal como el t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100) también es adecuada. Otra combinación útil comprende a Laureth 9 + un éster de sorbitano de polioxietileno y/o un octoxinol. Mezclas útiles pueden comprender a un surfactante con un valor HLB en el rango de 10-20 (por ejemplo, Tween 80, con un HLB de 15.0) y un surfactante con un valor HLB en el rango de 1-10 (por ejemplo, Span 85, con un HLB de 1.8).

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

**[0029]** Antes del paso de micro-fluidización, los componentes de la emulsión son mezclados para formar a una primera emulsión.

**[0030]** Las gotas de aceite en la primera emulsión pueden tener un tamaño promedio de 5000 nm o menos, por ejemplo 4000 nm o menos, 3000 nm o menos, 2000 nm o menos, 1200 nm o menos, 1000 nm o menos, por ejemplo, un tamaño promedio de entre 800 nm y 1200 nm o entre 300 nm y 800 nm.

**[0031]** En la primera emulsión el número de gotas de aceite con un tamaño superior a 1.2 micrómetros podría ser de  $5 \times 10^{11}$ /mililitros o menos, por ejemplo,  $5 \times 10^{10}$ /mililitros o menos o  $5 \times 10^9$ /mililitros o menos.

**[0032]** La primera emulsión es microfluidizada para formar una 2ª emulsión en la que las gotas de aceite tengan un tamaño promedio menor que la primera emulsión y/o menos gotas de aceite con un tamaño superior a 1.2 micrómetros.

**[0033]** El tamaño promedio de gotas de aceite de la primera emulsión se logra al mezclar a los componentes de la primera emulsión en un homogeneizador. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1, pueden combinarse en un

contenedor de mezcla (12) y luego los componentes combinados pueden ser introducidos (13) en un homogeneizador mecánico, tal como un homogeneizador de rotor-estator (1).

5 **[0034]** Los homogeneizadores pueden operar en una forma vertical y/u horizontal. Para conveniencia en una configuración comercial, se prefieren a los homogeneizadores en línea.

10 **[0035]** Los componentes son introducidos en un homogeneizador con rotor-estator y se encuentran con un rotor que gira rápidamente que contiene ranuras o agujeros. Los componentes son lanzados por medio de una centrifugación hacia afuera en una forma similar a una bomba y pasan a través de las ranuras/agujeros. En algunas secciones, el homogeneizador incluye a varias combinaciones de motores y de estatores, por ejemplo, una configuración concéntrica de anillos de peines-dientes, tal como se muestra por las características (3) y (4); (5) y (6) y (7) y (8) en la figura 1 y en la figura 2. Los rotores en homogeneizadores útiles a larga escala podrían tener anillos de peines-dientes en el filo de un impulsor orientado horizontalmente que tiene varias láminas (por ejemplo, la característica (9) en la figura 1) alineada de cerca con dientes que se emparejan en un revestimiento estático. La primera emulsión se forma por medio de una combinación de turbulencia, cavitación y desmenuzamiento mecánico que ocurre dentro del vacío entre el rotor y el estator. Los componentes son introducidos en una forma útil en una dirección paralela al eje del rotor.

20 **[0036]** Un parámetro importante de rendimiento en los homogeneizadores de rotor-estator es la velocidad del borde del rotor (la velocidad periférica). Este parámetro es una función de la velocidad de rotación y del diámetro del rotor. Una velocidad del borde de por lo menos  $10 \text{ ms}^{-1}$  es útil, y más rápido es ideal, por ejemplo,  $\geq 20 \text{ ms}^{-1}$ ,  $\geq 30 \text{ ms}^{-1}$ ,  $\geq 40 \text{ ms}^{-1}$ , etc. una velocidad del borde de  $40 \text{ ms}^{-1}$  puede ser alcanzada fácilmente a 10,000 revoluciones por minuto con un homogeneizador pequeño y a velocidades de rotación más bajas (por ejemplo, 2000 revoluciones por minuto) con un homogeneizador más grande. Homogeneizadores adecuados de alto poder de desmenuzamiento están disponibles comercialmente.

25 **[0037]** Para fabricaciones a una escala comercial el homogeneizador debería tener idealmente un caudal de por lo menos 300 L/hr, por ejemplo,  $\geq 400 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 500 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 600 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 700 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 800 \text{ L/hr}$ ,  $> 900 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 1000 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 2000 \text{ L/hr}$ ,  $\geq 5000 \text{ L/hr}$ , o incluso  $\geq 10000 \text{ L/hr}$ . Homogeneizadores adecuados de alta capacidad están disponibles comercialmente.

30 **[0038]** Un homogeneizador preferido suministra una tasa de desmenuzamiento de entre  $3 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , por ejemplo, entre  $3 \times 10^5$  y  $7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , entre  $4 \times 10^5$  y  $6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , por ejemplo, alrededor de  $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ .

35 **[0039]** Aunque los homogeneizadores de rotor-estator generan relativamente poco calor durante su operación, el homogeneizador podría enfriarse durante el uso. Idealmente, la temperatura de la primera emulsión se mantiene por debajo de los  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante la homogeneización, por ejemplo, por debajo de los  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

40 **[0040]** Los componentes de la primera emulsión son homogeneizados varias veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más veces). Para evitar la necesidad de una cadena larga de contenedores y de homogeneizadores los componentes de la emulsión son circulados (por ejemplo, tal como se muestra por la característica (11) en la figura 1). En particular, la primera emulsión es formada al circular a los componentes de la primera emulsión a través de un homogeneizador varias veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 veces, etcétera). Sin embargo, muchos ciclos podrían no ser deseables puesto que pueden producir re-unificaciones tal como se describió en la referencia 14. Por lo tanto, el tamaño de las gotas de aceite podría ser monitoreado si se utiliza una circulación en el homogeneizador para revisar que un tamaño deseado de gota se haya alcanzado y/o que no ocurra una re-unificación.

50 **[0041]** La circulación a través del homogeneizador tiene ventajas puesto que puede reducir el tamaño promedio de las gotas de aceite en la primera emulsión. La circulación también tiene ventajas puesto que puede reducir el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la primera emulsión. Estas reducciones en el tamaño promedio de las gotas y el número de gotas superiores a 1.2 micrómetros en la primera emulsión puede suministrar ventajas en los procesos posteriores. En particular, la circulación de los componentes de la primera emulsión a través del homogeneizador puede conllevar a un proceso mejorado de micro-fluidización que podría resultar entonces en un número reducido de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la 2ª emulsión, es decir, después de la micro-fluidización. Esta mejora en los parámetros de la 2ª emulsión puede suministrar un rendimiento mejorado de filtración. El rendimiento mejorado de filtración podría conllevar a un menor contenido de pérdidas durante la filtración, es decir, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.

60 **[0042]** 2 tipos particulares de circulación son referidos en este documento como el "tipo I" y el "tipo II". La circulación de tipo I es ilustrada en la figura 5, mientras que la circulación de tipo II es ilustrada en la figura 6.

65 **[0043]** La circulación de los componentes de la primera emulsión comprende a una circulación de tipo I de transferencia de los componentes de la primera emulsión entre un primer contenedor de pre-mezcla y un homogeneizador. El primer contenedor de pre-mezcla podría estar en el rango de desde 50 a 500 l de tamaño, por

ejemplo, de 100 a 400 l, de 100 a 300 l, de 200 a 300 l, de 250 l o 280 l. El primer contenedor de pre-mezcla podría ser fabricado de acero inoxidable. La circulación de tipo I podría continuar durante 10 a 60 minutos, por ejemplo, de 10 a 40 minutos o 20 minutos.

5 **[0044]** La circulación de los componentes de la primera emulsión comprenden a una circulación de tipo II de transferencia de los componentes de la primera emulsión desde un primer contenedor de pre-mezcla, a través de un primer homogeneizador a un 2º contenedor de pre-mezcla (opcionalmente teniendo las mismas propiedades que el primer contenedor de pre-mezcla), y entonces a través de un 2º homogeneizador. El 2º homogeneizador usualmente será el mismo que el primer homogeneizador, pero en algunas configuraciones, el primero y el 2º homogeneizadores son diferentes. Después del pase de los componentes de la primera emulsión a través del 2º homogeneizador, los componentes de la primera emulsión podrían ser transferidos de vuelta al primer contenedor de pre-mezcla, por ejemplo, si el proceso de circulación tipo II debiese repetirse. Por lo tanto, los componentes de la emulsión podrían viajar en una ruta en la forma de un 8 entre el primer y el 2º contenedor de pre-mezcla por medio de un sólo homogeneizador (refiérase a la figura 6). La circulación de tipo II podría ejecutarse una sola vez o varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 veces, etcétera.

10 **[0045]** La circulación de tipo II tiene ventajas, en comparación a la circulación de tipo I, puesto que puede ayudar a asegurar que todos los componentes de la primera emulsión pasan a través del homogeneizador. El vaciamiento del primer contenedor de pre-mezcla significa que los contenidos completos de la emulsión han pasado a través del homogeneizador al 2º contenedor de pre-mezcla. Asimismo, los contenidos del 2º contenedor de pre-mezcla pueden ser vaciados, asegurando nuevamente que todos pasen a través del homogeneizador. Por lo tanto, la configuración de tipo II puede asegurar convenientemente que todos los componentes de la emulsión sean homogeneizados por lo menos 2 veces, lo cual puede reducir el tamaño promedio de las gotas de aceite y el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la primera emulsión. Una circulación ideal de tipo II, incluye, por lo tanto, el vaciar al primer contenedor de pre-mezcla y pasar sustancialmente a todos sus contenidos a través del homogeneizador en el 2º contenedor de pre-mezcla, seguido de un vaciamiento del 2º contenedor de pre-mezcla y re-pasar sustancialmente a todos sus contenidos a través del homogeneizador de vuelta al primer contenedor de pre-mezcla (vacío). Por lo tanto, todas las partículas pasan a través del homogeneizador por lo menos 2 veces, lo cual es difícil de lograr con la circulación de tipo I.

20 **[0046]** En este invento se utiliza una combinación de las circulaciones de tipo I y de tipo II, y esta combinación puede suministrar una primera emulsión con buenas características. En particular, esta combinación puede reducir mayormente el número de gotas que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la primera emulsión. Esta combinación comprende a la circulación de tipo I seguida por la circulación de tipo II. En una sección, la combinación comprende a 20 minutos de la circulación de tipo I seguido por una sola circulación de tipo II, es decir, transfiriendo a los componentes circulados de la primera emulsión desde un primer contenedor de pre-mezcla, a través de un primer homogeneizador a un 2º contenedor de pre-mezcla, y entonces a través de un 2º homogeneizador una vez.

25 **[0047]** El primer y el 2º contenedores de pre-mezcla podrían ser mantenidos bajo un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno, por ejemplo, hasta 0.5 bar. Esto puede prevenir que los componentes de la emulsión se oxiden, lo cual es particularmente ventajoso si uno de los componentes de la emulsión es escualeno. Esto puede suministrar un incremento en la estabilidad de la emulsión.

30 **[0048]** Tal como se mencionó anteriormente, el material ingresado inicial para el homogeneizador podría ser una mezcla no-homogeneizada de los componentes de la primera emulsión. Esta mezcla podría ser preparada al mezclar los componentes individuales de la primera emulsión individualmente, pero, en algunas secciones, varios componentes pueden ser combinados antes de esta mezcla. Por ejemplo, si la emulsión incluye a un surfactante con un HLB inferior a 10 entonces el surfactante podría ser combinado con un aceite antes de la mezcla. Similarmente, si la emulsión incluye a un surfactante con un HLB superior a 10 entonces el surfactante podría ser combinado con un componente acuoso antes de la mezcla, o podrían ser agregadas por separado.

35 **[0049]** Los métodos del invento podrían ser utilizados a larga escala. Por lo tanto, un método podría involucrar la preparación de una primera emulsión cuyo volumen es superior a 1 l, por ejemplo, superior a 5 l, superior a 10 l, superior a 20 l, superior a 50 l, superior a 100 l, superior a 250 l, etcétera.

**[0050]** Después de su formación, la primera emulsión es microfluidizada.

40 **[0051]** En algunas secciones, el material ingresado al homogeneizador será el material que salió de un microfluidizador, tal como aquel de la primera emulsión que es microfluidizado y entonces es sujeto nuevamente a una homogeneización.

### **Micro-fluidización**

45 **[0052]** Después de su formación la primera emulsión es microfluidizada para reducir su tamaño promedio de gotas de aceite y/o para reducir el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 µm.

5 **[0053]** Los instrumentos de micro-fluidización reducen el tamaño promedio de gotas de aceite al impulsar chorros de los componentes de entrada a través de canales geoméricamente fijos a alta presión y alta velocidad. La presión de la entrada a la cámara de interacción (también llamada la “primera presión”) podría ser sustancialmente constante (es decir,  $\pm 15\%$ ; por ejemplo,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 2\%$ ) durante por lo menos el 85% del tiempo durante el cual los componentes son suministrados al microfluidizador, por ejemplo, por lo menos el 87%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos el 99% o el 100% del tiempo durante el cual la emulsión es suministrada al microfluidizador.

10 **[0054]** En una sección, la primera presión es de 1300 bar  $\pm 15\%$  (18 kPSI  $\pm 15\%$ ), es decir, entre 1100 bar y 1500 bar (entre 15 kPSI y 21 kPSI) durante el 85% del tiempo que la emulsión es suministrada al microfluidizador. 2 perfiles adecuados de presión son mostrados en la figura 3. En la figura 3A la presión es sustancialmente constante durante por lo menos el 85% del tiempo, mientras que en la figura 3B la presión permanece en una forma continua sustancialmente constante.

15 **[0055]** Un aparato de micro-fluidización comúnmente comprender a por lo menos una bomba intensificadora (preferiblemente 2 bombas, que podrían ser sincronizadas) y una cámara de interacción. La bomba intensificadora, que idealmente es controlada en una forma eléctrica-hidráulica, suministra una presión alta (es decir, la primera presión) para forzar una emulsión hacia y a través de la cámara de interacción. La naturaleza sincrónica de las bombas intensificadoras podría ser utilizada para suministrar la presión sustancialmente constante de la emulsión que se mencionó anteriormente, lo que significa que las gotas de la emulsión estarán todas expuestas a sustancialmente el mismo nivel de fuerzas de desmenuzamiento durante la micro-fluidización.

20 **[0056]** Una ventaja del uso de una presión sustancialmente constante es que puede reducir fallas debido a fatiga en el dispositivo de micro-fluidización, que podría conllevar a una vida más larga del dispositivo. Otra ventaja del uso de una presión sustancialmente constante es que los parámetros de la 2ª emulsión pueden ser mejorados. En particular, puede reducirse el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  en la 2ª emulsión. Además, el tamaño promedio de las gotas de aceite de la 2ª emulsión puede reducirse cuando una presión sustancialmente constante es utilizada. La reacción en el tamaño promedio de las gotas de aceite y en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros de la 2ª emulsión podría suministrar un rendimiento mejorado de filtración. Un rendimiento mejorado de filtración podría conllevar a menores pérdidas de contenido durante la filtración, es decir, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsiones MF 59.

25 **[0057]** La cámara de interacción podría contener una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etcétera de canales de geometría fija a través de los cuales pasa la emulsión. La emulsión ingresa a la cámara de interacción a través de una línea de entrada que podría tener un diámetro de entre 200 a 250  $\mu\text{m}$ . La emulsión se divide en chorros en la medida en la que ingresa a la cámara de interacción y, bajo alta presión, acelera a una velocidad alta. En la medida en que pasa a través de los canales, las fuerzas producidas por la alta presión podrían actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros. Estas fuerzas podrían incluir a: fuerzas de desmenuzamiento, a través de la deformación del chorro de la emulsión que ocurre por el contacto con las paredes del canal; fuerzas de impacto, a través de colisiones que ocurren cuando los chorros de la emulsión a alta velocidad chocan entre sí; y fuerzas de cavitación, a través de la formación y el colapso de cavidades dentro del chorro. La cámara de interacción usualmente no incluye partes móviles. Podría incluir a superficies de canales de cerámica (por ejemplo, alúmina) o diamante (por ejemplo, diamante de policristalina). Otras superficies podrían estar hechas de acero inoxidable.

35 **[0058]** La geometría fija de la pluralidad de canales en la cámara interacción podría ser una geometría de tipo “Y” o una geometría de tipo “Z”.

40 **[0059]** En una cámara de interacción de geometría tipo Y un solo ingreso de un chorro de la emulsión es dividido en un primer y 2º chorros de emulsión, los cuales son re - combinados en un solo chorro de salida de la emulsión. Antes de la recombinación, cada uno de los primero y 2º chorros podrían ser divididos independientemente en una primera y segunda pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de sub-chorros. Cuando los chorros de la emulsión son re - combinados, el primer y el 2º chorros de la emulsión (o sus sub-chorros) están fluyendo idealmente en direcciones sustancialmente opuestas (por ejemplo, el primero y el 2º chorros de la emulsión, o sus sub-chorros) están fluyendo idealmente sustancialmente en el mismo plano ( $\pm 20^\circ$ ) y la dirección del flujo del primer chorro de emulsión tiene una diferencia de  $180 \pm 20^\circ$  de la dirección del flujo del 2º chorro de emulsión). Las bolsas producidas cuando los chorros de la emulsión son re combinados podrían actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros.

45 **[0060]** En una cámara de interacción geométrica de tipo Z el chorro de la emulsión pasa alrededor de una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de esquinas con sustancialmente ángulos rectos (es decir,  $90 \pm 20^\circ$ ). La figura 4 ilustra una cámara de interacción con una geometría tipo Z y 2 esquinas con ángulos rectos en la dirección del flujo. Durante sus pases alrededor de las esquinas, un chorro de emulsión de entrada podría dividirse en una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de sub-chorros y luego de combinarse en un solo chorro de salida de la emulsión (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 4, con 4 sub-chorros (32)). La división y la recombinación (31) podría ocurrir en cualquier punto entre la entrada y la salida. Las fuerzas producidas cuando la

emulsión contacta a las paredes del canal mientras pasa alrededor de las esquinas podrían actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2 micrómetros. Un ejemplo de una cámara de interacción de tipo Z es la cámara de interacción E230Z de Microfluidics.

5 **[0061]** En una sección, el chorro de emulsión pasa alrededor de 2 esquinas con sustancialmente ángulos rectos. En el punto en el cual el chorro de ingreso de la emulsión pasa alrededor de la primera esquina, con sustancialmente un ángulo recto, el chorro se divide en 5 sub-chorros. En el punto en el cual los sub-chorros pasan alrededor de la 2ª esquina con sustancialmente un ángulo recto, se recombinan en un solo chorro de salida de la emulsión.

10 **[0062]** Previamente en la industria, ha sido usual el utilizar cámaras de interacción de tipo Y para emulsiones de aceite en agua similares a aquellos de este invento. Sin embargo, hemos descubierto que es ventajoso utilizar la cámara de interacción geométrica de canales tipo Z para emulsiones de aceite en agua puesto que esto puede conllevar a una reducción mayor en el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  presentes en la 2ª emulsión en comparación a una cámara de interacción geométrica de tipo Y. La reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  en la 2ª emulsión puede suministrar un rendimiento mejorado de la filtración. El rendimiento mejorado de la filtración podría conllevar a menores pérdidas de contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, de Tween 80 y de Span 85 cuando la emulsiones MF59.

15 **[0063]** Un aparato preferido de micro-fluidización opera a una presión de entre 170 bar y 2750 bar (aproximadamente 2500 psi a 40,000 psi), por ejemplo, a alrededor de 345 bar, a alrededor de 690 bar, a alrededor de 1380 bar, a alrededor de 2070 bar, etcétera.

20 **[0064]** Un aparato preferido de micro-fluidización opera a un caudal de hasta 20 l/minuto, por ejemplo, hasta 14 l/minuto, hasta 7 l/minuto, hasta 3.5 litros/minuto, etcétera.

25 **[0065]** Un aparato preferido de micro-fluidización tiene una cámara de interacción que suministra un índice de desmenuzamiento que excede a  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , por ejemplo,  $\geq 2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $\geq 5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $\geq 10^7 \text{ s}^{-1}$ , etc.

30 **[0066]** Un aparato de micro-fluidización podría incluir varias cámaras de interacción que son utilizadas en paralelo, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, pero es más útil el incluir sólo una cámara de interacción.

35 **[0067]** El dispositivo de micro-fluidización comprende a un módulo auxiliar de procesamiento (APM - auxiliary processing module) comprendido de por lo menos un canal. El APM contribuye a la reducción del tamaño promedio de las gotas de aceite en la emulsión que se está pasando a través del dispositivo de micro-fluidización, aunque la mayoría de la reducción ocurre en la cámara de interacción. Tal como se mencionó anteriormente, los componentes de emulsión son introducidos a la cámara de interacción por medio de bombas intensificadoras bajo una primera presión. Los componentes de la emulsión generalmente salen del APM con una 2ª presión que es más baja que la primera presión (por ejemplo, la presión atmosférica). En general, entre el 80 y el 95% de la diferencia de presión entre la primera y 2ª presión es reducida a lo largo de la cámara de interacción (por ejemplo, desde  $P_1$  a  $P_2$  en la figura 4) y del 5 al 20% de la diferencia de presión entre la primera y 2ª presión es reducida a lo largo del módulo auxiliar de procesamiento, por ejemplo, la cámara de interacción podría suministrar aproximadamente un 90% de la reducción de presión mientras que el APM podría suministrar aproximadamente el 10% de la reducción de presión. Si la presión reducida a lo largo de la cámara de interacción y la presión reducida a lo largo del módulo auxiliar de procesamiento no contabiliza a toda la diferencia de presión entre la primera y 2ª presión, esto puede deberse a una reducción finita de presión a lo largo de las conexiones entre la cámara de interacción y el módulo auxiliar de procesamiento.

40 **[0068]** El APM usualmente no incluye partes móviles. Podría incluir superficies de canales de cerámica (por ejemplo, alúmina) o diamante (por ejemplo, diamante de policristalina). Otras superficies podrían ser hechas de acero inoxidable.

45 **[0069]** El APM generalmente está posicionado corriente abajo de la cámara de interacción y también podría estar posicionado a continuación de la cámara de interacción. Previamente en la industria, los APMs generalmente estaban posicionados corriente abajo de las cámaras de interacción que comprendían a canales de tipo Y para suprimir la cavitación y, por lo tanto, incrementar el caudal en la cámara de tipo Y por un 30%. Además, previamente en la industria los APMs están posicionados generalmente corriente arriba de las cámaras de interacción que comprendían a canales tipo Z para reducir el tamaño de aglutinamientos grandes. En el caso posterior, el APM sólo reducía el caudal en las cámaras de tipo Z por un 3%. Sin embargo, se ha descubierto que posicionar al APM corriente abajo de la cámara de interacción cuando se trata de una pluralidad de canales de tipo Z tiene ventajas para este invento puesto que puede conllevar a una mayor reducción en el tamaño promedio de las gotas de aceite y una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tengan un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  presentes en la 2ª emulsión. Tal como se mencionó anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  en la 2ª emulsión podría suministrar un rendimiento mejorado de filtración. Un rendimiento mejorado de la filtración podría conllevar a una menor pérdida de contenido durante la filtración, por ejemplo,



pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59. Una ventaja adicional de este posicionamiento de una cámara de interacción de tipo Z y un PM corriente abajo es que puede conllevar a una reducción más lenta de la presión después de la cadena de interacción. La reducción más lenta de presión podría conllevar a un incremento en la estabilidad del producto puesto que existirían menos gases capturados en la emulsión.

[0070] Un APM contiene a por lo menos un canal geométrico fijo por el cual pasa la emulsión. El APM podría contener una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etcétera, de canales geométricos fijos por los cuales pasa la emulsión. El canal o los canales del APM podrían ser lineales o no lineales. Canales no lineales adecuados son los de la geometría de tipo "Z" o de la geometría de tipo "Y", que son los mismos que aquellos descritos anteriormente para la cámara de interacción. En una sección, el canal o los canales, del APM son de geometría de tipo Z. Una pluralidad de canales de tipo Z divide a la emulsión en chorros en la medida en la que éste entra al APM.

[0071] En contraste a las recomendaciones del fabricante, el uso de un APM con una pluralidad de canales geométricos fijos es ventajoso en comparación a un APM de un sólo canal geométrico fijo puesto que puede conllevar a una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  presentes en la 2ª emulsión. Tal como se mencionó anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la 2ª emulsión puede suministrar un rendimiento mejorado de la filtración. Un rendimiento mejorado de la filtración podría conllevar a menos pérdidas de contenidos durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, de Tween 80 y de Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.

[0072] Un aparato de micro-fluidización genera calor durante la operación, que podría elevar la temperatura de una emulsión por 15-20 °C en relación a la primera emulsión. Ventajosamente, por lo tanto, la emulsión microfluidizada es enfriada tan pronto como sea posible. La temperatura de la 2ª emulsión podría ser mantenida por debajo de los 60 °C, por ejemplo, por debajo de los 45 °C. Por lo tanto, una interacción de la salida de la cámara y/o una salida del APM podría suministrar a un mecanismo de refrigeración, tal como un intercambiador de calor o un serpentín de refrigeración. La distancia entre la salida y el mecanismo de refrigeración debería mantenerse tan corto como sea posible para acortar el tiempo general al reducir el retraso de la refrigeración. En una sección, la distancia entre la salida del microfluidizador y el mecanismo de refrigeración es de entre 20-30 cm. Un mecanismo de refrigeración es particularmente útil cuando una emulsión es sujeta a varios pasos de micro-fluidización, para prevenir un sobrecalentamiento de la emulsión.

[0073] El resultado de la micro-fluidización es una emulsión de aceite en agua, la 2ª emulsión, en la cual el tamaño promedio de las gotas de aceite es 500 nm o menos. El tamaño promedio es particularmente útil puesto que ayuda a filtrar a la esterilización de la emulsión. Emulsiones en las cuales por lo menos el 80% del monto de gotas de aceite tienen un tamaño promedio de 500 nm o menos, por ejemplo, 400 nm o menos, 300 nm o menos, 200 nm o menos, o 165 nm o menos, son particularmente útiles. Además, el número de gotas de aceite de la 2ª emulsión que tienen un tamaño superior a 1.2  $\mu\text{m}$  es  $5 \times 10^{10}$  /ml o menos, por ejemplo,  $5 \times 10^9$  /ml o menos,  $5 \times 10^8$  /ml o menos o  $2 \times 10^8$  /ml o menos.

[0074] El ingreso inicial para la micro-fluidización es la primera emulsión. En este invento, la emulsión microfluidizada es sujeta nuevamente a una micro-fluidización, para que ocurran varias rondas de micro-fluidización. En particular, la 2ª emulsión podría ser formada al circular a los componentes de la 2ª emulsión a través de un dispositivo de micro-fluidización varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces, etcétera. La 2ª emulsión podría ser formada al circular a los componentes de la 2ª emulsión a través de un dispositivo de micro-fluidización de 4 a 7 veces.

[0075] La circulación de los componentes de la 2ª emulsión podría comprender una circulación de tipo I de transferencia de los componentes de la 2ª emulsión entre un primer contenedor de emulsiones (que tiene opcionalmente las mismas propiedades que el primer contenedor de pre-mezcla) y el dispositivo de micro-fluidización.

[0076] La circulación de los componentes de la 2ª emulsión comprende a una circulación de tipo II de transferencia de los componentes de la 2ª emulsión entre un primer contenedor de emulsiones, a través de un dispositivo de micro-fluidización a un 2º contenedor de emulsiones (que tenga opcionalmente las mismas propiedades que el primer contenedor de pre-mezcla), y entonces a través de un 2º dispositivo de micro-fluidización.

[0077] El 2º dispositivo de micro-fluidización es el mismo que el primer dispositivo de micro-fluidización. El primer contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el primer contenedor de pre-mezcla. Alternamente, el primer contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el 2º contenedor de pre-mezcla.

[0078] El 2º contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el primer contenedor de pre-mezcla. Alternamente, el 2º contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el 2º contenedor de pre-mezcla.

[0079] El primer contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el primer contenedor de pre-mezcla y el 2º contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el 2º contenedor de pre-mezcla. Alternamente, el primer

contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el 2º contenedor de pre-mezcla y el 2º contenedor de emulsiones podría ser el mismo que el primer contenedor de pre-mezcla.

5 **[0080]** Como una alternativa, el primer y el 2º contenedores de emulsiones podrían ser diferentes al primer y al 2º contenedores de pre-mezcla.

10 **[0081]** Después del pase de los componentes de la 2ª emulsión a través del 2º dispositivo de micro-fluidización, los componentes de la 2ª emulsión podrían ser transferidos de vuelta al primer contenedor de emulsiones, por ejemplo, si el proceso de circulación de tipo II debiese repetirse. La circulación de tipo II podría ser ejecutada una sola vez o una pluralidad de veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 veces, etcétera.

15 **[0082]** La circulación de tipo II tiene ventajas puesto que asegura que todos los componentes de la 2ª emulsión han pasado a través del dispositivo de micro-fluidización por lo menos 2 veces, lo cual reduce el tamaño promedio de las gotas de aceite y el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la 2ª emulsión.

20 **[0083]** Una combinación de la circulación de tipo I y de la circulación de tipo II podría ser utilizada durante la micro-fluidización. Esta combinación puede comprender a cualquier orden de circulaciones de tipo I y tipo II, por ejemplo, el tipo I seguido por el tipo II, el tipo II seguido por el tipo I, el tipo I seguido por el tipo II seguido por el tipo I nuevamente, etcétera.

25 **[0084]** El primer y el 2º contenedores de emulsión podrían ser mantenidos bajo un gas inerte, por ejemplo, hasta 0.5 bar de nitrógeno. Esto previene que los componentes de la emulsión se oxiden, lo cual es particularmente ventajoso si uno de los componentes de la emulsión es escualeno. Esto conlleva a un incremento en la estabilidad de la emulsión.

30 **[0085]** Los métodos del invento podrían ser utilizados a larga escala. Por lo tanto, un método podría involucrar la micro-fluidización de un volumen mayor a 1 l, por ejemplo,  $\geq 5$  litros,  $\geq 10$  litros,  $\geq 20$  litros,  $\geq 50$  litros,  $\geq 100$  litros,  $\geq 250$  litros, etc.

30 **Filtración**

35 **[0086]** Después de la micro-fluidización, la 2ª emulsión podría ser filtrada. Esta filtración remueve cualquier gota de aceite grande que haya sobrevivido a los procedimientos de homogeneización y de micro-fluidización. Aunque pequeño en términos de montos, estas gotas de aceite pueden ser de volúmenes grandes y pueden actuar como lugares de nucleación para aglutinamiento, conllevando a una degradación de la emulsión durante su almacenamiento. Además, este paso de filtración puede lograr esterilizar el filtro.

40 **[0087]** La membrana específica de filtración adecuada para la esterilización del filtro depende de las características del fluido de la 2ª emulsión y del grado de filtración requerido. Las características del filtro pueden afectar su idoneidad para la filtración de la emulsión microfluidizada. Por ejemplo, su tamaño de poros y las características de la superficie puede ser importantes, particularmente cuando se filtra una emulsión que se basa en escualeno.

45 **[0088]** El tamaño de los poros de las membranas utilizadas con el invento deberían permitir el paso de las gotas deseadas mientras que detienen a gotas no deseadas. Por ejemplo, debería retener a gotas que tienen un tamaño superior o igual a 1  $\mu\text{m}$  mientras que permite el paso de gotas con un tamaño inferior a 200 nm. Un filtro de 0.2 micrómetros o 0.22 micrómetros es ideal, y también puede lograr la esterilización del filtro.

50 **[0089]** La emulsión podría ser pre-filtrada, por ejemplo, a través de un filtro de 0.45 micrómetros. La pre-filtración y filtración pueden lograrse en un sólo paso al utilizar filtros conocidos de doble capa que incluyen una primera capa con poros más grandes y una 2ª capa de la membrana con poros más pequeños. Filtros de doble capa son particularmente útiles con el invento. La primera capa idealmente tiene un tamaño de poros que es inferior a 0.3 micrómetros, tal como entre 0.3-2  $\mu\text{m}$  o entre 0.3-1  $\mu\text{m}$ , o entre 0.4-0.8 micrómetros, o entre 0.5-0.7 micrómetros. Un tamaño de poros inferior a 0.75 micrómetros en la primera capa es lo preferido. Por lo tanto, la primera capa podría tener un tamaño de poros de 0.6 micrómetros o de 0.45 micrómetros, por ejemplo. La 2ª capa idealmente debería tener un tamaño de poros que sea menor que el 75% del (e idealmente menos que la mitad de) tamaño de los poros de la primera capa, tal como entre 25-70% o entre 25-49% del tamaño de poros de la primera capa, por ejemplo, entre el 30-45%, tal como un tercio o 4/9, del tamaño de los poros de la primera capa. Por lo tanto, la 2ª capa podría tener un tamaño de poros inferior a 0.3 micrómetros, tal como entre 0.15-0.28 micrómetros o entre 0.18-0.24 micrómetros, por ejemplo, un tamaño de poros de la 2ª capa de 0.2 micrómetros o 0.22 micrómetros. En un ejemplo, la primera capa de membrana con poros más grandes suministra un filtro de 0.45 micrómetros, mientras que la 2ª capa de membrana con poros más pequeños suministra un filtro de 0.22 micrómetros.

65 **[0090]** La membrana de filtración y/o la membrana de pre-filtración podrían ser asimétricas. Una membrana asimétrica es una en la cual el tamaño de los poros varía de un lado de la membrana al otro, por ejemplo, en la cual el tamaño de los poros es mayor en el lado de entrada que en el lado de salida. Un lado de la membrana asimétrica podría ser referido como la "superficie de poros gruesos", mientras que el otro lado de la membrana asimétrica

podría ser referido como la “superficie de poros finos”. En un filtro de doble capa, una o (idealmente) ambas capas podrían ser asimétricas.

5 **[0091]** La membrana de filtración podría ser porosa o homogénea. Una membrana homogénea es usualmente una lámina densa que varía de desde 10 a 200  $\mu\text{m}$ . Una membrana porosa tiene una estructura porosa. En una sección, la membrana de filtración es porosa. En un filtro de doble capa, ambas capas podrían ser porosas, ambas capas podrían ser homogéneas, o podría haber una capa porosa y otra homogénea. Un filtro preferido de doble capa es uno en el cual ambas capas son porosas.

10 **[0092]** En una sección, la 2ª emulsión es pre-filtrada a través de una membrana asimétrica hidrofílica porosa y luego es filtrada a través de otra membrana porosa hidrofílica asimétrica que tiene poros más pequeños que la membrana de pre-filtración. Esto puede usar un filtro de doble capa.

15 **[0093]** La membrana o membranas filtro podrían ser tratadas en una autoclave antes de su uso para asegurar que sean estériles.

20 **[0094]** Las membranas de filtración son hechas comúnmente de materiales poliméricos de soporte tales como PTFE (poli-tetra-fluoro-etileno), PES (polietersulfona), PVP (polivinilpirrolidona), PVDF (cloruro de polivinilideno - polyvinylidene fluoride), nylon (poliamidas), PP (polipropileno), celulosas (incluyendo a ésteres de celulosa), PEEK (polieteretercetona), nitrocelulosa, etc. estos materiales tienen características que varían, con algunos soportes que son intrínsecamente hidrofóbicos (por ejemplo, el PTFE) y otros que son intrínsecamente hidrofílicos (por ejemplo, acetatos de celulosa). Sin embargo, estas características intrínsecas pueden ser modificadas al tratar a la superficie de la membrana. Por ejemplo, se conoce como preparar a membranas hidrofílicas o hidrofóbicas al tratarlas con otros materiales (tales como polímeros, grafitos, siliconas, etcétera) para cubrir a la superficie de la membrana, por ejemplo, refiérase a la sección 2.1 de la referencia 15. En un filtro de doble capa las 2 membranas pueden ser hechas de diferentes materiales o (idealmente) del mismo material.

30 **[0095]** Un filtro ideal para su uso con el invento tiene una superficie hidrofílica, en contraste con las enseñanzas de las referencias 9-12 que los filtros hidrofóbicos (polisulfona) deberían ser utilizados. Los filtros con superficies hidrofílicas pueden formarse de materiales hidrofílicos, o por medio de la hidrofiliación de materiales hidrofóbicos, y un filtro preferido para su uso con el invento es una membrana hidrofílica de polietersulfona. Algunos métodos diferentes son conocidos por transformar a membranas PES hidrofóbicas a membranas PES hidrofílicas. A menudo esto se logra al cubrir a la membrana con un polímero hidrofílico. Para suministrar una adherencia permanente del polímero hidrofílico al PES, una capa de cobertura hidrofílica es usualmente sujeta a una reacción de enlace transversal o a injertos. La referencia 15 presenta un proceso para modificar las propiedades superficiales de un polímero hidrofóbico que tiene extremos de cadenas capaces de funcionalizaciones, que comprende el contactar al polímero con una solución de una partícula enlazadora para formar un enlace covalente, y luego contactar al polímero hidrofóbico que fue sujeto a la reacción con una solución de un agente modificador. La referencia 16 presenta un método de hidrofiliación de membranas PES por medio de una cobertura directa de la membrana, que involucra pre-humedecer con alcohol, y entonces empapar en una solución acuosa que contiene a un monómero hidrofílico, a un monómero polifuncional (enlazador transversal) y un iniciador de polimerización. El monómero y el enlazador transversal son polimerizados utilizando una polimerización iniciada térmicamente o por ultravioleta para formar una cobertura de polímeros hidrofílicos reticulados en la superficie de la membrana. Asimismo, la referencia 17 y 18 presentan la cobertura de una membrana PES al empaparla en una solución de polímeros hidrofílicos (óxido de polialquileno) y por lo menos un monómero polifuncional (enlazador transversal), y luego polimerizar un monómero para suministrar una cobertura hidrofílica no extraíble. La referencia 19 describe la y hidrofiliación de la membrana PES por medio de una reacción de injertos en la cual la membrana PES es sometida a un tratamiento de plasma de helio a bajas temperaturas seguido por injertos del monómero hidrofílico N-vinil-2-pirrolidona (NVP) en la superficie de la membrana. Adicionalmente, aquellos procesos son presentados en las referencias 20 a 26.

50 **[0096]** En métodos que no se basan en recubrimientos, el PES puede ser disuelto en un solvente, mezclado con un aditivo soluble hidrofílico, y entonces la solución mezclada es utilizada para fundir una membrana hidrofílica, por ejemplo, por medio de precipitación o al iniciar la co-polimerización. Aquellos métodos son presentados en las referencias 27 a 33. Por ejemplo, la referencia 33 presenta un método para preparar una membrana hidrofílica en la cual se modificó la carga que tiene un número reducido de extraíbles de la membrana y permite una recuperación rápida de la resistividad del agua ultra pura, teniendo una estructura de red polimérica enlazada transversalmente de inter-penetración formada al hacer una solución polimérica de una mezcla de PES, PVP, polietilenoimina, y éter alifático de diglicidilo, formando una lámina delgada de la solución, y precipitando la lámina como una membrana. Un proceso similar es presentado en la referencia 34.

60 **[0097]** Métodos híbridos pueden ser utilizados, en los cuales aditivos hidrofílicos están presentes durante la formación de la membrana y también son agregados después como una cobertura, por ejemplo, lea la referencia 35.

65 **[0098]** La hidrofiliación de la membrana PES también puede lograrse mediante el tratamiento con plasma a bajas temperaturas. La referencia 36 describe la modificación hidrofílica de la membrana PES por medio de un tratamiento con un plasma de  $\text{CO}_2$  de baja temperatura.

**[0099]** La hidrofiliación de la membrana PES también puede alcanzarse por medio de oxidación, tal como es descrito en la referencia 37. Este método involucra la pre-humidificación de una membrana hidrofóbica de PES en un líquido que tiene una tensión superficial baja, se expone a la membrana húmeda de PES a una solución acuosa de un oxidante, y luego se calienta.

**[0100]** También se puede utilizar una inversión de fases, tal como se describe en la referencia 38

**[0101]** Una membrana hidrofílica de PES ideal puede ser obtenida por medio del tratamiento de PES (hidrofóbico), PVP (hidrofílico). El tratamiento con PEG (hidrofílico) en vez de PVP ha demostrado dar una membrana PES hidrofílica que se ensucia fácilmente (particularmente cuando se usa una emulsión que contiene escualeno) y también libera desventajosamente a formaldehído durante el proceso de autoclave.

**[0102]** Un filtro preferido de doble capa tiene una primera membrana hidrofílica de PES y una 2ª membrana hidrofílica de PES.

**[0103]** Membranas hidrofílicas conocidas incluyen a Bioassure (de Cuno); polietersulfona EverLUX™; polietersulfona STYLUX™ (ambos de Meissner); membranas Millex GV, Millex HP, Millipak 60, Millipak 200 y Durapore CVGL01TP3 (de Millipore); membrana EX EDF Fluorodyne™, Supor™ EAV; Supor™ EBV, Supor™ EKV (todas de Pall); Sartopore™ (de Sartorius); membrana de PES hidrofílica de Sterlitech; y la membrana de PES WFPES de Wolftechnik.

**[0104]** Durante la filtración, la emulsión podría ser mantenida a una temperatura de 40 °C o menos, por ejemplo 30 °C o menos, para facilitar la filtración estéril exitosa. Algunas emulsiones no podrían pasar a través de un filtro estéril cuando están a una temperatura superior a 40 °C.

**[0105]** Existen ventajas al ejecutar el paso de filtración en las primeras 24 horas, por ejemplo, en las primeras 18 horas, en las primeras 12 horas, en las primeras 6 horas, en las primeras 2 horas, en los primeros 30 minutos, de haber producido la 2ª emulsión puesto que después de este tiempo podría no ser posible el pasar a la 2ª emulsión a través del filtro estéril sin coagular al filtro, tal como se menciona en la referencia 39.

**[0106]** Los métodos del invento podrían ser utilizados a larga escala. Por lo tanto, un método podría involucrar filtrar un volumen superior a 1 l, por ejemplo, ≥5 litros, ≥10 litros, ≥20 litros, ≥50 litros, ≥100 litros, ≥250 litros, etcétera.

#### ***La emulsión final***

**[0107]** El resultado de la micro-fluidización y la filtración es una emulsión de aceite en agua en la cual el tamaño promedio de las gotas de aceite podría ser menor a 220 nm, por ejemplo, 155 ± 20 nm, 155 ± 10 nm o 155 ± 5 nm, y en la cual el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros podría ser  $5 \times 10^8$  /ml o menos, por ejemplo,  $5 \times 10^7$  /ml o menos,  $5 \times 10^6$  /ml o menos,  $2 \times 10^6$  /ml o menos o  $5 \times 10^5$  /ml o menos.

**[0108]** El tamaño promedio de las gotas de aceite de las emulsiones aquí descritas (incluyendo la primera y la 2ª emulsiones) generalmente no es superior a 50 nm.

**[0109]** Los métodos del invento podrían ser utilizados a larga escala. Por lo tanto, un método podría involucrar preparar una emulsión final con un volumen superior a 1 l, por ejemplo, ≥5 litros, ≥10 litros, ≥20 litros, ≥50 litros, ≥100 litros, ≥250 litros, etc.

**[0110]** Una vez que la emulsión de aceite en agua ha sido formada, podría ser transferida a botellas de vidrio estéril. Las botellas de vidrio podrían ser de un tamaño de 5 l, 8 l, o 10 l. Alternamente, el aceite en agua podría ser transferido a una bolsa flexible estéril (bolsa flexible). La bolsa flexible podría ser de un tamaño de 50 l, de 100 l o de 250 l. Adicionalmente, la bolsa flexible podría ser encajada con uno o más conectores estériles para conectar a la bolsa flexible al sistema. El uso de una bolsa flexible con un conector estéril es ventajoso en comparación con las botellas de vidrio puesto que la bolsa flexible es más grande que las botellas de vidrio lo cual significa que podría no ser necesario cambiar a la bolsa flexible para almacenar a toda la emulsión fabricada en un solo lote. Esto puede suministrar un sistema estéril cerrado para la fabricación de la emulsión lo cual podría reducir la posibilidad de que se presenten impurezas en la emulsión final. Esto puede ser particularmente importante si la emulsión final es utilizada para propósitos farmacéuticos, por ejemplo, si la emulsión final es el adyuvante MF59.

**[0111]** Montos preferidos de aceite (porcentaje de volumen) en la emulsión final están entre el 2-20%, por ejemplo, alrededor del 10%. Un contenido de escualeno de alrededor del 5% o alrededor del 10% es particularmente útil. Un contenido de escualeno (masa/volumen) de entre 30-50 mg/mililitro es útil, por ejemplo, entre 35-45 mg/mililitro, 36-42 mg/mililitro, 38-40 mg/mililitro, etcétera.

**[0112]** Montos preferidos de surfactantes (porcentaje de masa) en la emulsión final son: ésteres de sorbitano de polioxietileno (tal como Tween 80) del 0.02 al 2%, en particular desde el 0.5 por ciento a alrededor del 1%; ésteres de sorbitano (tales como Span 85) del 0.02 al 2%, en particular a alrededor del 0.5 por ciento o a alrededor del 1%,

octil- o polioxietanoles de nonilfenoxi (tales como Tritón X-100) del 0.001 al 0.1 por ciento, en particular desde el 0.005 al 0.02 por ciento; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) desde el 0.1 al 20%, preferiblemente desde el 0.1 al 10% y en particular desde el 0.1 al 1% o alrededor del 0.5 por ciento. Un contenido de polisorbato 80 (masa/volumen) de entre 4-6 mg/mililitro es útil, por ejemplo, entre 4.1-5.3 miligramos/mililitro. Un contenido de trioleato de sorbitano (masa/volumen) de entre 4-6 mg/mililitro es útil, por ejemplo, entre 4.1-5.3 miligramos/mililitros.

**[0113]** El proceso es utilizado para preparar:

- Una emulsión que comprende a escualeno, polisorbato 80 (Tween 80), y trioleato de sorbitano (Span 85). La composición de la emulsión por volumen puede ser de alrededor del 5% de escualeno, alrededor del 0.5 por ciento de polisorbato 80 y alrededor del 0.5 por ciento de trioleato de sorbitano. En términos de masa, estos montos pueden volverse el 4.3 por ciento de escualeno, el 0.5 por ciento de polisorbato 80 y el 0.48 por ciento de trioleato de sorbitano. Este adyuvante es conocido como 'MF59'. La emulsión MF59 incluye ventajosamente a iones de citrato, por ejemplo, 10 mM de un amortiguador de citrato de sodio.

**[0114]** Las composiciones de estas emulsiones, expresadas anteriormente en términos de porcentaje, podrían ser modificadas por medio de dilución o concentración (por ejemplo, por un número entero, tal como 2 o 3 o por una fracción, tal como  $\frac{2}{3}$  o  $\frac{3}{4}$ ), en la cual sus proporciones permanecen siendo las mismas. Por ejemplo, un MF59 concentrado 2 veces tendría alrededor de un 10% de escualeno, alrededor del 1% de polisorbato 80 y alrededor del 1% de trioleato de sorbitano. Formas concentradas podrían ser diluidas (por ejemplo, con una solución de antígenos) para dar una concentración deseada final de la emulsión.

**[0115]** Las emulsiones del invento son ideal mente almacenadas a entre 2 °C y 8 °C. No deberían ser congeladas. Deberían ser mantenidas idealmente fuera de un contacto directo con la luz. En particular, las emulsiones y las vacunas que contienen escualeno del invento deberían ser protegidas para evitar una descomposición fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones del invento son almacenadas entonces es preferiblemente en una atmósfera inerte, por ejemplo, N<sub>2</sub> o argón.

#### **Vacunas**

**[0116]** Aunque es posible administrar adyuvantes de emulsiones de aceite-en-agua individualmente a los pacientes (por ejemplo, para suministrar un efecto adyuvante para un antígeno que ha sido administrado por separado al paciente), es más usual mezclar al adyuvante con un antígeno antes de su administración, para formar una composición inmuno-génica, por ejemplo, una vacuna. La mezcla de la emulsión y del antígeno podría llevarse a cabo extemporáneamente, en el momento de su uso, o puede ocurrir durante la fabricación de la vacuna, antes del relleno. Los métodos del invento pueden ser aplicados en ambas situaciones.

**[0117]** Por lo tanto, un método del invento, podría incluir un paso adicional del proceso de mezclar a la emulsión con un componente antigénico. Como una alternativa, podría incluir un paso adicional de empacar al adyuvante en un botiquín como un componente de este botiquín junto con un componente antigénico.

**[0118]** En general, por lo tanto, el invento puede ser utilizado cuando se preparan a vacunas mezcladas o cuando se preparan a botiquines que incluyen a antígenos y a adyuvantes listos para su mezcla. Cuando la mezcla ocurre durante la fabricación entonces los volúmenes de antígenos y de emulsiones en lotes que se mezclan comúnmente serán mayores que 1 l, por ejemplo,  $\geq 5$  litros,  $\geq 10$  litros,  $\geq 20$  litros,  $\geq 50$  litros,  $\geq 100$  litros,  $\geq 250$  litros, etc. cuando la mezcla ocurre en el punto de uso los volúmenes que son mezclados comúnmente serán más pequeños que 1 ml, por ejemplo,  $\leq 0.6$  ml,  $\leq 0.5$  ml,  $\leq 0.4$  ml,  $\leq 0.3$  ml,  $\leq 0.2$  ml, etc. en ambos casos es usual para volúmenes sustancialmente iguales de emulsión y de solución antigénica ser mezclados, es decir, sustancialmente a 1:1 (por ejemplo, entre 1.1:1 y 1:1.1, preferiblemente entre 1.05:1 y 1:1.05 y más preferiblemente entre 1.025:1 y 1:1.025). En algunas secciones, sin embargo, un exceso de emulsión o un exceso de antígenos podría ser utilizado [42]. Cuando se utiliza un volumen en exceso de un componente, el exceso generalmente será de por lo menos 1.5:1, por ejemplo,  $\geq 2:1$ ,  $\geq 2.5:1$ ,  $\geq 3:1$ ,  $\geq 4:1$ ,  $\geq 5:1$ , etc.

**[0119]** Cuando el antígeno y el adyuvante son presentados como componentes separados dentro de un botiquín, están físicamente separados entre sí en el botiquín, y esta separación puede lograrse de varias formas. Por ejemplo, los componentes podrían estar en contenedores separados, tales como matraces. Los contenidos de 2 matraces pueden ser mezclados cuando se lo necesite, por ejemplo, al remover los contenidos de un matraz y agregarlos a otro matraz, o al remover por separado los contenidos de ambos matraces y mezclarlos juntos en un 3<sup>er</sup> contenedor.

**[0120]** En otra configuración, uno de los componentes del botiquín es una jeringa y el otro es un contenedor tal como un matraz. La jeringa puede ser utilizada (por ejemplo, con una aguja) para insertar sus contenidos en el matraz para la mezcla, y la mezcla puede ser sacada entonces a la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringa pueden ser administrados a un paciente, comúnmente a través de una nueva aguja estéril. El empacar a un componente en una jeringa elimina la necesidad de usar una jeringa separada para la administración al paciente.

**[0121]** En otra configuración preferida, los 2 componentes del botiquín son mantenidos juntos, pero por separado en

la misma jeringa, por ejemplo, una jeringa con 2 cámaras, tal como aquellas presentados en las referencias 43-50, etcétera. Cuando la jeringa es activada (por ejemplo, durante la administración a un paciente) entonces los contenidos de las 2 cámaras se mezclan. Esta configuración evita la necesidad de un paso separado de mezcla en el momento del uso.

5  
**[0122]** Los contenidos de los varios componentes del botiquín generalmente estarán en una forma líquida. En algunas configuraciones, un componente (comúnmente el componente antígeno en vez del componente de la emulsión) está en una forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), con el otro componente presentándose en una forma líquida. Los 2 componentes pueden ser mezclados para reactivar al componente seco y dar una composición líquida para su administración a un paciente. Un componente liofilizado comúnmente estará ubicado dentro de un matraz en vez de una jeringa. Los componentes secos podrían incluir a estabilizadores tales como la lactosa, la sacarosa, o el manitol, así como sus mezclas, un ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etcétera. Una configuración posible utiliza un componente de emulsión líquido en una jeringa prellenada y un componente antígeno liofilizado en un matraz.

15  
**[0123]** Si las vacunas contienen componentes adicionales a la emulsión y al antígeno entonces estos componentes adicionales podrían ser incluidos en uno de estos 2 componentes del botiquín, o podrían ser parte de un 3<sup>er</sup> componente del botiquín.

20  
**[0124]** Contenedores adecuados para vacunas mezcladas del invento, o para componentes individuales del botiquín, incluyen a matraces y a jeringas desechables. Estos contenedores debían ser estériles.

25  
**[0125]** Cuando una composición/componente está ubicado en un matraz, el matraz es preferiblemente hecho de un material de vidrio o de plástico. El matraz es esterilizado preferiblemente antes de que la composición sea colocada en este punto para evitar problemas con pacientes que tienen sensibilidad al látex, los matraces son sellados preferiblemente con un detenedor que no tenga látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de empaque. En una sección, un matraz tiene un detenedor de caucho de butilo. El matraz podría incluir una sola dosis de la vacuna/componente, o podría incluir más de una dosis (un matraz de 'varias dosis') por ejemplo, 10 dosis. En una sección, un matraz incluye dosis de 10 x 0.25 mililitros de la emulsión. Matraces preferidos son hechos en vidrio transparente.

30  
**[0126]** Un matraz puede tener una tapa (por ejemplo, un seguro libre de fugas) adaptado para que la jeringa prellenada pueda ser insertada en la tapa, los contenidos de la jeringa puedan ser expulsados al matraz (por ejemplo, para reconstituir al material liofilizado que se encuentra ahí), y los contenidos del matraz pueden ser removidos de vuelta a la jeringa. Después de la remoción de la jeringa del matraz, una aguja puede ser adjuntada y la composición podría ser administrada a un paciente. La tapa se ubica preferiblemente adentro del sello o del cobertor, para que el sello o el cobertor tenga que ser removidos antes de que se pueda acceder a la tapa.

35  
**[0127]** Cuando una composición/componente es empacado a una jeringa, la jeringa normalmente no tendrá una aguja adherida a esta, aunque una aguja separada podría ser suministrada con la jeringa para su montaje y su uso. Aguja de seguridad son preferidas. Las agujas comunes son de calibre 23 de una pulgada, de calibre 25 de una pulgada y de calibre 25 de 5/8 de pulgadas. Las jeringas podrían ser suministradas con etiquetas que se pueden pelarse en las cuales podrían estar impresos el número de lote, la temporada de influenza y la fecha de expiración de los contenidos, para facilitar el mantenimiento de los registros. El émbolo en la jeringa preferiblemente tiene un detenedor para prevenir que el émbolo sea removido accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas podrían tener una tapa y/o un émbolo de caucho de látex. Las jeringas desechables contienen una sola dosis de la vacuna. La jeringa generalmente tendrá una tapa de la punta para sellar a la punta antes de la adherencia de una aguja, y la tapa de la punta es preferiblemente hecha de caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja son empacadas por separado entonces la aguja es encajada preferiblemente con un protector de caucho de butilo.

40  
**[0128]** La emulsión podría ser diluida con un amortiguador antes de empacarse a un matraz o a una jeringa. Amortiguadores comunes incluyen a: un amortiguador de fosfato, un amortiguador de Tris, un amortiguador de borato; un amortiguador de succinato, un amortiguador de histidina; o un amortiguador de citrato. La dilución puede reducir la concentración de los componentes del adyuvante mientras que se retiene sus proporciones relativas, por ejemplo, para suministrar un adyuvante con la "mitad de su fuerza".

45  
**[0129]** Los contenedores podrían ser marcados para mostrar un volumen de una media dosis, por ejemplo, para facilitar la entrega a niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0.5 mililitros podría tener una marca que muestre un volumen de 0.25 mililitros.

50  
**[0130]** En los casos en los que se usa un contenedor de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un matraz), entonces es preferido utilizar un contenedor hecho de un vidrio de borosilicato en vez de un vidrio cal y sosa.

55  
**[0131]** Varios antígenos pueden ser utilizados con emulsiones de aceite en agua, incluyendo, pero sin limitarse a: antígenos virales, tales como proteínas de superficies virales; antígenos bacterianos, tales como proteínas y/o antígenos de sacáridos; antígenos de hongos; antígenos de parásitos; y antígenos de tumores. Este invento es

particularmente útil para vacunas en contra del virus de la influenza, del VIH, de anquilostomiasis, el virus de la hepatitis B, el virus simple del herpes, la rabia, el virus sincitial respiratorio, el citomegalovirus, el *Staphylococcus aureus*, la clamidia, el coronavirus de SARS, el virus de zoster de varicela, el *Streptococcus pneumoniae*, la *Neisseria meningitidis*, la *Mycobacterium tuberculosis*, la *Bacillus anthracis*, el virus de Epstein Barr, el virus del papiloma humano, etc. Por ejemplo:

- 5
  - 10
  - 15
  - 20
  - 25
  - 30
  - 35
  - 40
  - 45
  - 50
  - 55
  - 60
  - 65
- Antígenos del virus de la influenza. Estos pueden tomar la forma de un virus vivo o de un virus desactivado. En los casos en los que se utiliza a un virus desactivado, la vacuna podría comprender a viriones completos, viriones divididos, o antígenos de superficies purificadas (incluyendo a la hemaglutinina y, usualmente, también se incluyen a neuraminidasas). Los antígenos de la influenza también pueden presentarse en la forma de virosomas. Los antígenos podrían tener un subtipo de hemaglutinina, seleccionada de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. La vacuna podría incluir a antígenos de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la influenza, incluyendo al virus de la influenza A y/o al virus de la influenza B, por ejemplo, una vacuna monovalente de A/H5N1 o A/H1N1 o una vacuna trivalente A/H1N1 + A/H3N2 + B. El virus de la influenza podría ser una cepa re-combinatoria, y pudo haber sido obtenida por medio de técnicas genéticas en reversa [por ejemplo, 51-55]. Por lo tanto, el virus podría incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (comúnmente 6 segmentos desde A/PR/8/34, con los segmentos HA y N provenientes de una cepa de vacuna, es decir, una re-combinatoria 6:2). Los virus utilizados como una fuente de antígenos también pueden ser cultivados en huevos (por ejemplo, huevos hembra embrionarios) o en un cultivo celular. En los casos en los que se utiliza un cultivo celular, el sustrato celular comúnmente será una línea celular mamífera, tal como MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. las líneas celulares mamíferas preferidas para cultivar a virus de influenza incluyen a: células MDCK [56-59], derivadas de hígado canino de Madin Darby; células Vero [60-62], derivadas de hígados de monos verdes africanos; o células PER.C6 [63], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. En los casos en que el virus ha sido cultivado en una línea celular mamífera entonces la composición ventajosamente estará libre de proteínas de huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo, por lo tanto, su alergenicidad. Dosis unitarias de la vacuna son comúnmente estandarizadas por referencia a su contenido de hemaglutinina (HA), comúnmente medido por SRID. Las vacunas existentes comúnmente contienen alrededor de 15 µg de HA por cepa, aunque dosis más pequeñas pueden ser utilizadas, particularmente cuando se usa un adyuvante. Dosis fraccionarias tales como un medio (es decir, 7.5 microgramos de HA por cepa), un cuarto y un octavo han sido utilizadas [64,65], como el tener dosis más altas (por ejemplo, dosis multiplicadas por 3 o por 9 [66, 67]). Por lo tanto, las vacunas podrían incluir entre 0.1 y 150 µg de HA por cada cepa de influenza, preferiblemente entre 0.1 y 50 µg, por ejemplo 0.1-20 µg, 0.1-15 µg, 0.1-10 µg, 0.1-7.5 microgramos, 0.5-5 µg, etcétera. Dosis específicas incluyen, por ejemplo, a alrededor de 15, a alrededor de 10, a alrededor de 7.5, a alrededor de 5, a alrededor de 3.8, a alrededor de 3.75, a alrededor de 1.9, a alrededor de 1.5, etc. por cepa.
  - El virus de inmunodeficiencia humano, incluyendo al VIH-1 y al VIH-2. El antígeno comúnmente será un antígeno cobertor.
  - Antígenos superficiales del virus de hepatitis B. Este antígeno es obtenido preferiblemente por métodos de ADN recombinante, por ejemplo, después de la expresión de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A diferencia del HBsAG viral natural, el antígeno recombinante expresado en la levadura no es glicosilado. Puede estar en la forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro promedio es de alrededor de 20nm), incluyendo una matriz límpida conformada de fosfolípidos. A diferencia de las partículas HBsAg naturales, las partículas expresadas en la levadura podrían incluir a fosfatidilinositol. El HBsAg podría ser de cualquier subtipo de ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- y adrq+.
  - Anquilostoma, particularmente como se observa en caninos (*Ancylostoma caninum*). Este antígeno podría ser un Ac-MTP-1 recombinante (metaloproteasa similar a la astacina) y/o una hemoglobinasa aspártica (Ac-APR-1), que podría ser expresada en un sistema celular de baculoviridae/insectos como una proteína secretada [68.69].
  - Antígenos del virus de herpes simple (HSV - herpes simplex virus). Un antígeno preferido de HSV para su uso con el invento es la glicoproteína de membrana gD. Es preferible utilizar la gD de una cepa de HSV-2 (antígeno 'gD2'). La composición puede utilizar una forma de gD en la cual, la región de anclaje de la membrana de la terminal C ha sido eliminada [70], por ejemplo, una gD truncada que comprende a los aminoácidos 1-306 de la proteína natural con la adición de asparagina y glutamina en la terminal C. Esta forma de proteína incluye a un péptido de señalización que es separado para generar una proteína madura de 283 aminoácidos. La eliminación del ancla le permite a la proteína prepararse en una forma soluble.
  - Antígenos del virus de papiloma humano (HPV - human papillomavirus). Los antígenos HPV preferidos para su uso con el invento son las proteínas cápsides L1, que pueden ensamblarse para formar estructuras conocidas como las partículas similares a virus (VLPs - virus-like particles). Las VLPs pueden ser producidas por medio de una expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S.cerevisiae*) o en células de insectos (por ejemplo, en células *Spodoptera*, tales como células *S.frugiperda*, o en células *Drosophila*). Para

células de levadura, los vectores plásmidos pueden portar al gen o a los genes L1. Más preferiblemente, la composición incluye a VLPs L1 de las cepas HPV-16 y HPV-18. Esta combinación bivalente ha demostrado ser altamente efectiva [71]. Adicionalmente a las cepas HPV-16 y HPV-18, también es posible incluir a las VLPs L1 de las cepas HPV-6 y HPV-11. También es posible el uso de cepas oncogénica de HPV. Una vacuna podría incluir a entre 20-60 µg/mililitro (por ejemplo, alrededor de 40 µg/mililitro) de L1 por cada cepa de HPV.

- Antígenos del ántrax. El ántrax puede ser causado por la *Bacillus anthracis*. Antígenos adecuados del *B. anthracis* incluyen a componentes A (factor letal (LF - lethal factor) y el factor edema (EF - edema factor)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B en común conocido como el antígeno protector (PA – protective antigen). Los antígenos podrían ser destoxificados opcionalmente. Detalles adicionales pueden encontrarse en las referencias [72 a 74].
- Antígenos de *S.aureus*. Se conoce a una variedad de antígenos de *S.aureus*. Los antígenos adecuados incluyen a sacáridos capsulares (por ejemplo, de una cepa de tipo 5 y/o de tipo 8) y a proteínas (por ejemplo, IsdB, Hla, etc.). Los antígenos de sacáridos capsulares son conjugados idealmente a una proteína portadora.
- Antígenos de *S.pneumoniae*. Se conoce a una variedad de antígenos de *S.pneumoniae*. Los antígenos adecuados incluyen a sacáridos capsulares (por ejemplo, de uno o más serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, y/o 23F) y a proteínas (por ejemplo, neumolisina, neumolisina destoxificada, proteína de la tríada de polihistidina D (PhtD), etc.). Antígenos sacáridos capsulares son conjugados idealmente con una proteína portadora.
- Antígenos del cáncer. Se conoce a una variedad de antígenos de tumores específicos. El invento podría ser utilizado con antígenos que provocan una respuesta inmuno-terapéutica en contra del cáncer al pulmón, el melanoma, el cáncer a la mama, el cáncer a la próstata, etcétera.

[0132] Una solución del antígeno normalmente será mezclada con la emulsión, por ejemplo, a un índice volumétrico de 1:1. Esta mezcla puede ser realizada por un fabricante de vacunas, antes del relleno, o puede ser realizada en el punto de uso, por un trabajador de la industria de la salud.

#### **Composiciones farmacéuticas**

[0133] Las composiciones hechas usando los métodos del invento son farmacéuticamente aceptables. Podrían incluir a componentes adicionalmente a la emulsión y al antígeno opcional.

[0134] La composición podría incluir un preservante tal como el tiomersal o 2-fenoxietanol. Es preferido, sin embargo, que la vacuna sea sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/mililitro) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [75, 76]. Las vacunas y componentes que no contienen mercurio son más preferidos.

[0135] El pH una composición generalmente estará entre 5.0 y 8.1, y más comúnmente entre 6.0 y 8.0, por ejemplo, entre 6.5 y 7.5. Un proceso del invento podría, por lo tanto, incluir un paso de ajuste del pH de la vacuna antes de su empaque.

[0136] La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo, que contenga menos de 1 EU (unidad de endotoxina - endotoxin unit) por dosis, y preferiblemente inferior a 0.1 EU por dosis. La composición es preferiblemente libre de glútenes.

[0137] La composición podría incluir material para una sola inmunización, o podría incluir material para varias inmunizaciones (es decir, un botiquín de 'varias dosis'). La inclusión de un preservante es preferida en configuraciones de varias dosis.

[0138] Las vacunas son administradas comúnmente en un volumen de dosis de alrededor de 0.5 mililitros, aunque una media dosis (es decir, alrededor de 0.25 mililitros) podría ser administrada para niños.

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

[0139] El invento suministra botiquines y composiciones preparadas utilizando los métodos del invento. Las composiciones preparadas de acuerdo a los métodos del invento son adecuadas para su administración a pacientes humanos, y el invento suministra un método para elevar una respuesta inmunológica en un paciente, que comprende el paso de administrar a una de estas composiciones al paciente.

[0140] También se describe el uso de botiquines y composiciones para su uso como medicamentos. También se describe el uso de: (i) una preparación acuosa de un antígeno; y (ii) una emulsión de aceite en agua preparada de acuerdo al invento, en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmunológica en un paciente.

[0141] La respuesta inmunológica elevada por estos métodos y usos generalmente incluye una respuesta de



anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectores.

[0142] Las composiciones pueden ser administradas de varias formas siendo la ruta más preferida de inmunizaciones por medio de una inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o en la pierna), pero otras rutas disponibles incluyen inyecciones subcutáneas, intranasales [77-79], orales [80], intradérmicas [81, 82], transcutáneas, transdérmicas [83], etcétera.

[0143] Las vacunas preparadas de acuerdo al invento podrían ser utilizadas para tratar a niños y adultos. El paciente podría tener menos de un año de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad, o por lo menos de 55 años de edad. El paciente podría ser de edad avanzada (por ejemplo, tener  $\geq 50$  años de edad, preferiblemente  $\geq 65$  años de edad), de edad temprana (por ejemplo,  $\leq 5$  años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la industria de la salud, personal de las fuerzas armadas y militares, mujeres embarazadas, gente con enfermedades crónicas, pacientes inmuno-deficientes, y gente que viaja al extranjero. Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos, sino que podrían ser utilizadas más generalmente en una población.

[0144] Las vacunas del invento podrían ser administradas a pacientes a sustancialmente el mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional de la industria la salud) que otras vacunas.

**Procesos inmediatos**

[0145] El invento también suministra un método para la fabricación de una vacuna, que comprende la combinación de una emulsión con un antígeno, donde la emulsión tiene las características descritas anteriormente.

**General**

[0146] El término “comprende” abarca a “incluyendo” así como “consiste de”, por ejemplo, una composición “que comprende” a X podría consistir exclusivamente de X o podría incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

[0147] La palabra “sustancialmente” no excluye a “completamente”, por ejemplo, una composición que es “sustancialmente libre” de Y podría ser libre completamente de Y. En los casos en los que fuera necesario, la palabra “sustancialmente” podría ser omitida de la definición del invento.

[0148] El término “alrededor de” en relación a un valor numérico X es opcional y significa, por ejemplo,  $X \pm 10\%$ .

[0149] A menos que se declare específicamente, un proceso que comprende a un paso de mezcla de 2 o más componentes no requiere ningún orden de mezcla específico. Por lo tanto, los componentes pueden ser mezclados en cualquier orden. En los casos en los que existen 3 componentes entonces 2 componentes pueden ser combinados entre sí, y luego la combinación puede ser combinada con el 3<sup>er</sup> componente, etcétera.

[0150] En los casos en los que se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, éstos deberán ser obtenidos de fuentes que sean libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSEs - transmissible spongiform encephalopathies), y en particular libres de encefalopatías espongiiformes bobinas (BSE - bovine spongiform encephalopathy). En general, se prefiere cultivar células en la ausencia total de materiales derivados de animales.

**DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS**

**[0151]**

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

La figura 2 muestra detalles de un rotor y un estator que pueden ser utilizados en un homogeneizador de ese tipo.

La figura 3 muestra 2 perfiles de presión para una modalidad sincrónica de bomba intensificadora.

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

La figura 5 muestra una circulación de tipo I, mientras que la figura 6 muestra una circulación de tipo II. Los contenedores han sido marcados como “C” mientras que el homogeneizador está marcado como “H”. Se muestra la dirección y el orden de los movimientos de los fluidos. En la figura 6 el homogeneizador tiene 2 flechas de entrada y 2 flechas de salida, pero en realidad el homogeneizador tiene un solo canal de entrada y un solo canal de salida.

**MODALIDADES PARA EJECUTAR EL INVENTO**

**Ejemplo 1:**

- 5 **[0152]** Los componentes de la emulsión, el escualeno, el polisorbato 80, el trioleato de sorbitno y el amortiguador de citrato de sodio fueron introducidos a un homogeneizador en línea de alta velocidad de rotor/estator (IKA Super Dispax Reactor DRS 2000/5). Los volúmenes del inicio de la emulsión de 280 l y 250 l fueron utilizados y la velocidad del homogeneizador se estableció a  $5000 \pm 1000$  revoluciones por minuto. La temperatura de la emulsión durante la homogenización fue mantenida por debajo de los 60 °C.
- 10 **[0153]** Las 3 ejecuciones de prueba fueron realizadas. En la primera ejecución de prueba, 280 l de componentes de la emulsión fueron sujetos a la circulación de tipo I, entre el homogeneizador y el primer contenedor de pre-mezcla, durante 20 minutos seguido por una sola circulación de tipo II, transfiriendo a los componentes de la primera emulsión desde un primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, a través del homogeneizador a un 2º contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, y luego de vuelta a través del homogeneizador. En la 2ª ejecución de prueba, 280 l de los componentes de la emulsión fueron sujetos a la circulación de tipo I, entre el homogeneizador y un primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, durante 5 minutos seguido por 5 circulaciones de tipo II, transfiriendo a los componentes de la primera emulsión desde un primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, a través del homogeneizador a un 2º contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, y luego de vuelta a través del homogeneizador al primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla. En la 3ª ejecución de prueba, 250 l de los componentes de la emulsión fueron sujetos a la circulación de tipo I, entre el homogeneizador y el primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, durante 20 minutos seguido por una sola circulación de tipo II, transfiriendo a los componentes de la primera emulsión desde un primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, a través del homogeneizador a un 2º contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla, y luego de vuelta a través del homogeneizador al primer contenedor de acero inoxidable de pre-mezcla.
- 25 **[0154]** La primera emulsión fue homogeneizada hasta que hubo un tamaño promedio de gotas de aceite de 1200 nm o menos y un número de gotas de aceite que tenían un tamaño superior a 1.2 micrómetros de  $5 \times 10^9$ /mililitros o menos.
- 30 **[0155]** La primera emulsión fue sujeta entonces a micro-fluidización para formar a una 2ª emulsión. La emulsión fue pasada a través del dispositivo de micro-fluidización 5 veces. El dispositivo de micro-fluidización fue operado a entre aproximadamente 600 y 800 bar (es decir, entre aproximadamente 9000 y 12,000 psi) y la emulsión fue mantenida a una temperatura de  $40 \pm 5$  °C durante la micro-fluidización por medio del uso de un mecanismo de refrigeración.
- 35 **[0156]** La 2ª emulsión fue filtrada en una forma estéril entonces.
- [0157]** El tamaño promedio de las gotas de aceite en las emulsiones filtradas en cada ejecución de prueba cumplió con las especificaciones para un ayudante MF59.
- 40 **[0158]** Otros parámetros de las emulsiones durante la primera, la 2ª y la 3ª ejecuciones de prueba pueden encontrarse en la tabla 1.

Tabla 1

Parámetro	Unidad	Primera ejecución	2ª ejecución	3ª ejecución
Número de gotas de aceite con un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la 2ª emulsión	/Mililitros	$43.7 \times 10^6$	$56.4 \times 10^6$	$45.1 \times 10^6$
Número de gotas de aceite con un tamaño superior a 1.2 micrómetros después de la filtración	/Mililitros	$0.2 \times 10^6$	$0.6 \times 10^6$	$0.5 \times 10^6$

- 55 **[0159]** Los resultados de todas las 3 ejecuciones de prueba son excelentes. Sin embargo, los resultados en la tabla 1 muestran que la ejecución de prueba 1 produjo el porcentaje más grande de reducción (99.5 por ciento) en un número de partículas con un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la emulsión después de la filtración en comparación al número presente en la 2ª emulsión. Por lo tanto, el mejor patrón de circulación de homogenización es alrededor de 20 minutos de la circulación de tipo I seguido por una circulación de tipo II.
- 60 **[0160]** Se debe entender que el invento ha sido descrito en forma de un ejemplo únicamente y modificaciones podrían ser hechas mientras se permanece dentro del enfoque del invento.

**REFERENCIAS**

- 65 **[0161]**  
 [1] WO90/14837.

- 5
- [2] Podda y Del Giudice (2003) *Expert (Experto) Rev Vaccines (Vacunas)* 2:197-203.
- [3] Podda (2001) *Vaccine (Vacuna)* 19: 2673-2680.
- [4] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Diseño de Vacunas: La Subunidad y el Método de Ayudante)* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN0-306-44867-X).
- 10
- [5] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Adyuvantes de Vacunas: Métodos de Preparación y Protocolos de Investigación)* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series (Volumen 42 de *Métodos en las Series de Medicina Molecular*)). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [6] *New Generation Vaccines (Vacunas de la Nueva Generación)* (eds. Levine et al.). 3ª edición, 2004. ISBN 0-8247-4071-8.
- 15
- [7] O'Hagan (2007) *Expert (Experto) Rev Vaccines (Vacunas)* 6(5):699-710.
- [8] EP-B-2029170
- 20
- [9] Baudner et al. (2009) *Pharm Res.* 26(6): 1477-85.
- [10] Dupuis et al. (1999) *Vaccine (Vacuna)* 18:434-9.
- [11] Dupuis et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:2910-8.
- 25
- [12] Burke et al. (1994) *J Infect Dis* 170:1110-9.
- [13] *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions (Dispersión de Luz a partir de Soluciones Poliméricas y Dispersiones de Nano - partículas)* (W. Scharf), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.
- 30
- [14] Jafari et al (2008) *Food Hydrocolloids (Hidrocoloides de Alimentos)* 22:1191-1202
- [15] WO90/04609.
- 35
- [16] US-4,618,533
- [17] US-6,193,077
- [18] US-6,495,050
- 40
- [19] Chen et al. (1999) *Journal of Applied Polymer Science (Revista de Ciencia Aplicada de Polímeros)*, 72:1699-1711.
- 45
- [20] US-4,413,074
- [21] US-4,432,875
- [22] US-4,340,482
- 50
- [23] US-4,473,474
- [24] US-4,473,475
- [25] US-4,673,504
- 55
- [26] EP-A-0221046.
- [27] US-4,943,374
- 60
- [28] US-6,071,406
- [29] US-4,705,753
- [30] US-5,178,765
- 65
- [31] US-6,495,043

- [32] US-6,039,872
- 5 [33] US-5,277,812
- [34] US-5,531,893.
- [35] US-4,964,990
- 10 [36] Wavhal y Fisher (2002) *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* (Revista de Ciencia de Polímeros Parte B: Física de Polímeros) 40:2473-88.
- [37] WO2006/044463.
- 15 [38] Espinoza-Gómez et al. (2003) *Revista de la Sociedad Química de México* 47:53-57.
- [39] Lidgate et al (1992) *Pharmaceutical Research* (Investigación Farmacéutica) 9(7):860-863.
- 20 [40] US-2007/0014805.
- [41] WO2007/080308.
- [42] WO2007/052155.
- 25 [43] WO2005/089837.
- [44] US 6,692,468.
- 30 [45] WO00/07647.
- [46] WO99/17820.
- [47] US 5,971,953.
- 35 [48] US 4,060,082.
- [49] EP-A-0520618.
- 40 [50] WO98/01174.
- [51] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* (Vacuna) 20:3165-3170.
- [52] Subbarao et al. (2003) *Virology* (Virología) 305:192-200.
- 45 [53] Liu et al. (2003) *Virology* (Virología) 314:580-590.
- [54] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- 50 [55] Webby et al. (2004) *Lancet* (Lanceta) 363:1099-1103.
- [56] WO97/37000.
- [57] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- 55 [58] Halperin et al. (2002) *Vaccine* (Vacuna) 20:1240-7.
- [59] Tree et al. (2001) *Vaccine* (Vacuna) 19:3444-50.
- 60 [60] Kistner et al. (1998) *Vaccine* (Vacuna) 16:960-8.
- [61] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [62] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* (Vacuna) 19:1149-58.
- 65 [63] Pau et al. (2001) *Vaccine* (Vacuna) 19:2716-21.

[64] WO01/22992.

[65] Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.

5 [66] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.

[67] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.

10 [68] Williamson et al. (2006) *Infection and Immunity (Infección e Inmunidad)* 74: 961-7.

[69] Loukas et al. (2005) *PLoS Med* 2(10): e295.

[70] EP-A-0139417.

15 [71] Harper et al. (2004) *Lancet (Lanceta)* 364(9447):1757-65.

[72] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.

20 [73] Demicheli et al. (1998) *Vaccine (Vacuna)* 16:880-884.

[74] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.

[75] Banzhoff (2000) *Immunology Letters (Cartas de Inmunología)* 71:91-96.

25 [76] WO02/097072.

[77] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine (Vacuna)* 22:2566-77.

30 [78] Zurbriggen et al. (2003) *Expert (Experto) Rev Vaccines (Vacunas)* 2:295-304.

[79] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.

[80] Mann et al. (2004) *Vaccine (Vacuna)* 22:2425-9.

35 [81] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health (Salud Pública)* 69:1247-50.

[82] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.

40 [83] Chen et al. (2003) *Vaccine (Vacuna)* 21:2830-6.

[84] EP-A-1574210

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Un método para la fabricación de un adyuvante de vacuna de emulsión de aceite en agua que comprende a escualeno, a polisorbato 80 y a trioleato de sorbitano, donde el método comprende del paso de:
  - (i) La formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño promedio de gotas de aceite usando un homogeneizador, donde la primera emulsión es formada mediante una circulación que comprende:
    - (a) una circulación tipo I de transferencia de los componentes de la primera emulsión entre un primer contenedor y un homogeneizador seguida por
    - (b) una circulación de tipo II de transferencia de los componentes de la primera emulsión desde el primer contenedor a un 2º contenedor a través de un homogeneizador, y luego regresándolos desde el 2º contenedor al primer contenedor a través del mismo homogeneizador, donde sustancialmente todos los componentes de la emulsión desde el primer contenedor son pasados a través del homogeneizador al 2º contenedor, y entonces sustancialmente a todos los componentes de la emulsión desde el 2º contenedor son pasados a través del homogeneizador de vuelta al primer contenedor;
  - (ii) la micro-fluidización de la primera emulsión para formar a una 2ª emulsión que tiene un 2º tamaño promedio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño promedio de gotas de aceite, al circular a los componentes de la 2ª emulsión a través de un dispositivo de micro-fluidización varias veces, donde la circulación comprende la transferencia de los componentes de la 2ª emulsión desde el primer contenedor de la emulsión, a través de un dispositivo de micro-fluidización a un 2º contenedor de la emulsión, y entonces a través del mismo dispositivo de micro-fluidización.
2. El método de la reivindicación 1, donde el homogeneizado suministra una tasa de desmenuzamiento de hasta  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , y donde la micro-fluidización ocurre en una cámara interacción que suministra una tasa de desmenuzamiento superior a  $2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ .
3. El método de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende: (iii) la filtración de la 2ª emulsión.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el paso (i) comprende a 2 o más ciclos de transferencia de los componentes de la primera emulsión desde el primer contenedor al 2º contenedor y de regreso nuevamente.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el primer tamaño promedio de gotas de aceite es 5000 nm o menos.
6. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el número de gotas de aceite con un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la primera emulsión es  $5 \times 10^{11}$  /ml o menos.
7. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el 2º tamaño promedio de gotas de aceite es 500 nm o menos.
8. El método de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el número de gotas de aceite que tienen un tamaño superior a 1.2 micrómetros en la 2ª emulsión es  $5 \times 10^{10}$  /mililitros o menos.
9. Un método para preparar una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y combinar la emulsión con un antígeno.
10. Un método para preparar un botiquín de vacuna que comprende preparar una emulsión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8 y empacar la emulsión en un botiquín como un componente de botiquín junto con un componente antígeno.
11. El método de la reivindicación 10, donde los componentes del botiquín están en matraces separados.
12. El método de la reivindicación 11, donde los matraces son hechos de vidrio de borosilicato.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a la 12, donde el adyuvante es un adyuvante por lotes y el método comprende extraer dosis unitarias del adyuvante por lotes para empacarse en forma de componentes de botiquines.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a la 13, donde el antígeno es un antígeno del virus de la

influenza.

5 15. El método de la reivindicación 14, donde la combinación de la emulsión y del antígeno forman una composición de vacuna y donde la composición de vacuna incluye a alrededor de 15 µg, a alrededor de 10 µg, a alrededor de 7.5 microgramos, a alrededor de 5 µg, a alrededor de 3.8 microgramos, a alrededor de 1.9 microgramos, a alrededor de 1.5 microgramos, de hemaglutinina por cepa de virus de la influenza.

10 16. El método de la reivindicación 14 o de la reivindicación 15, donde la combinación de la emulsión y del antígeno forma una composición de vacuna y donde la composición de vacuna incluye a tiomersal o un conservante de 2-fenoxietanol.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

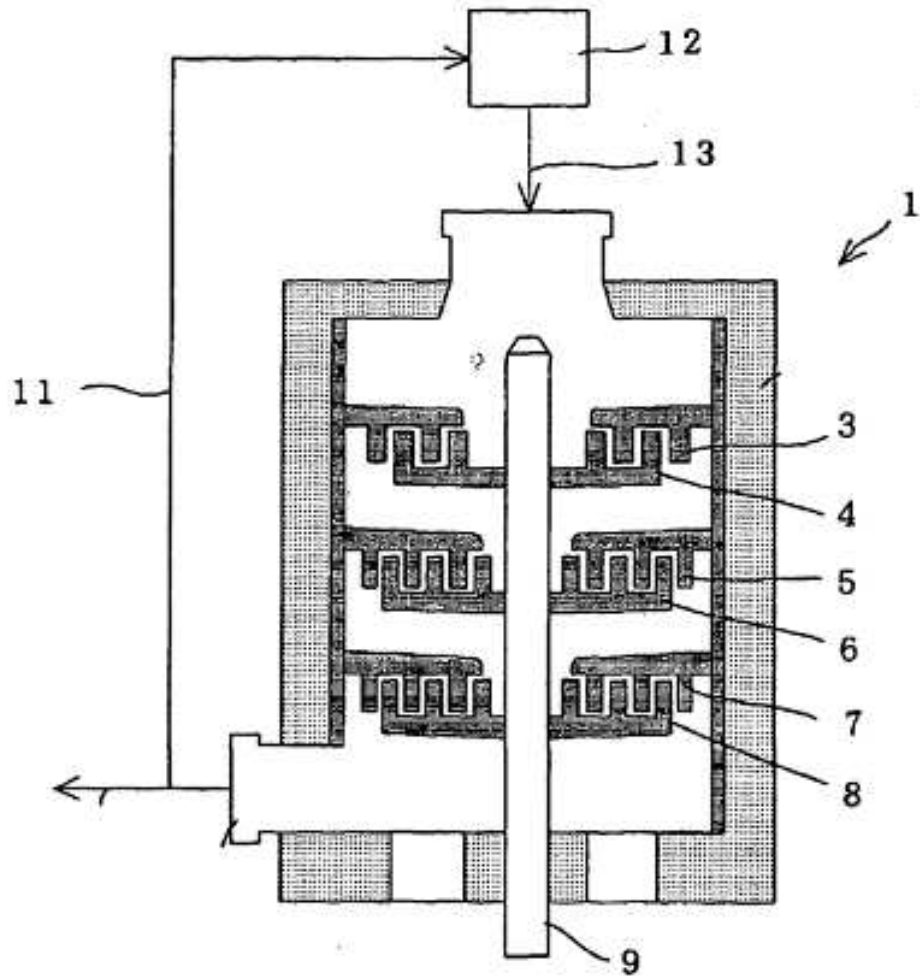
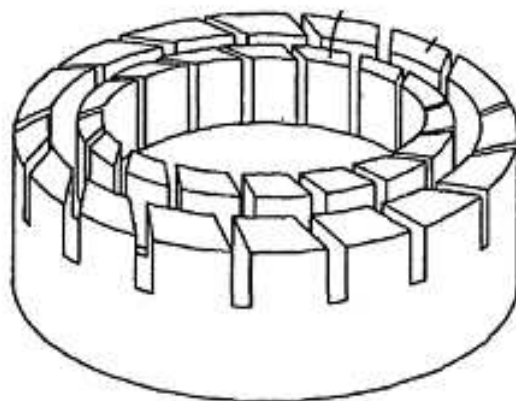


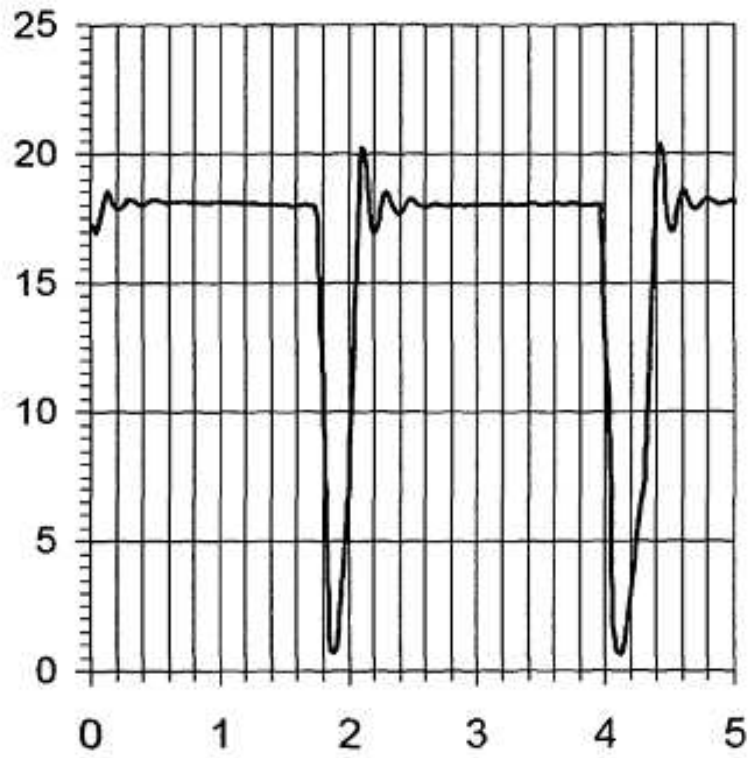
Figura 2





*Figura 3*

*Figura 3A*



*Figura 3B*

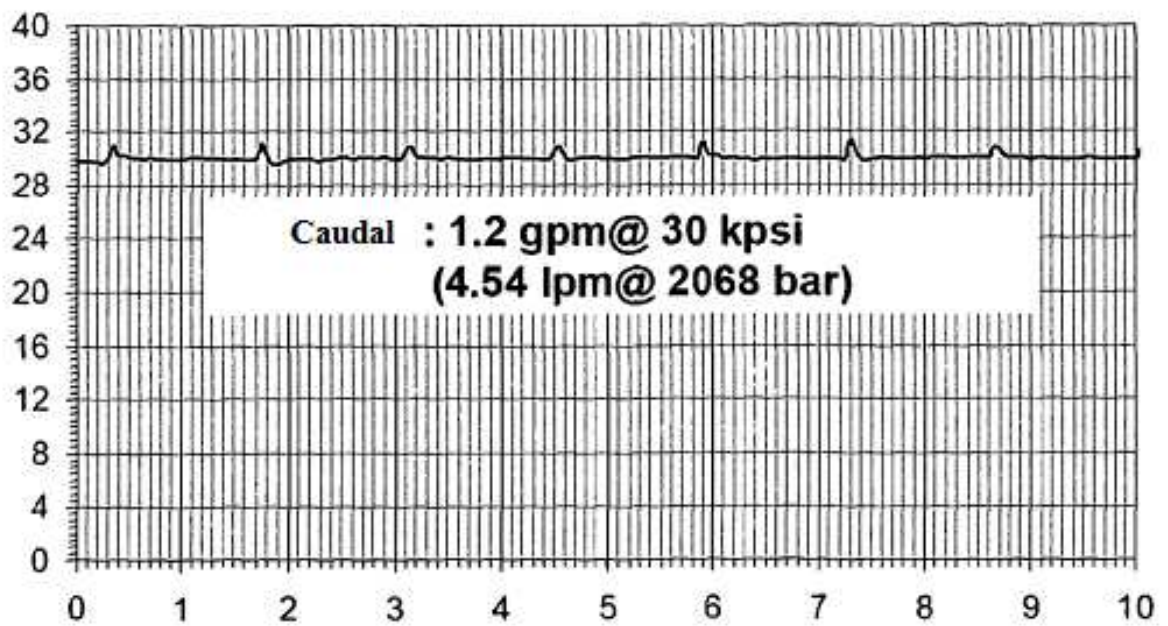


Figura 4

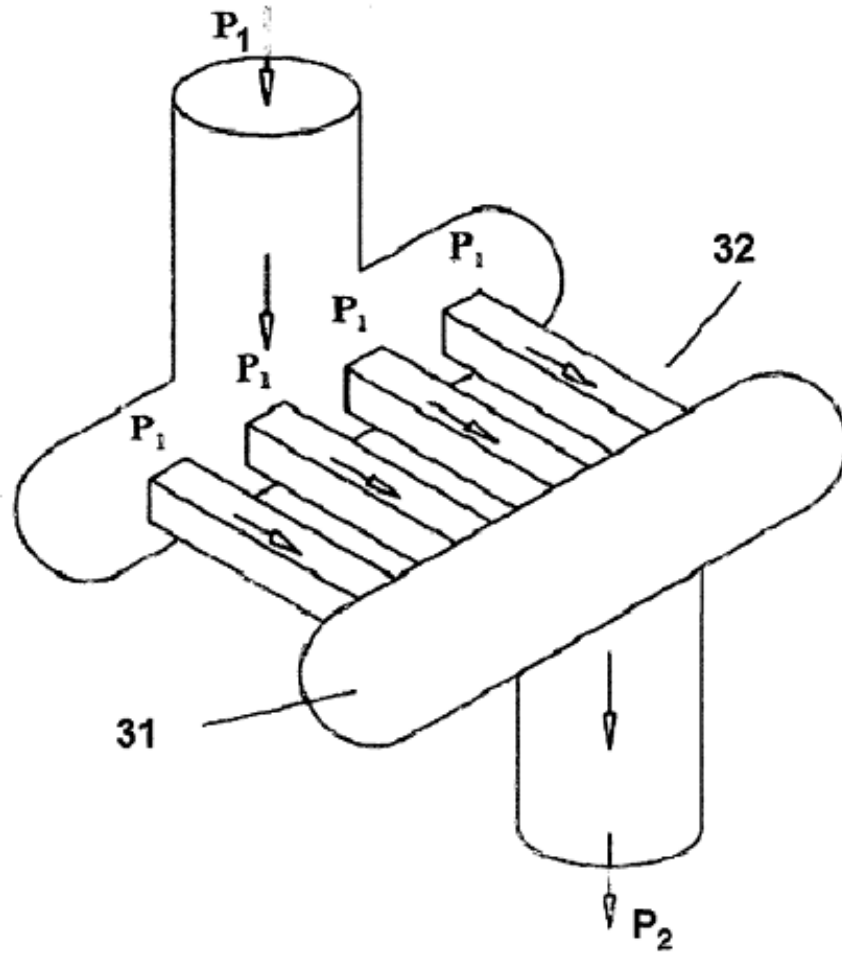


Figura 5

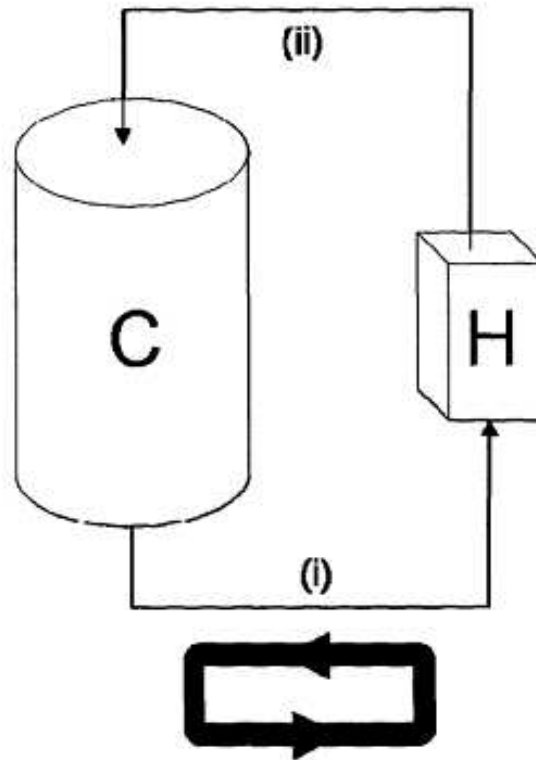


Figura 6

