

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 511**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/US2012/022871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12103421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12704573 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2667852**

54 Título: **Nanoemulsiones de adyuvante con inhibidores de cristalización**

30 Prioridad:

27.01.2011 US 201161436946 P

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

17.05.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

BRITO, LUIS;

SINGH, MANMOHAN y

O'HAGAN, DEREK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 612 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanoemulsiones de adyuvante con inhibidores de cristalización

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional en Estados Unidos N.º 61/436,946, presentada el 27 de enero de 2011.

5 **Campo técnico**

La invención pertenece al campo de las emulsiones, que son útiles para la liberación de agentes farmacológicos lipófilos, tales como inmunopotenciadores.

Antecedentes de la invención

10 Los agentes farmacológicos pueden requerir su formulación para optimizar sus efectos *in vivo*. Por ejemplo, estos se pueden encapsular o adsorber. La formulación apropiada puede proporcionar, por ejemplo, una dosificación homogénea, una eficacia mejorada, una mejor farmacocinética, o una fabricación más sencilla. Por ejemplo, en la referencia 1 se encapsulaba indometacina en nanopartículas poliméricas, y en la referencia 2 se formulaba un inmunopotenciador de muramil dipéptido lipófilo con microesferas de polilactida.

15 Un objeto de la invención es proporcionar modos adicionales y mejorados de formulación de agentes farmacológicos lipófilos para su uso *in vivo*, que incluyen procedimientos que presentan un procesamiento mejorado durante la fabricación cuando se comparan con monodispersiones simples del agente lipófilo.

Divulgación de la invención

20 Los inventores intentaron formular agentes farmacológicos lipófilos (en particular, inmunopotenciadores lipófilos) en emulsiones de aceite en agua, pero las emulsiones solo pudieron admitir bajas concentraciones del agente. Cargas mayores llevaron a la cristalización del agente lipófilo, lo que dio una emulsión inestable no deseada. Para superar esta cristalización observada, la invención usa una emulsión de aceite en agua en combinación con un inhibidor de la cristalización, y esta combinación proporciona emulsiones en las que se pueden cargar altos niveles de agentes farmacológicos lipófilos.

25 Por tanto, la invención proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa, un tensioactivo y un inhibidor de la cristalización. Estas emulsiones son útiles para formular agentes farmacológicos lipófilos para su uso *in vivo*, y, por tanto, la invención proporciona también una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa, un tensioactivo, un inhibidor de la cristalización, y un agente farmacológico lipófilo.

30 La invención proporciona también una composición inmunogénica que comprende (a) una emulsión de aceite en agua de la invención y (b) un inmunógeno.

35 La invención proporciona también un procedimiento para la preparación de una emulsión de aceite en agua, que comprende una etapa de homogeneización de una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso, y un componente tensioactivo, en el que se añade un inhibidor de la cristalización a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización (preferentemente antes). Un agente farmacológico lipófilo se puede añadir (i) a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización, o (ii) a la emulsión antes o después de la adición del inhibidor de la cristalización; se añade preferentemente a la mezcla antes de la homogeneización y antes de la adición del inhibidor de la cristalización. La homogeneización puede comprender una microfluidización.

La invención proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezcla de un inmunógeno con una emulsión de la invención.

40 ***Agentes farmacológicos lipófilos***

Las emulsiones de la invención son útiles para formular agentes farmacológicos lipófilos (LPA) para su uso *in vivo*.

45 Los LPA para su uso en la invención son inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP). Estos SMIP tienen un peso molecular inferior a 5000 Da (por ejemplo, < 4000 Da, < 3000 Da, < 2000 Da, o < 1000 Da). Actúan como agonistas de uno o más receptores de tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 y/o TLR11, o pueden ser agonistas de otros receptores tales como CD1d. Agonistas lipófilos de TLR1 incluyen lipopéptidos. Agonistas lipófilos de TLR2 incluyen glucolípidos y ácido lipoteicoico.

50 Agonistas lipófilos de TLR7 incluyen las naftiridinas desveladas en la referencia 3. SMIP lipófilos específicos para su uso en la invención incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los compuestos desvelados en los ejemplos de la referencia 3, por ejemplo el compuesto 161 (compuesto "A" en el presente documento). El compuesto "A" es muy lipófilo y altamente cristalino.

Las emulsiones de la invención pueden incluir solamente un LPA o pueden incluir múltiples LPA.

En emulsiones preferentes, la mayoría o todo (por ejemplo, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$) el LPA total está presente (disuelto) en las gotitas de aceite de la emulsión.

La concentración de LPA en una emulsión de la invención puede variar en un intervalo amplio, por ejemplo, entre 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 mg/ml , entre 0,1 mg/ml y 5 mg/ml , o entre 0,5 mg/ml y 2 mg/ml .

5 **Inhibidores de la cristalización**

Las emulsiones de la invención incluyen un inhibidor de la cristalización. Varios de tales inhibidores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, una emulsión de la invención puede incluir una polivinilpirrolidona (PVP), una hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), un poloxámero, un derivado de dextrina, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol (PPG), un acetato de polivinilo (PVA), un copolímero de vinilpirrolidona y acetato de vinilo, o glicerina [4-6]. Los inhibidores de la cristalización preferentes son polímeros.

La PVP es un polímero soluble en agua formado a partir de monómeros de N-vinilpirrolidona. Las PVP útiles pueden tener un valor de K (coeficiente de viscosidad de Fikentscher) de entre 10 y 150, por ejemplo, entre 12 y 100, entre 12 y 20, o entre 15 y 30. Una PVP útil tiene un valor de K de 15.

Las HPMC útiles incluyen sales o ésteres tales como el acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa.

15 Los poloxámeros son copolímeros no iónicos con una cadena central hidrófoba de polioxipropileno flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno. Poloxámeros útiles para inhibir la cristalización incluyen el poloxámero "407" (Lutrol 127) [6].

Los inhibidores de la cristalización útiles son normalmente amorfos, por ejemplo, PVP.

20 La cantidad de inhibidor de la cristalización en una emulsión de la invención puede variar ampliamente pero dependerá del LPA en cuestión y de la dosis deseada del mismo. La cantidad de inhibidor de la cristalización en la emulsión será la suficiente para asegurar que sustancialmente todo el LPA siga siendo amorfo durante el periodo de validez deseado de la emulsión con una carga adecuada de LPA.

Las emulsiones de la invención pueden incluir solamente un inhibidor de la cristalización o pueden incluir múltiples inhibidores de la cristalización.

25 El inhibidor de la cristalización se localizará normalmente en la fase oleosa de la emulsión, si bien puede estar presente también en la fase acuosa.

Emulsiones de aceite en agua

Las emulsiones de la invención comprenden gotitas de aceite en el seno de una fase acuosa. Las emulsiones incluyen un tensioactivo y este puede facilitar la formación y estabilización de la emulsión.

30 La emulsión puede comprender uno o más aceites y/o ácidos grasos. Un aceite o aceites adecuados incluyen aquellos procedentes, por ejemplo, de una fuente vegetal o una fuente animal (tal como pescado). El aceite es idealmente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco, y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ilustran los aceites de nueces. Se puede usar el aceite de jojoba obtenido, por ejemplo de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen el aceite de cártamo, el aceite de semilla de algodón, el aceite de semilla de girasol, el aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, aunque también se puede usar el aceite de otros granos de cereal, tal como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticual y similares. Aunque no están presentes de modo natural en los aceites de semillas, se pueden preparar ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y, por tanto, se pueden usar. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

45 La mayor parte del pescado contiene aceites metabolizables que se pueden recuperar con facilidad. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, el aceite de hígado de tiburón, y el aceite de ballena, tal como el espermaceti, ilustran diversos de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente invención. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también se puede usar. Los aceites de pescado, que incluyen escualeno y escualano, se obtienen con facilidad a partir de fuentes comerciales mediante procedimientos conocidos en la técnica.

50 Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los α , β , γ , δ , ϵ , o ξ tocoferoles, aunque los α -tocóferoles son preferentes. Se puede usar tanto el D- α -tocóferol como el DL- α -tocóferol. Un α -tocóferol preferente es el DL- α -tocóferol. Se puede usar una combinación de aceites que comprende escualeno y un tocoferol (por

ejemplo, DL- α -tocoferol).

Emulsiones preferentes comprenden escualeno, un aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide ramificado insaturado ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C(=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2)_2]$; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; N.º CAS 7683-64-9).

- 5 El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

El componente acuoso de la emulsión puede ser agua pura (por ejemplo agua para inyección (w.f.i.)) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo sales citrato o fosfato, tal como sales de sodio. Los tampones normales incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Una fase acuosa tamponada es preferente, y los tampones se incluyen normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

10

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

15

La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, si bien no se limitan a los mismos: los tensioactivos de ésteres de sorbitán polioxietileno (denominados comúnmente Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados con el nombre comercial DOWFAX®, tal como copolímeros de bloque EO/PO; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos de repetición etoxi (oxi-1,2-etanodiol), siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como la fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tal como monolauril éter de trietilenglicol (Brij 30); polioxietileno-9-lauril éter; y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los Span), tal como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferentes para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de sorbitán polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

20

25

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

30

35

Además de los componentes de aceite, acuosos y tensioactivos, una emulsión puede incluir componentes adicionales. Por ejemplo, una emulsión puede incluir colesterol y/o un fosfolípido. La inclusión de un fosfolípido puede aumentar la capacidad de carga de una emulsión. Clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, si bien no se limitan a las mismas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicérols, etc. Fosfolípidos útiles se enumeran en la Tabla 1. Estos componentes de fosfolípidos estarán presentes normalmente en la fase oleosa de una emulsión.

40

Cantidades preferentes de aceite (% en volumen) en la emulsión final están entre un 2 y un 20 %, por ejemplo un 5-15 %, un 6-14 %, un 7-13 %, un 8-12 %. Un contenido de escualeno de aproximadamente un 4-6 % o de aproximadamente un 9-11 % es particularmente útil.

45 Cantidades preferentes de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre un 0,001 % y un 8 %. Por ejemplo: ésteres de sorbitán polioxietileno (tal como polisorbato 80) de un 0,2 a un 4 %, en particular de un 0,4-0,6 %, de un 0,45-0,55 %, de aproximadamente un 0,5 %, de un 1,5-2 %, de un 1,8-2,2 %, de un 1,9-2,1 %, de aproximadamente un 2 %, o de un 0,85-0,95 %, o de aproximadamente un 1 %; ésteres de sorbitán (tal como trioleato de sorbitán) de un 0,02 a un 2 %; en particular de aproximadamente un 0,5 % o de aproximadamente un 1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100) de un 0,001 a un 0,1 %, en particular de un 0,005 a un 0,02 %, éteres polioxietileno (tales como laurith 9) de un 0,1 a un 8 %, preferentemente de un 0,1 a un 10 % y, en particular, de un 0,1 a un 1 % o de aproximadamente un 0,5 %.

50

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo, y la relación entre ellas, pueden variar dentro de amplios límites mientras aún se está formando la emulsión. Un experto en la materia puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, si bien es característica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para el aceite y el tensioactivo (exceso de aceite). Análogamente, las cantidades de colesterol y/o fosfolípido se pueden variar ampliamente mientras se obtiene una emulsión deseada, por ejemplo entre 0,5 mg/ml y 20 mg/ml, por ejemplo entre 2 y 10 mg/ml, o entre 3 y 7 mg/ml, o de aproximadamente 5 mg/ml. Las cantidades de

55

estos diversos componentes se pueden seleccionar para proporcionar una formulación útil del LPA relevante, por ejemplo para asegurar que hay suficiente aceite para disolver la dosis deseada de LPA, etc., mientras se proporciona una emulsión estable con una alta carga de LPA.

5 Un parámetro importante para asegurar la actividad inmunoestimulante de una emulsión, particularmente en animales grandes, es el tamaño (diámetro) de las gotitas de aceite. Las emulsiones más eficaces tienen un tamaño de gotita en el intervalo submicrométrico. Los tamaños de gotita estarán adecuadamente en el intervalo de 50-750 nm. El tamaño de gotita promedio más conveniente es inferior a 250 nm, por ejemplo, inferior a 200 nm, inferior a 150 nm. El tamaño de gotita promedio está convenientemente en el intervalo de 80-180 nm. Idealmente, al menos un 80 % (en número) de las gotitas de aceite de la emulsión tienen un diámetro inferior a 250 nm y, preferentemente, al menos un 90 %. Los aparatos para determinar el tamaño de gotita promedio en una emulsión, así como la distribución de tamaños, están disponibles en el mercado. Estos usan normalmente las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o detección óptica de partícula única, por ejemplo, las series de instrumentos Accusizer® y Nicomp® disponibles en Particle Sizing Systems (Santa Bárbara, EE.UU.), o los instrumentos Zetasizer® de Malvern Instruments (GB), o los instrumentos analizadores de la distribución de tamaños de partícula de Horiba (Kioto, Japón).

15 Idealmente, la distribución de tamaños de las gotitas (en número) tiene solamente un máximo, es decir, es una población única de gotitas distribuida alrededor de un promedio (moda), más que tener dos máximos. Las emulsiones preferentes tienen una polidispersidad < 0,4 por ejemplo, de 0,3 o inferior.

20 Emulsiones adecuadas con gotitas submicrométricas y una estrecha distribución de tamaños se pueden obtener usando la microfluidización. Esta técnica reduce el tamaño promedio de las gotitas de aceite mediante la propulsión de corrientes de los componentes de entrada a través de canales fijados geoméricamente a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes contactan con las paredes de los canales, las paredes de la cámara y entre sí. Las fuerzas de cizalla, impacto y cavitación resultantes causan la reducción del tamaño de las gotitas. Se pueden efectuar etapas repetidas de microfluidización hasta que se consigue una emulsión con un tamaño de gotita promedio y una distribución deseados.

25 Como alternativa a la microfluidización, se pueden usar procedimientos térmicos para causar una inversión de fases, tal como se desvela en la referencia 7. Estos procedimientos pueden proporcionar también una emulsión submicrométrica con una estrecha distribución de tamaños de partícula.

30 Las emulsiones preferentes se pueden esterilizar mediante filtración, es decir, sus gotitas pueden pasar a través de un filtro de 220 nm. Además de proporcionar una esterilización, este procedimiento elimina también cualquier gotita grande de la emulsión.

35 Las emulsiones preferentes son emulsiones adyuvantes, es decir, estas pueden proporcionar un efecto inmunoestimulante *in vivo* en un mamífero, incluso si se administran sin el agente lipófilo y sin el inhibidor de la cristalización. Emulsiones adyuvantes conocidas, en las que se pueden incorporar un agente lipófilo y un inhibidor de la cristalización incluyen:

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

- Emulsiones que comprenden escualeno, α -tocoferol (idealmente DL- α -tocoferol) y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener (en peso) de un 2 a un 10 % de escualeno, de un 2 a un 10 % de α -tocoferol y de un 0,3 a un 3 % de polisorbato 80, por ejemplo, un 4,3 % de escualeno, un 4,7 % de α -tocoferol, y un 1,9 % de polisorbato 80. La relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90) ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2, o a una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una de tales emulsiones se puede preparar disolviendo el polisorbato 80 en PBS para dar una solución al 2 %, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), sometiendo seguidamente la mezcla a una microfluidización. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.

- Una emulsión que comprende escualeno, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un tensioactivo Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes a partir de los antígenos. La emulsión puede incluir también un 3d-MPL. La emulsión puede incluir también una saponina, tal como QS21. La fase acuosa puede

contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter polioxietileno (por ejemplo, cetosteáril éter polioxietileno (12)), y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o un éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [7]. La emulsión puede incluir también uno o más de los siguientes: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquil poliglucósido. También puede incluir un antagonista de TLR4, tal como uno cuya estructura química no incluye un anillo de azúcar [8]. Tales emulsiones pueden estar liofilizadas.

10 **Inmunógenos**

Cuando el LPA es un inmunopotenciador, las emulsiones de la invención son útiles para la administración conjunta con inmunógenos, proporcionando de este modo una inmunogenicidad potenciada. Así, una composición inmunogénica de la invención puede comprender una emulsión que contiene un SMIP de la invención y un inmunógeno.

- 15 El inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria frente a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. Como alternativa a la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno, el inmunógeno puede ser un autoantígeno para inmunoterapia, por ejemplo, un antígeno tumoral.

20 Inmunógenos bacterianos pueden comprender proteínas, sacáridos, y/o lipopolisacáridos. Pueden ser bacterias vivas, bacterias inactivadas, o subunidades bacterianas. Ejemplos de inmunógenos útiles que inducen una respuesta inmunitaria frente a:

25 *Neisseria meningitidis*: inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, proteínas de la membrana y/o sacáridos capsulares. Son útiles sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135, y/o Y. Adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y proteínas que se unen al factor H son inmunógenos de proteínas de la membrana útiles. Una vacuna preferente incluye los antígenos de proteína desvelados en la referencia 9.

Streptococcus pneumoniae: inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, proteínas y/o sacáridos capsulares. Por ejemplo, se pueden usar sacáridos capsulares de cualquiera de los serotipos neumocócicos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, y/o 33F.

30 *Streptococcus pyogenes*: inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, proteínas y/o sacáridos capsulares. Proteínas útiles se desvelan en las referencias 10 y 11.

Moraxella catarrhalis.

Bordetella pertussis: Inmunógenos de pertussis útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, toxina o toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.

35 *Staphylococcus aureus*: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, proteínas y/o sacáridos capsulares. Por ejemplo, se pueden usar los sacáridos capsulares de tipo 5 y/o de tipo 8.

Clostridium tetani: El inmunógeno normal es el toxoide tetánico.

Corynebacterium diphtheriae: el inmunógeno normal es el toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae tipo B: El inmunógeno Hib normal es su sacárido capsular, PRP.

40 *Pseudomonas aeruginosa*

Streptococcus agalactiae: inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, proteínas y/o sacáridos capsulares. Proteínas útiles se desvelan en la referencia 12. Se puede usar sacáridos capsulares de uno o más de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

45 *Chlamydia trachomatis*: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, OmpHlike, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, tal como se desvela en la referencia 13). El LcrE [14] y el HtrA [15] son dos inmunógenos preferentes.

Chlamydia pneumoniae: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, las proteínas desveladas en la referencia 16.

50 *Helicobacter pylori*: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, CagA, VacA, NAP, y/o ureasa [17].

Escherichia coli: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa (ECEAg), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* patógena extraintestinal (ECPEX) y/o *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Las cepas de ECPEX incluyen *E. coli* uropatógena (ECUP) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (ECMN). Los inmunógenos ECUP útiles se desvelan en las referencias 18 y 19. Los inmunógenos ECMN útiles se desvelan en la referencia 20. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD [21].

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: Inmunógenos útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los que se desvelan en las referencias 22 y 23.

Salmonella typhi: el inmunógeno *S. typhi* normal es su sacárido capsular, Vi.

Cuando el inmunógeno es un sacárido, estará normalmente conjugado a una proteína transportadora. Por ejemplo, son conocidas en la técnica vacunas conjugadas de sacárido y neumococo, Hib, *S. Aureus*, *S. typhi* y meningococo. Las proteínas transportadoras son normalmente una toxina o toxoide bacteriano (por ejemplo, un toxoide diftérico o tetánico, o una forma mutante no tóxica de los mismos, por ejemplo, CRM 197 [24]), si bien se pueden usar otras proteínas transportadoras. Por ejemplo, proteínas transportadoras adecuadas incluyen, si bien no se limitan a las mismas: complejos de proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* [25], péptidos sintéticos [26, 27], proteínas de choque térmico [28, 29], proteínas de pertussis [30, 31], citocinas [32], linfocinas [32], hormonas [32], factores del crecimiento [32], epítomos de células T CD4⁺ humanas múltiples que comprenden proteínas artificiales procedentes de diversos antígenos derivados de patógenos [33] tales como N19 [34], proteína D de *H. influenzae* [35-37], proteínas de adquisición de hierro [38], toxina A o B de *C. difficile* [39], exoproteína A recombinante de *P. aeruginosa* (rEPA) [40], pneumolisina [41] o sus derivados no tóxicos [42], proteína A de la superficie neumocócica PspA [43], etc.

Los inmunógenos víricos pueden comprender proteínas. Pueden ser virus vivos, virus inactivados, o subunidades de virus. Ejemplos de inmunógenos útiles que inducen una respuesta inmunitaria frente a:

Orthomyxovirus: Inmunógenos útiles pueden ser los procedentes del virus de la gripe A, B o C. Se pueden usar un virus vivo atenuado o un virus inactivado, que incluyen un virus inactivado completo, una subunidad viral, o glucoproteínas de la superficie de un virus (incluyendo la hemaglutinina). La vacuna puede ser monovalente, divalente, trivalente, tetravalente o superior.

Paramyxoviridae viruses: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de Pneumovirus (por ejemplo, virus sincital respiratorio), Paramixovirus (por ejemplo, virus parainfluenza), Metapneumovirus y Morbillivirus (por ejemplo, sarampión).

Poxviridae: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de *Orthopoxvirus* tales como *Variola vera*, que incluyen si bien no se limitan a los mismos, *Variola mayor* y *Variola menor*.

Picornavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de Picornavirus, tales como Enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aphthovirus. En una realización, el enterovirus es un poliovirus, por ejemplo, un poliovirus de tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3.

Bunyavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un *Orthobunyavirus*, tal como el virus de la encefalitis de California, un *Phlebovirus*, tal como el virus de la fiebre del Valle del Rift, o un *Nairovirus*, tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

Heparnavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (VHA).

Togavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Togavirus, tal como un Rubivirus, un Alphavirus, o un Arterivirus. Estos incluyen el virus de la rubeola.

Flavivirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus del bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, virus de la encefalitis de Powassan.

Pestivirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Pestivirus, tal como la diarrea viral bovina (DVB), la peste porcina clásica (PPC) o la enfermedad de la frontera (EF).

Hepadnavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Hepadnavirus, tal como el virus de la hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Otros virus de la hepatitis: Una composición puede incluir un inmunógeno del virus de la hepatitis C, del virus de la hepatitis delta, del virus de la hepatitis E, o del virus de la hepatitis G.

Rhabdovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un Rhabdovirus, tal como un lisavirus (por ejemplo, virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV).

5 *Caliciviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de Caliciviridae, tales como el virus Norwalk y virus de tipo Norwalk, tales como el virus Hawái y el virus Nieve de la montaña.

10 *Coronavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un coronavirus del SARS, bronquitis infecciosa aviar (BIA), virus de la hepatitis del ratón (VHR), virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Los antígenos del coronavirus pueden comprender una proteína de la espícula.

Retrovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un oncovirus, un lentivirus o un espumavirus.

Reovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus, o un coltivirus.

15 *Parvovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados del parvovirus B19.

20 *Herpesvirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de un virus del herpes humano, tal como, a modo solo de ejemplo solamente, el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8).

Papovavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, los derivados de los papilomavirus y los poliomavirus. El papilomavirus puede ser del serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

Adenovirus: Los inmunógenos víricos incluyen los derivados del serotipo 36 de adenovirus (Ad-36).

25 Los inmunógenos víricos se pueden derivar de dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gysum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoides*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum*, y/o *Trichophyton faviforme*; o de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cytophycoccus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon spp.*, *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bienewisi*; las menos comunes son *Brachiola spp*, *Microsporidium spp.*, *Nosema spp.*, *Pleistophora spp.*, *Trachipleistophora spp.*, *Vittaforma spp*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia spp.*, *Fonsecaea spp.*, *Wangiella spp.*, *Sporothrix spp.*, *Basidiobolus spp.*, *Conidiobolus spp.*, *Rhizopus spp*, *Mucor spp*, *Absidia spp*, *Mortierella spp*, *Cunninghamella spp*, *Saksenaea spp.*, *Alternaria spp*, *Curvularia spp*, *Helminthosporium spp*, *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Monolinia spp*, *Rhizoctonia spp*, *Paecilomyces spp*, *Pithomyces spp*, y *Cladosporium spp*.

45 *Formación de la emulsión*

Las emulsiones de la invención se pueden preparar mediante diversos procedimientos. Tal como se ha mencionado anteriormente, se puede usar la microfluidización o la inversión de fases para proporcionar emulsiones con gotitas de aceite pequeñas. Idealmente, los componentes de la emulsión se combinan antes de usar estas técnicas, por ejemplo, de modo que todos los componentes se microfluidicen conjuntamente. En otras realizaciones, sin embargo, se puede formar una emulsión a partir del componente acuoso, el tensioactivo, y los componentes oleosos, y después se pueden añadir el LPA y el inhibidor de la cristalización. Normalmente, el LPA y el inhibidor de la cristalización se añaden al aceite, y esta mezcla oleosa se combina con el componente acuoso antes de la microfluidización, añadiendo el tensioactivo bien como un tercer componente, o bien como parte del componente acuoso o del oleoso. También se pueden usar otros órdenes de mezcla. En general, un inmunógeno se añadirá una vez que se haya formado la emulsión, por ejemplo, tras la microfluidización.

Un procedimiento para formar la emulsión comprende combinar el componente acuoso, el aceite y los componentes tensioactivos con una solución orgánica del LPA, por ejemplo, en un disolvente orgánico volátil tal como diclorometano o cloruro de metileno. El disolvente volátil se puede evaporar, por ejemplo, tras la homogeneización de la muestra. Tras la evaporación, la mezcla homogeneizada se puede microfluidizar.

5 **Composiciones farmacéuticas y productos**

Las emulsiones y composiciones inmunogénicas de la invención son para su uso *in vivo* (en humanos o animales) y, por tanto, deben incluir solamente componentes farmacéuticamente aceptables. Componentes farmacéuticos útiles, tales como un vehículo o vehículos y/o un excipiente o excipientes, se discuten en la referencia 44.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Las composiciones sin mercurio son preferentes, y se pueden preparar vacunas sin conservantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden tener una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo, de 240-360 mOsm/kg, o de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones farmacéuticas tienen normalmente un pH entre 5,0 y 9,5 por ejemplo entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles.

15 Las composiciones farmacéuticas son preferentemente no pirogénicas, por ejemplo contienen < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida convencional) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas preferentemente no tienen gluten.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en forma de dosis unitarias. En algunas realizaciones, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1 y 1,0 ml, por ejemplo de aproximadamente 0,5 ml.

Las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, por ejemplo para inyección intramuscular.

Procedimientos de tratamiento y usos médicos

25 La invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica de la invención. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica una inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

La invención proporciona también una emulsión o una composición inmunogénica de la invención para su uso en provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero.

30 La invención proporciona también el uso de una emulsión o una composición inmunogénica de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Al provocar una respuesta inmunitaria en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, se puede proteger al mamífero frente a diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo frente a enfermedades bacterianas y/o víricas tal como se ha discutido anteriormente.

35 La invención proporciona también un dispositivo de administración que contiene una composición inmunogénica de la invención. Este dispositivo se puede usar para administrar la composición a un sujeto mamífero.

40 El mamífero es preferentemente un humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño en edad de caminar o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna prevista para niños se puede administrar también a adultos, por ejemplo, para evaluar su seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

45 Las composiciones de la invención se administrarán por lo general directamente a un paciente. La administración directa se puede efectuar mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o a través de las mucosas tal como mediante administración rectal, oral (por ejemplo, comprimidos, pulverizaciones), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, ótica, pulmonar o a otras mucosas.

La invención se puede usar para inducir inmunidad sistémica y/o de la mucosa, preferentemente una inmunidad sistémica y/o de la mucosa potenciada.

50 Preferentemente, la inmunidad sistémica y/o de la mucosa potenciada se refleja en una respuesta inmunitaria mediada por TH1 y/o TH2 potenciada. Preferentemente, la respuesta inmunitaria potenciada incluye un aumento de la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

La dosificación puede ser mediante una pauta de dosis individual o una pauta de dosis múltiples. Se pueden usar dosis múltiples en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de dosis múltiples las diversas dosis se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, sensibilización parenteral y refuerzo de la mucosa, sensibilización de la mucosa y refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos con 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, las dosis múltiples se pueden administrar aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas tras el nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, tal como se usa frecuentemente en el Programa Expandido de Inmunización ("EPI") de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente 7, 8, o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo al cabo de 6 meses a 1 año tras la segunda dosis primaria, por ejemplo, al cabo de 6, 8, 10 o 12 meses tras la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente 7, 8, o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo al cabo de 6 meses a 1 año tras la tercera dosis primaria, por ejemplo, al cabo de 6, 8, 10 o 12 meses tras la tercera dosis primaria.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar tanto niños como adultos. Así, un paciente humano puede tener menos de 1 año de edad, menos de 5 años de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 15 años de edad, de 15 a 55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Pacientes preferentes para recibir las vacunas son personas mayores (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y, preferentemente, ≥ 65 años de edad), jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, personal militar y del servicio armado, mujeres embarazadas, los pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos, no obstante, y se pueden usar de modo más general en una población.

General

El término "que comprende(n)" engloba "que incluye(n)" al igual que "que consiste(n)", por ejemplo una composición "que comprende" puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que "no tiene sustancialmente" Y puede carecer por completo de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" se puede omitir de la definición de la invención.

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

A menos que se indique lo contrario, un procedimiento que comprende una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Así, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, se pueden combinar entonces dos componentes entre sí, y después la combinación se puede combinar con un tercer componente, etc.

Cuando se usan materiales de animales (y particularmente de bovino) en los cultivos de las células, se deben obtener de fuentes que no tienen encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) y, en particular, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En conjunto, es preferente cultivar las células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, este compuesto entonces puede ser sustituido de modo alternativo por un profármaco adecuado.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el % de recuperación del agonista compuesto "A" en las emulsiones ANE12 a ANE18, ambas antes (sombreado) y después (blanco) de la centrifugación.

La Figura 2 muestra imágenes microscópicas de las emulsiones (A) ANE05 (B) ANE31 (C) ANE32 y (D) MF59.

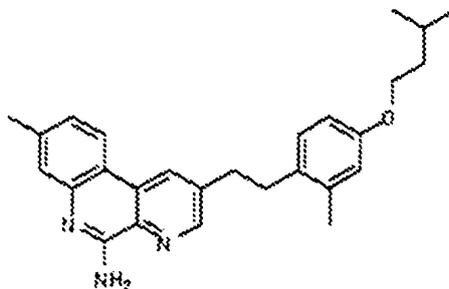
La Figura 3 muestra los niveles de compuesto "A" en (A) hígado, (B) músculo y (C) suero. Los valores son en μM .

La figura 4 muestra los niveles de citocina a lo largo de 24 horas para animales que recibieron diferentes formulaciones del compuesto "A". Las citocinas son (A) IFN, (B) IL10 y (C) TNF.

La Figura 5 muestra la recuperación determinada por HPLC del compuesto "A" a partir de (A) ANE03, (B) ANE31 y (C) ANE32. Para cada par de barras la izquierda es la recuperación a tiempo cero y la derecha tras 7 días a temperatura ambiente.

Modos para llevar a cabo la invención

La referencia 3 desvela una serie de nafiridinas agonistas de TLR7, que incluyen el compuesto "A" (ejemplo 161 de la página 269):



5 Aunque estos compuestos son altamente lipófilos (por ejemplo, log P del compuesto "A" es 7,5) no son solubles en aceite a concentraciones que serían deseables para un uso *in vivo*. Por ejemplo, para administrar una dosis de 25 µg en una emulsión normal de aceite en agua sería necesario que el agonista tuviera una solubilidad en escualeno de 10 mg/ml, que es aproximadamente 2,5 veces mayor que la que se puede conseguir.

10 Se añadieron lípidos a la emulsión MF59 en un intento de aumentar su capacidad para solubilizar los agonistas. Se ensayaron una variedad de longitudes de cadena de fosfolípido diferentes (POPC, DLPC, DMPC, DSPC; emulsiones "ANE06" a "ANE10") a una dosis de 25 µg de agonista, y también colesterol. Estas emulsiones eran visualmente estables y proporcionaron una alta carga (esencialmente el 100 %) aunque tras el almacenamiento a temperatura ambiente se observó que crecía el tamaño de partícula. Investigaciones adicionales revelaron que el agonista estaba cristalizando en la emulsión. Las emulsiones ANE12 a ANE18 se ensayaron para determinar el contenido de agonista por HPLC antes y después de la centrifugación para separar las gotitas grandes de las pequeñas. Un valor más bajo tras la centrifugación indica que el agonista se disolvió en gotitas más grandes inestables. Tal como se muestra en la Figura 1, si bien la adición de lípidos aumentó la carga en comparación con la ANE12, la recuperación disminuyó para todas las emulsiones, lo que indicaba que el agonista extra estaba cristalizando y causando la inestabilidad de la emulsión.

20 Puesto que la emulsión era inestable, se hicieron varios intentos para prevenir la cristalización del agonista en la fase oleosa. Se añadió PVP como inhibidor de la cristalización, a diversas cantidades desde 2,5 mg/ml hasta 10 mg/ml (ANE 19 a ANE25). La carga era elevada (≥ 80 %) y el contenido de agonista era sustancialmente el mismo antes y después de la centrifugación, es decir, el PVP prevenía la cristalización del agonista.

25 Las emulsiones ANE05 y ANE19 a ANE24 se almacenaron a temperatura ambiente durante una semana para acelerar cualquier cristalización que pudiera producirse. El contenido de compuesto "A" disminuyó en aproximadamente un 15 % en la emulsión de control ANE05, pero era estable en las otras emulsiones, demostrando que el PVP previene la cristalización durante al menos una semana.

30 Las emulsiones ANE31 a ANE38 se usaron para estudiar el efecto de adición de fosfolípido (DSPC) o colesterol junto con PVP. La ANE32 (DSPC y PVP) tenía la mayor carga antes y después de 1 semana a temperatura ambiente. La PVP sola aumentaba la estabilidad pero no aumentaba la carga (ANE33).

La Figura 2 muestra las emulsiones ANE05, ANE31 y ANE32 tras 1 semana a temperatura ambiente, en comparación con MF59 (2D). La ANE31 está más dispersa que la ANE05, pero todavía hay presentes agregados. En contraste, la ANE32 con DSPC y PVP es visiblemente más estable.

35 La Figura 5 muestra la recuperación por HPLC del compuesto "A" a partir de ANE05, ANE31 y ANE32. La recuperación es mayor y más estable en la ANE32.

La tabla siguiente resume el efecto de los diversos componentes añadidos a la emulsión de partida:

| | Emulsión "blanco" | + lípido | + colesterol | + PVP | + lípido +PVP | + colesterol + PVP | + lípido + colesterol + PVP |
|----------------|-------------------|----------|--------------|--------|---------------|--------------------|-----------------------------|
| Carga | ~ 70 % | ~ 100 % | ~ 100 % | ~ 80 % | ~ 95 % | ~ 85 % | ~ 85 % |
| Estable | No | No | No | Sí | Sí | Sí | Sí |

Por tanto, la adición de fosfolípidos o colesterol (5 mg/ml) aumentaba la carga de las emulsiones pero no mejoraba la estabilidad (evaluada mediante el tamaño de gotita y mediante microscopía). La adición de PVP mejoraba la

estabilidad y proporcionaba un ligero aumento de la carga. La adición de colesterol y PVP aumentaba aún más la carga, y se observó una carga muy elevada con una combinación de fosfolípido y PVP.

Farmacocinética

5 Se evaluaron los niveles del compuesto "A" en hígado y músculo para cinco grupos de ratones: (a) monodispersión simple del compuesto "A"; (b) monodispersión y emulsión administrada por separado; (c) ANE05; (d) ANE31; y (e) ANE32. Tal como se muestra en la Figura 3A, los niveles en hígado son los mayores del grupo (a), y después se reducen en los grupos (b) a (e), si bien son muy bajos en todos los grupos. Los niveles en músculo (Figura 3B) son mayores en los grupos (a) y (b) que en los grupos (c) a (e). La incorporación del compuesto "A" en la fase oleosa de la emulsión parece eliminar, por tanto, el fármaco del músculo.

10 Los niveles en suero se controlaron también (Figura 3C). Al cabo de 24 horas los niveles para los grupos (a) y (b) eran mayores que para los grupos (c) a (e), si bien eran nuevamente muy bajos.

15 Los perfiles de citocinas se estudiaron también. Los animales recibieron 25 µg del compuesto "A" en forma de (a) una monodispersión, (c), en forma de una monodispersión con MF59, (c) en forma de ANE05 o (d) en forma de ANE32. El perfil para ANE32 fue notablemente diferente para IFN γ , IL10, IL12p40, IL1b, IL5, IL6, MCP y TNF, si bien los niveles para todos los grupos eran bajos y por ello las comparaciones eran difíciles. La Figura 4 muestra tres perfiles ejemplo.

Estudios de inmunogenicidad

20 La vacuna frente a meningococo serogrupo B de la referencia 9 se ensayó con la emulsión ANE32 como adyuvante en ratones CD1. A efectos comparativos, se ensayaron también los mismos antígenos con MF59, con una monodispersión del compuesto "A" combinado con MF59 o ANE38. La ANE32 proporcionó el mayor título de anticuerpos el día 28 (2432), si bien no era significativamente mayor que el grupo "A" + MF59 (2284). Ambos eran mayores que el de la monodispersión con ANE38 (1509) o para la MF59 sola (873). Si bien el título de la ANE32 no era mejor que el del grupo "A" + MF59, la emulsión era más estable para un periodo de tiempo extendido y, por tanto, es ventajosa, por ejemplo se puede esterilizar mediante filtración, simplificando la fabricación.

25 **Detalles y caracterización de la emulsión**

Las emulsiones específicas que se ensayaron son las siguientes, con un volumen de 20 ml:

| | |
|--------|---|
| ANE05 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A" |
| ANE06 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col |
| ANE07 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg POPC |
| ANE08 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DLPC |
| ANE09 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DMPC |
| ANE10 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DSPC |
| ANE11 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 4 mg "A" |
| ANE12 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A" |
| ANE13 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg DLPC |
| ANE14 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DLPC |
| ANE15 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg DMPC |
| ANE16 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DMPC |
| ANE 17 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg DSPC |
| ANE18 | 2,15 % esc, 0,25 % S85, 0,25 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DSPC |
| ANE19 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DLPC, 50 mg PVP |
| ANE20 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DLPC, 50 mg PVP |
| ANE21 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DLPC, 100 mg PVP |
| ANE22 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DLPC, 100 mg PVP |
| ANE23 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DLPC, 200 mg PVP |
| ANE24 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg col, 100 mg DLPC, 200 mg PVP |

(continuación)

| | |
|-------------------|--|
| ANE31 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DSPC |
| ANE32 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DSPC, 50 mg PVP |
| ANE33 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 50 mg PVP |
| ANE34 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 100 mg DSPC, 50 mg PVP, 100 mg col |
| ANE35 | 4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg "A", 50 mg PVP, 100 mg col |
| T80 = Tween 80; | |
| S85 = Span 85; | |
| col = colesterol; | |
| esc = escualeno | |

- 5 Estas emulsiones se prepararon en general tal como sigue. Los componentes lipófilos (escualeno, Span 85, fosfolípidos, compuesto "A") se combinaron en un vaso de precipitados. Los componentes lipídicos se disolvieron en cloroformo, tetrahidrofurano o diclorometano. La fase oleosa se combinó con la fase acuosa y se homogeneizó inmediatamente durante 2 minutos usando un homogeneizador IKA T25 a 24 000 r.p.m. para proporcionar una materia prima homogénea. Las emulsiones se emulsionaron inmediatamente y después se dejaron reposar a temperatura ambiente en una placa de agitación durante 2-3 horas tras la homogeneización primaria en una campana extractora.
- 10 Las emulsiones primarias se pasaron de tres a cinco veces a través de un homogeneizador Microfluidizer M110S con un serpentín refrigerante en un baño de hielo a una presión de homogeneización de aproximadamente 103,4-137,0 MPa (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras del lote de 20 ml se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 °C, y alícuotas de 5 ml se almacenaron a temperatura ambiente para evaluar su estabilidad.
- 15 Se midió el tamaño de partícula de las emulsiones usando un dispositivo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) y un analizador de la distribución del tamaño de partícula LA-930 (Horiba), de acuerdo con las directrices del fabricante. Las partículas se diluyeron en agua desionizada. El instrumento de Horiba proporciona valores de d10, d50 y d90, es decir, los diámetros que dividen las gotitas de la muestra en un 10 %, un 50 % y un 90 % (respectivamente) en masa. Los resultados fueron los siguientes:

| | ZETASIZER | | HORIBA | | | | |
|-------|--------------------------|-----------------|----------|----------|----------|--------------|------------|
| | Tamaño de partícula (nm) | Polidispersidad | d10 (µm) | d50 (µm) | d90 (µm) | Mediana (µm) | Media (µm) |
| ANE05 | 123,4 | 0,1 | 0,105 | 0,14 | 0,21 | 0,14 | 0,21 |
| ANE06 | 123,5 | 0,1 | 0,109 | 0,16 | 0,31 | 0,16 | 0,59 |
| ANE07 | 111,3 | 0,1 | 0,102 | 0,14 | 0,21 | 0,14 | 0,47 |
| ANE08 | 109,1 | 0,1 | 0,104 | 0,14 | 0,20 | 0,14 | 0,15 |
| ANE09 | 125,0 | 0,2 | 0,198 | 0,37 | 33,42 | 0,37 | 8,39 |
| ANE10 | 117,4 | 0,1 | 0,106 | 0,15 | 0,20 | 0,15 | 0,15 |
| ANE12 | 118,9 | 0,084 | 0,23 | 0,43 | 2,46 | 0,43 | 0,97 |
| ANE13 | - | - | 0,24 | 0,47 | 5,99 | 0,47 | 2,02 |
| ANE14 | - | - | 0,21 | 0,39 | 41,50 | 0,39 | 8,23 |
| ANE15 | - | - | 0,22 | 8,15 | 33,81 | 8,15 | 12,72 |
| ANE16 | 121 | 0,139 | 0,12 | 0,17 | 0,29 | 0,17 | 0,23 |
| ANE17 | 127,1 | 0,169 | 0,23 | 6,48 | 16,18 | 6,49 | 7,08 |
| ANE18 | 115,8 | 0,131 | 0,20 | 0,32 | 3,55 | 0,32 | 1,01 |
| ANE19 | 107,9 | 0,081 | 0,10 | 0,13 | 0,18 | 0,13 | 0,14 |

(continuación)

| | ZETASIZER | | HORIBA | | | | |
|--------------|--------------------------|-----------------|----------|----------|----------|--------------|------------|
| | Tamaño de partícula (nm) | Polidispersidad | d10 (µm) | d50 (µm) | d90 (µm) | Mediana (µm) | Media (µm) |
| ANE20 | 109,3 | 0,115 | 0,11 | 0,14 | 0,20 | 0,14 | 0,15 |
| ANE21 | 102,5 | 0,07 | - 0,12 | 0,19 | 48,09 | 0,19 | 18,26 |
| ANE22 | 103,8 | 0,091 | 0,10 | 0,13 | 0,20 | 0,13 | 1,24 |
| ANE23 | 106 | 0,121 | - | - | - | - | - |
| ANE24 | 105 | 0,07 | - | - | - | - | - |
| ANE31 | 106 | 0,10 | 0,12 | 0,17 | 0,24 | 0,17 | 0,18 |
| ANE32 | 123 | 0,30 | 0,12 | 0,16 | 0,23 | 0,16 | 0,17 |
| ANE33 | 116 | 0,12 | 0,28 | 1,65 | 2,98 | 1,65 | 1,63 |
| ANE34 | 97 | 0,06 | 0,10 | 0,14 | 0,21 | 0,14 | 0,67 |
| ANE35 | 115 | 0,05 | 0,08 | 0,11 | 0,16 | 0,11 | 0,12 |

Se entenderá que la invención se ha descrito por medio de ejemplos solamente y que se pueden efectuar modificaciones manteniéndose dentro del alcance y el espíritu de la invención.

5

TABLA 1: Fosfolípidos útiles

| | |
|-------------|---|
| DDPC | 1,2-Didecanoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DEPA-NA | 1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal Sódica) |
| DEPC | 1,2-Erucoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DEPE | 1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DEPG-NA | 1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DLOPC | 1,2-Linoleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DLPA-NA | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfato (Sal Sódica) |
| DLPC | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DLPE | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DLPG-NA | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (Sal Sódica) |
| DLPG-NH4 | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)] |
| DLPS-NA | 1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina (Sal Sódica) |
| DMPA-NA | 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal Sódica) |
| DMPC | 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DMPE | 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DMPG-NA | 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DMPG-NH4 | 1,2-Miristoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DMPG-NH4/NA | 1,2-Miristoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DMPs-NA | 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina (Sal Sódica) |
| DOPA-NA | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfato (Sal Sódica) |

ES 2 612 511 T3

(continuación)

| | |
|---------------------------------|---|
| DOPC | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DOPE | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DOPG-NA | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DOPS-NA | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina (Sal Sódica) |
| DPPA-NA | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfato (Sal Sódica) |
| DPPC | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DPPE | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DPPG-NA | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DPPG-NH4 | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DPPS-NA | 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina (Sal Sódica) |
| DPyPE | 1,2-Difitanoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina |
| DSPA-NA | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfato (Sal Sódica) |
| DSPC | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| DSPE | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| DSPG-NA | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DSPG-NH4 | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] |
| DSPS-NA | 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina (Sal Sódica) |
| EPC | PC de huevo |
| HEPC | PC de huevo hidrogenada |
| HSPC | PC de soja hidrogenada de alta pureza |
| HSPC | PC de soja hidrogenada |
| LYSOPC MYRISTIC | 1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| LYSOPC PALMITIC | 1-Palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| LYSOPC STEARIC | 1-Estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| MPPC de esfingomielina de leche | 1-Miristoil-2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| MSPC | 1-Miristoil-2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| PMPC | 1-Palmitoil-2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| POPC | 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| POPE | 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina |
| POPG-NA | 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)...] (Sal Sódica) |
| PSPC | 1-Palmitoil-2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| SMPC | 1-Estearoil-2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| SOPC | 1-Estearoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |
| SPPC | 1-Estearoil-2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina |

REFERENCIAS

- [1] Bodmeier & Chen (1990) *J Controlled Release* 12:223-33.
 [2] Tabata & Ikada (1980) *Pharm Res* 6:296-301.
 [3] WO2009/111337.
- 5 [4] Yoshioka y col. (1995) *J Pharm Sci* 84:983-6.
 [5] Ma y col. (1996) *Int J Pharmaceutics* 142:115-9.
 [6] Jain y col. (2010) *Int J Pharmaceutics* 394:68-74.
 [7] US-2007/0014805.
 [8] WO2007/080308.
- 10 [9] Giuliani y col. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.
 [10] WO02/34771.
 [11] WO2005/032582.
 [12] WO02/34771.
 [13] WO2005/002619.
- 15 [14] WO2006/138004.
 [15] WO2009/109860.
 [16] WO02/02606.
 [17] WO03/018054.
 [18] WO2006/091517.
- 20 [19] WO2008/020330.
 [20] WO2006/089264.
 [21] WO2009/104092.
 [22] WO2009/031043.
 [23] WO2007/049155.
- 25 [24] *Research Disclosure*, 453077 (Enero 2002).
 [25] EP-A-0372501.
 [26] EP-A-0378881.
 [27] EP-A-0427347.
 [28] WO93/17712.
- 30 [29] WO94/03208.
 [30] WO98/58668.
 [31] EP-A-0471177.
 [32] WO91/01146.
- 35 [33] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [34] Baraldo y col. (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
 [35] EP-A-0594610.
 [36] Ruan y col. (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
 [37] WO00/56360.
 [38] WO01/72337.
- 40 [39] WO00/61761.
 [40] WO00/33882
 [41] Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 [42] Michon y col. (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.
 [43] WO02/091998.
- 45 [44] *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 2000; 20ª Ed., ISBN: 0683306472)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa, un tensioactivo, un inmunopotenciador de molécula pequeña (SMIP) y un inhibidor de la cristalización, en el que el tamaño de gotita promedio en la emulsión es inferior a 250 nm, y en la que el SMIP es un agonista de TLR con un peso molecular inferior a 5000 Da.
2. La emulsión de la reivindicación 1, siendo la emulsión de aceite en agua una emulsión adyuvante.
3. La emulsión de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que el SMIP es una naftiridina agonista de TLR7.
4. La emulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que > 80 % del SMIP está presente en las gotitas de aceite de la emulsión.
- 10 5. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que el inhibidor de la cristalización es una polivinilpirrolidona.
6. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que la fase oleosa comprende escualeno.
7. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que la fase acuosa comprende un tampón.
8. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que el tensioactivo comprende polisorbato 80.
- 15 9. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, que comprende un 2 %-20 % (en volumen) de aceite y un 0,001 %-8 % (en peso) de tensioactivo.
10. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que la relación en peso entre el aceite y el tensioactivo es de entre 4:1 y 5:1.
- 20 11. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, que comprende escualeno, polisorbato 80 y una polivinilpirrolidona, en la que el diámetro promedio de las gotitas de la emulsión es de entre 80 nm y 180 nm.
12. La emulsión de cualquier reivindicación anterior, en la que la emulsión comprende un fosfolípido.
13. Una composición inmunogénica que comprende (a) la emulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y (b) un inmunógeno.
- 25 14. La composición de la reivindicación 13, en la que el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria *in vivo* frente a una bacteria o un virus.
15. La composición de la reivindicación 14, en la que la bacteria es *Neisseria meningitidis*.
16. La composición de la reivindicación 14, en la que el virus es un virus de la gripe.
17. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezcla de un inmunógeno con la emulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 30 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar dicha composición al mamífero.
19. La emulsión de las reivindicaciones 1-12, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 13-16, para su uso en provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero.
- 35 20. Un procedimiento de preparación de la emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende una etapa de homogeneización de una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en el que el inhibidor de la cristalización se añade a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización.
- 40 21. Un procedimiento de preparación de la emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende una etapa de homogeneización de una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en el que el inhibidor de la cristalización se añade a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización, y en el que el SMIP se añade (i) a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización, o (ii) a la emulsión antes o después de la adición del inhibidor de la cristalización.

FIGURA 1

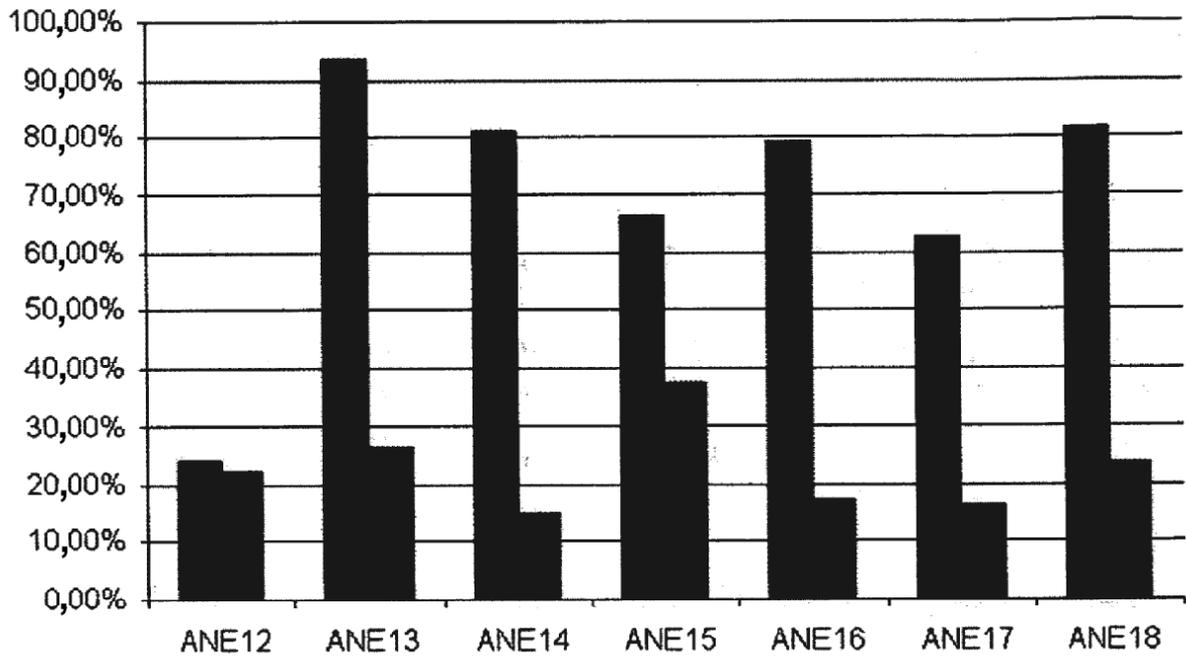


FIGURA 2

FIGURA 2A

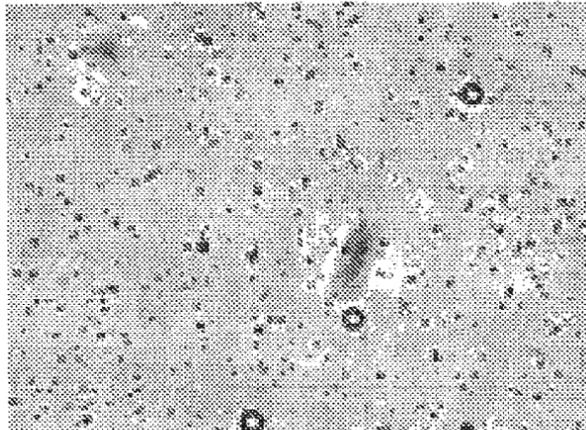


FIGURA 2B

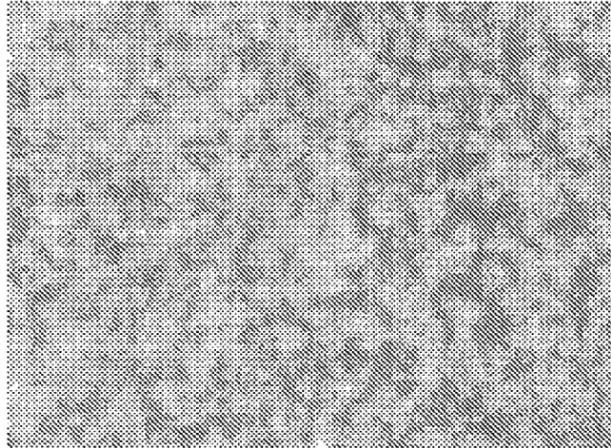


FIGURA 2C

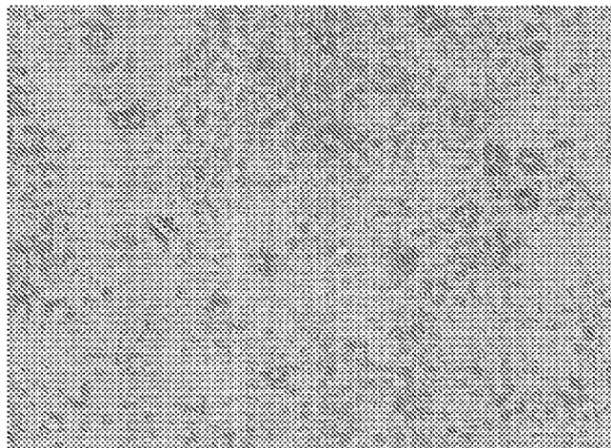


FIGURA 2D

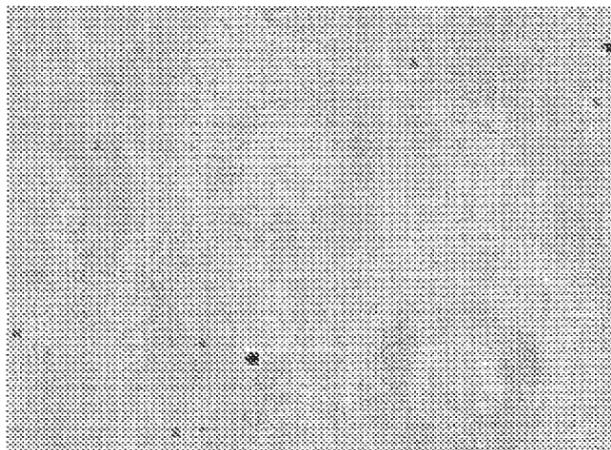


FIGURA 3

FIGURA 3A

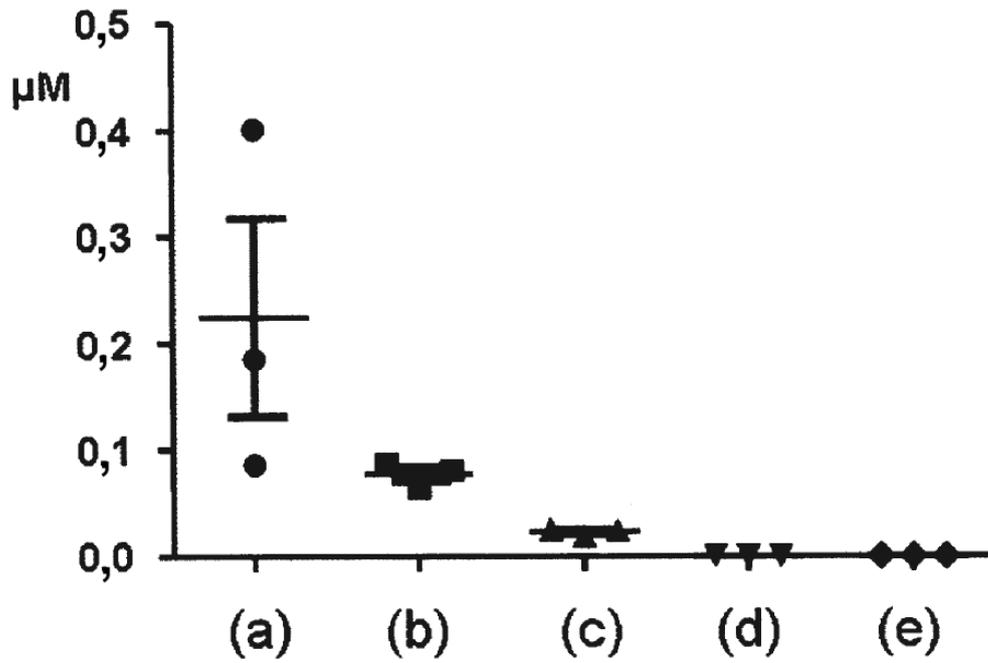


FIGURA 3B

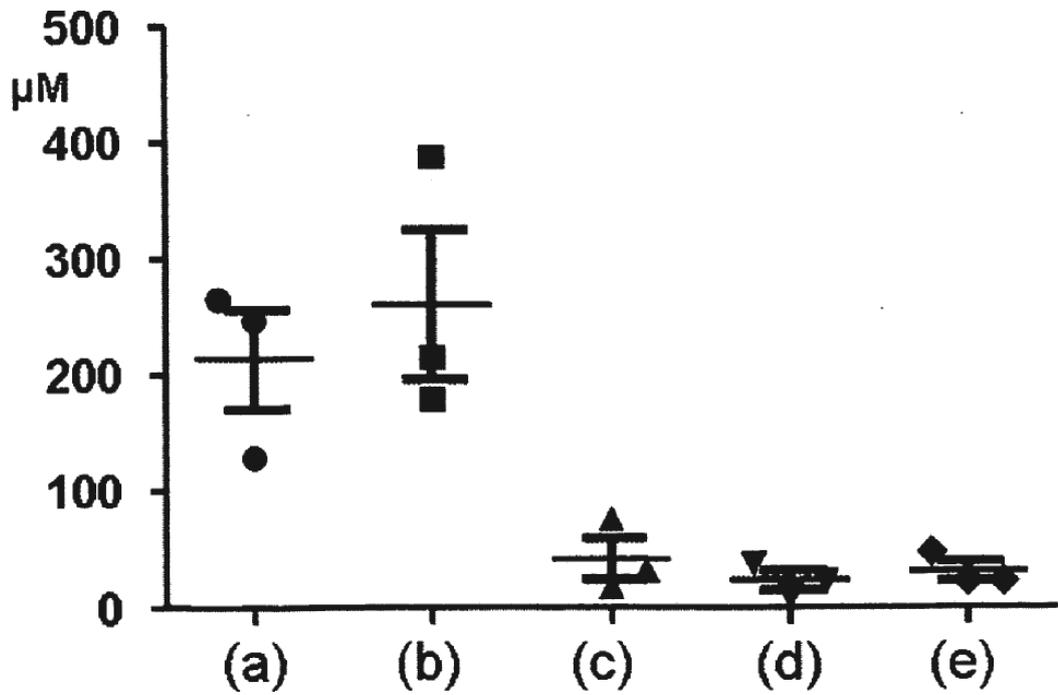


FIGURA 3C

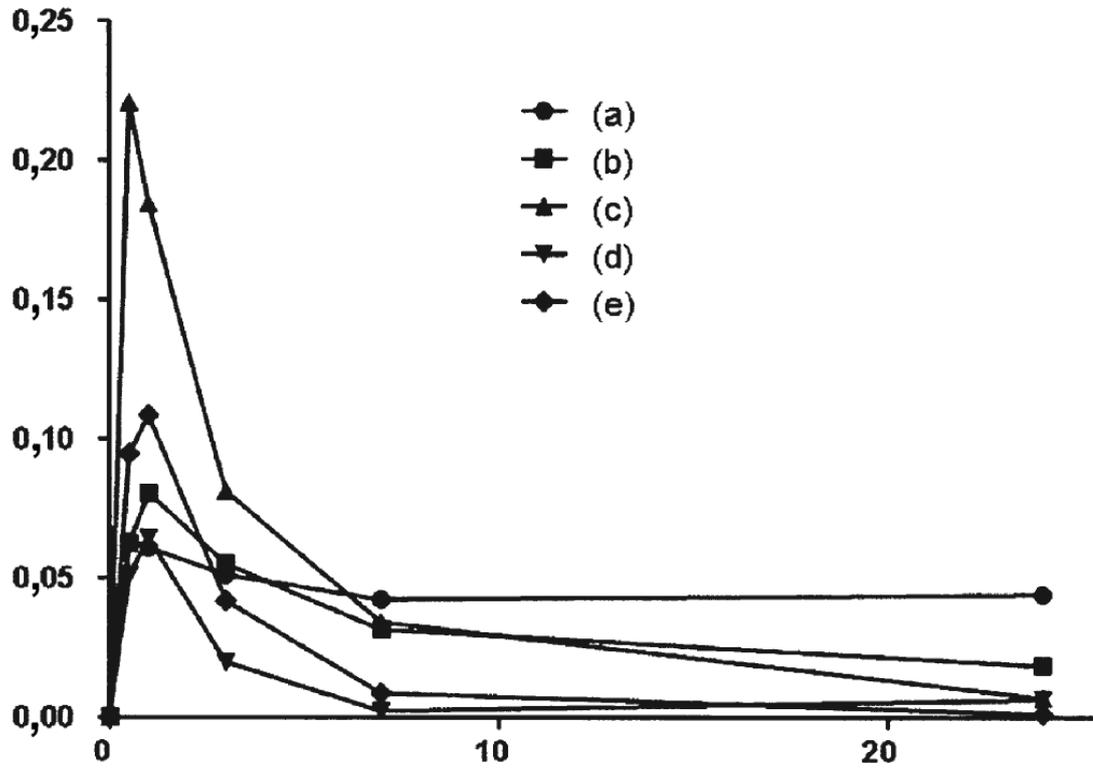


FIGURA 5

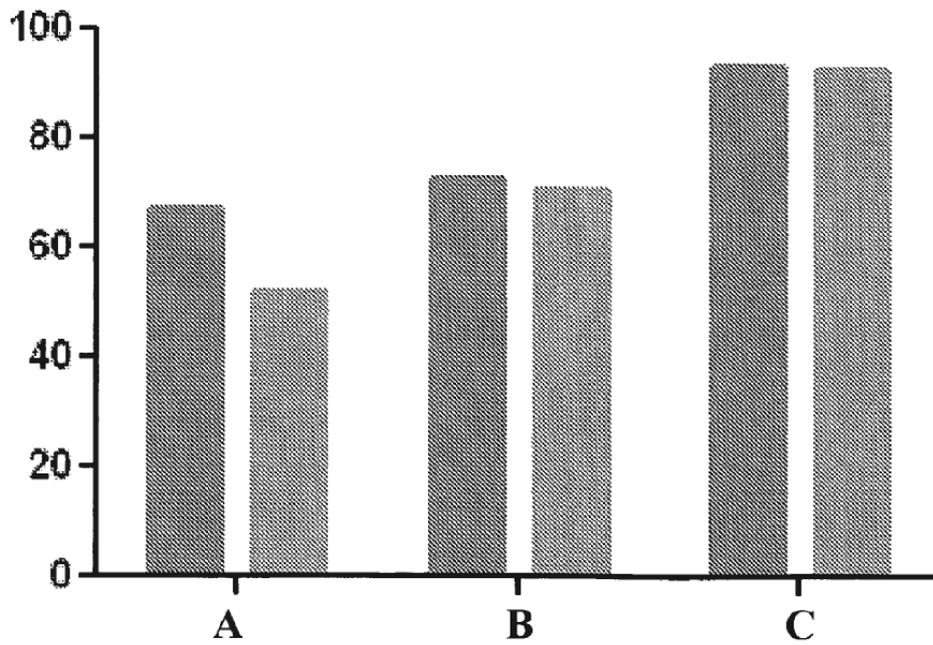


FIGURA 4

FIGURA 4A

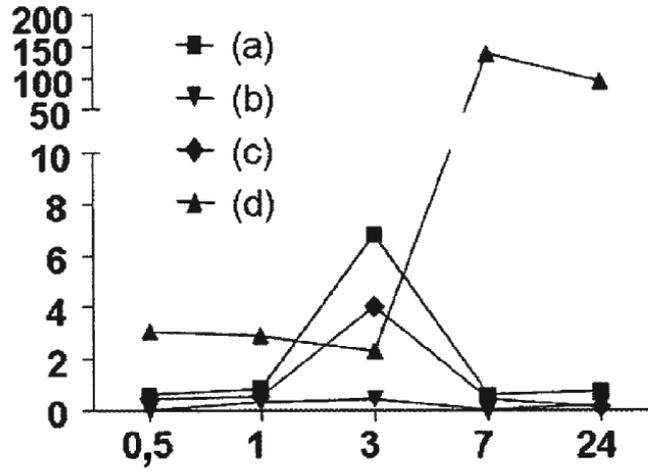


FIGURA 4B

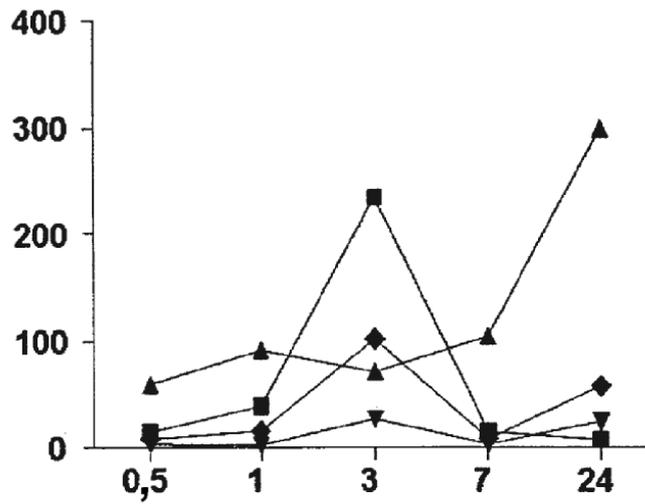


FIGURA 4C

