

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 306**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2015 PCT/EP2015/078270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2015 E 15805141 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3226904**

54 Título: **Fabricación de composiciones que contienen tensioactivo**

30 Prioridad:

02.12.2014 EP 14195981

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

30.07.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

KRAUS, GOTTFRIED

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 721 306 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

Fabricación de composiciones que contienen tensioactivo

5 Campo de la invención

La presente invención se encuentra en el campo de la fabricación de composiciones que incluyen un tensioactivo, tal como composiciones farmacéuticas, y, en particular, de la consecución de la reducción de impurezas en tales composiciones.

10

Antecedentes

Se sabe que ciertos componentes de las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas sufren degradación no deseada y/o alteraciones químicas, que afectan a la calidad o a la vida útil de dichos productos. Por ejemplo, los tensioactivos pueden degradarse para generar componentes no deseados, por ejemplo, los polisorbatos pueden producir productos de degradación de carbonilo no deseados.

15

Los tensioactivos se utilizan en emulsiones. El adyuvante de la vacuna conocido como "MF59" [Referencias 1-3] es una emulsión submicrométrica de aceite en agua de escualeno, polisorbato 80 (también conocido como Tween® 80) y trioleato de sorbitán (también conocido como Span® 85). También puede incluir iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato sódico 10 mM. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,5 % de Span® 85. El adyuvante y su producción se describen con más detalle en el capítulo 10 de la Referencia 4, el capítulo 12 de la Referencia 5 y el capítulo 19 de la Referencia 6. El polisorbato 80 y el escualeno también están presentes en el adyuvante de emulsión conocido como "AS03" [Referencia 16]. La referencia 11 describe un método para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que implica la circulación de componentes de emulsión entre un primer recipiente y un segundo recipiente a través de un dispositivo homogeneizador y/o microfluidizador.

20

25

Los polisorbatos pueden sufrir autooxidación, generando peróxidos, aldehídos, cetonas y ácidos. Otros componentes de una composición, como las proteínas, pueden verse afectados por algunos de estos productos de degradación. Por ejemplo, la conformación de las proteínas puede cambiar, lo que puede afectar a su eficacia [Referencias 7, 8].

30

Además, se ha demostrado que el escualeno sufre una degradación oxidativa que da como resultado la generación de subproductos carbonilo. Se ha demostrado que la escisión foto-oxidativa del escualeno produce formaldehído, malonaldehído, acetaldehído y acetona [Referencias 9], aunque la degradación puede reducirse mediante el almacenamiento en un recipiente hermético, el almacenamiento bajo nitrógeno, la protección contra la luz, etc.

35

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para mejorar la calidad y/o la vida útil de las composiciones que contienen al menos un agente tensioactivo, tal como un agente tensioactivo no iónico. La invención abarca el reconocimiento de que cierto preprocesamiento de polisorbato 80 según la reivindicación 1 para la fabricación de un producto en el que se incorpora el tensioactivo puede mejorar significativamente la calidad del producto resultante. Se ha descubierto que dicho preprocesamiento puede, en algunos casos, mejorar la estabilidad del producto, prolongar su vida útil y/o mantener su calidad general. Dichos efectos se pueden lograr, por ejemplo, prefiltrando el componente tensioactivo (por ejemplo, tensioactivos líquidos, soluciones que contienen un tensioactivo, etc.) antes de formular un producto. La invención ofrece así una solución novedosa para mejorar el proceso de fabricación y/o la calidad de los productos que contienen tensioactivo controlando la calidad de un ingrediente (por ejemplo, material de partida y/o intermedio) que comprende un tensioactivo.

40

45

50

Una serie de productos, en particular, formulaciones farmacéuticas (véase más adelante), formulaciones alimenticias y nutracéuticas (suplementos dietéticos, ingredientes alimentarios, etc.), así como formulaciones cosméticas (por ejemplo, lociones, cremas, geles, espumas, etc.), están formulados con al menos un tensioactivo. La presente invención, por lo tanto, puede ser útil para mejorar tales productos.

55

El preprocesamiento (como la prefiltración) de un componente tensioactivo tiene como objetivo mejorar la calidad o aumentar la pureza del componente utilizado como material de partida o un ingrediente intermedio, eliminando las impurezas y/o agregados que puedan estar presentes en el crudo o tensioactivo sin procesar. Además, la eliminación de cualquier agregado también es beneficiosa si el tensioactivo se usará más adelante en un aparato que puede obstruirse, como en una cámara de microfluidización.

60

Breve descripción de los dibujos.

La figura 1 representa el contenido de acetaldehído medido en ppm en varios lotes de una composición de ejemplo que contiene tensioactivo. Los puntos de datos en la sección central del diagrama corresponden a los lotes que

65

incluían un tensioactivo que había sido prefiltrado, mientras que los puntos de datos en las secciones flanqueantes corresponden a los lotes que incluían un tensioactivo que no había sido prefiltrado. Todos los demás parámetros de producción se mantuvieron sin cambios.

5 Descripción detallada de ciertas realizaciones

La presente invención proporciona métodos para mejorar el proceso de fabricación y/o la calidad de una composición que contiene tensioactivo. La invención descrita en el presente documento es, por lo tanto, adecuada para cualquier producto que comprenda al menos un tensioactivo, incluyendo, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas y composiciones cosméticas. La presente invención ofrece una solución novedosa para mejorar el proceso de fabricación y/o la calidad de dichas composiciones al mejorar la calidad de un componente tensioactivo en sí mismo mediante el tratamiento previo del tensioactivo como se describe en el presente documento. Los métodos mejorados son particularmente adecuados cuando la estabilidad mejorada del producto es deseable.

Por lo tanto, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para la fabricación de productos a base de emulsión. Los tensioactivos son ampliamente utilizados como emulsionantes para fines científicos y comerciales. Se puede agregar un emulsionante para facilitar la formación y estabilidad de una emulsión, como emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite. Los productos a base de emulsión pueden ser propensos a la desestabilización debido a que tienen dos o más componentes líquidos que están dispersos naturalmente inmiscibles en ellos, lo que puede ser desfavorable desde el punto de vista termodinámico. Para ciertos productos a base de emulsión que requieren un alto grado de uniformidad, pureza y/o estabilidad, es especialmente beneficioso asegurar que el producto no sufra una degradación o alteración no deseadas de las composiciones químicas con el tiempo. Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención se basan en métodos mejorados para la producción de emulsiones de aceite en agua, en particular métodos que conducen a una reducción de impurezas de carbonilo indeseables en las emulsiones finales.

Sorprendentemente, el inventor ha descubierto que los niveles de impurezas carbonílicas en emulsiones de aceite en agua pueden reducirse por filtración por tamaño de un tensioactivo (polisorbato 80), y luego usar este material filtrado para preparar la emulsión. Sin querer limitarse a ninguna teoría, el inventor cree que los productos de degradación de carbonilo en un material tensioactivo residen preferentemente dentro de grandes agregados, y que la filtración elimina dichos agregados. La filtración se puede lograr con un filtro que tiene un tamaño de poro mayor que el utilizado en la esterilización por filtración, y se realiza ventajosamente con un agente tensioactivo no acuoso (como el polisorbato 80 no acuoso) antes de disolverse en agua, aunque también es posible llevar a cabo la prefiltración de un material intermedio que comprende el tensioactivo y al menos parte de un componente acuoso. La reducción de los niveles de impurezas de carbonilo es particularmente importante en emulsiones que contienen otros componentes que también pueden proporcionar productos de degradación de carbonilo, por ejemplo, escualeno. Por lo tanto, la invención es particularmente útil para fabricar adyuvantes de vacunas en emulsión tales como "MF59" o "AS03".

Por lo tanto, la invención proporciona preparaciones a granel de un tensioactivo preprocesado que contiene (i) un nivel de carbonilo que es más bajo que el del tensioactivo no sometido a prefiltración; y/o (ii) menos agregados que el tensioactivo no sometido a prefiltración. La frase "preparación en masa" se refiere a una preparación a escala comercial de dichos tensioactivos. Típicamente, tal preparación tiene un volumen de al menos 50 litros, por ejemplo, al menos 75 litros, al menos 100 litros, al menos 125 litros, al menos 150 litros, al menos 175 litros, al menos 200 litros, al menos 250 litros, o al menos 300 litros. Dichos tensioactivos preprocesados se pueden usar en la fabricación de cualquier producto adecuado.

La invención también proporciona un proceso para preparar un agente tensioactivo que comprende una etapa de filtrar un agente tensioactivo no acuoso a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm . El tensioactivo filtrado se puede usar para fines posteriores, como los que se describen en el presente documento. El proceso es particularmente útil para preparar preparaciones a granel de tensioactivo. El proceso es particularmente adecuado para filtrar polisorbato no acuoso 80,

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para preparar una formulación que contiene tensioactivo usando un tensioactivo preprocesado (por ejemplo, tensioactivo prefiltrado). Los tensioactivos "preprocesados" pueden proporcionarse mediante una etapa de prefiltración como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la prefiltración de un tensioactivo de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo con el uso de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm . El tensioactivo prefiltrado puede contener un nivel de carbonilo que es más bajo que el del tensioactivo no sometido a prefiltración. El tensioactivo prefiltrado también puede contener menos agregados que el tensioactivo no sometido a prefiltración.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un proceso para preparar una emulsión (una emulsión de aceite en agua) usando un tensioactivo que ha sido preprocesado como se describe en el presente documento, por ejemplo, para lograr niveles reducidos de impurezas de carbonilo y/o menos agregados.

En realizaciones de ejemplo, tal proceso puede implicar las siguientes etapas: (a) proporcionar un tensioactivo, polisorbato 80, que se ha filtrado previamente a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm , para proporcionar tensioactivo purificado (prefiltrado) (polisorbato 80) ; y (b) combinar el tensioactivo purificado (polisorbato 80) con un componente de aceite para proporcionar una emulsión. Además del tensioactivo purificado y el componente de aceite, la emulsión incluirá un componente acuoso (y, como se describe con más detalle a continuación, posiblemente otros componentes también). El material acuoso se puede agregar como un tercer componente en la etapa (b), o se puede combinar con el tensioactivo y/o el aceite antes de la etapa (b), o incluso puede estar presente en el tensioactivo filtrado en la etapa (a). Por lo tanto, el tensioactivo (polisorbato 80) que se obtiene en la etapa (a) puede ser una solución acuosa del tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), pero también puede ser un tensioactivo no acuoso, es decir, un tensioactivo que no se ha diluido con agua (o cualquier otro material acuoso) antes de ser filtrado. Por lo tanto, el agente tensioactivo (polisorbato 80) puede filtrarse en las condiciones "en bruto" o "en masa" en las que llega de un fabricante. Normalmente, la etapa (a) del proceso comprende una etapa de filtrado del agente tensioactivo.

De manera similar, la invención incluye un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende una etapa de combinar un polisorbato 80 con un componente de aceite, en donde el polisorbato 80 se ha filtrado previamente a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm . El polisorbato 80 se puede haber tratado entre filtrarse y combinarse con el componente de aceite, por ejemplo, se puede haber diluido para proporcionar un tensioactivo acuoso. Se entiende que la etapa de prefiltración y la etapa o etapas de formulación siguientes pueden llevarse a cabo en el mismo sitio o en sitios separados, y por la misma persona o por diferentes personas.

La invención también proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende las etapas de: (a) filtrar el polisorbato no acuoso 80, para proporcionar el polisorbato 80 purificado; y (b) combinar el polisorbato 80 purificado con un componente de aceite para proporcionar la emulsión de aceite en agua. El filtro utilizado en el paso (a) puede tener un tamaño de poro entre 5-50 μm , que es mucho más grande que el utilizado para la esterilización por filtro (por ejemplo, 0,22 μm). Entre las etapas (a) y (b), el polisorbato 80 purificado se puede combinar con material acuoso (por ejemplo, agua o tampón) para obtener un polisorbato 80 purificado acuoso que luego se combina con un componente de aceite en la etapa (b).

De manera similar, la invención proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende una etapa de combinar un polisorbato 80 con un componente de aceite, en donde el polisorbato 80 se ha filtrado previamente en forma no acuosa.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende las etapas de: (a) filtrar el polisorbato no acuoso 80 a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm , para proporcionar el polisorbato 80 purificado; y (b) combinar el polisorbato 80 purificado con un componente de aceite para proporcionar la emulsión de aceite en agua.

De manera similar, la invención proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende una etapa de combinar un polisorbato 80 con un componente de aceite, en donde el polisorbato 80 se ha filtrado previamente en forma no acuosa con un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm .

La invención también proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende las etapas de: (a) filtrar el polisorbato no acuoso 80 a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm , para proporcionar el polisorbato no acuoso purificado 80; (b) combinar el polisorbato 80 no acuoso purificado con un material acuoso, para proporcionar un componente acuoso; y (c) combinar el componente acuoso con un componente de aceite para proporcionar la emulsión de aceite en agua.

De manera similar, la invención proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende una etapa de combinar una solución acuosa de polisorbato 80 con un componente de aceite, en el que la solución se formó mezclando un vehículo acuoso con polisorbato 80 que se había filtrado previamente en forma no acuosa con un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm .

La invención también proporciona un proceso para preparar una vacuna, que comprende una etapa de combinar una emulsión de la invención con un antígeno. De manera similar, la invención proporciona un proceso para preparar una vacuna, que comprende las etapas de: (i) preparar una emulsión como se describe en el presente documento; y (ii) combinar esta emulsión con un antígeno. En general, sin embargo, la invención tiene una aplicabilidad más amplia que solo vacunas.

La invención también proporciona un proceso para preparar una vacuna, que comprende las etapas de: (i) preparar una emulsión como se describe anteriormente; y (ii) empaquetar la emulsión en un kit como un componente del kit junto con un componente de antígeno. Los componentes del kit de antígeno y emulsión se pueden combinar posteriormente en un momento posterior (por ejemplo, en el punto de uso) para su administración a un paciente.

Componentes carbonilo

Los componentes carbonílicos (por ejemplo, formaldehído, acetaldehído y acetona) pueden surgir como productos de degradación o impurezas residuales en diversos materiales, como polisorbato 80 y/o escualeno. Su evitación puede ser particularmente importante en productos farmacéuticos, tales como en emulsiones donde están presentes polisorbato 80 y/o escualeno. Estos componentes carbonílicos pueden reaccionar con otros componentes en una composición (como una proteína) y, por lo tanto, su presencia es indeseable. El acetaldehído es motivo de particular preocupación porque, más que el formaldehído y la acetona, se ha observado que sus niveles aumentan durante el almacenamiento de emulsiones de aceite en agua que contienen polisorbato 80 y escualeno, debido a la degradación de estos dos compuestos. Si los niveles de acetaldehído ya son altos en los materiales de partida, esta degradación puede significar que los niveles finales en el momento de uso pueden ser indeseablemente altos.

El filtrado del polisorbato 80 antes de formar la emulsión de aceite en agua tiene un efecto beneficioso. Así, los procesos de la invención facilitan la producción de emulsiones de aceite en agua que comprenden menos de 0,85 ppm de acetaldehído, por ejemplo, menos de 0,80 ppm, menos de 0,75 ppm, menos de 0,70 ppm, menos de 0,65 ppm, menos de 0,60 ppm, menos de 0,55 ppm, menos de 0,50 ppm, menos de 0,45 ppm, menos de 0,40 ppm, o incluso menos. El nivel en ppm se basa en el peso, de modo que 0,85 ppm significa 0,85 µg de acetaldehído por gramo de emulsión. Al alcanzar este bajo nivel de acetaldehído cuando la emulsión se forma por primera vez, su vida útil puede aumentar de aproximadamente 3 años a aproximadamente 5 años, en condiciones de almacenamiento idénticas.

La invención proporciona así una emulsión de aceite en agua que comprende polisorbato 80, en la que la emulsión contiene menos de 0,85 ppm de acetaldehído, como se discutió anteriormente. Los métodos para proporcionar emulsiones que tienen niveles tan bajos de acetaldehído no se han descrito previamente. La emulsión comprende idealmente escualeno, y se describen en el presente documento detalles adicionales sobre la emulsión.

Cuando se almacenan, los niveles de acetaldehído en esta emulsión pueden aumentar con el tiempo, pero el bajo nivel de inicio y la filtración del polisorbato 80 pueden garantizar una vida útil prolongada con no más de 2.6 ppm de acetaldehído después de 3 años de almacenamiento a 4 °C (y, ventajosamente, incluso después de 5 años). Por lo tanto, en un sexto aspecto, la invención proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende polisorbato 80, en donde la emulsión contiene menos de 2.6 ppm de acetaldehído después del almacenamiento a 4 °C durante al menos 3 años, por ejemplo, durante 5 años.

Tensioactivos

Los procesos de la invención utilizan al menos un tensioactivo, es decir, uno o más tensioactivos. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos no iónicos. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un tensioactivo polimérico (es decir, incluye un grupo polimérico tal como un polioxietileno o polioxipropileno). En algunas realizaciones, los tensioactivos son tensioactivos poliméricos no iónicos. En algunas realizaciones, los tensioactivos son tensioactivos de éter poliméricos no iónicos. El tensioactivo para uso con la invención incluye al menos un grupo polioxietileno, y es polisorbato 80 (conocido comúnmente con el nombre comercial Tween™ 80).

Ejemplos no limitantes de tensioactivos incluyen Tween®20 (polisorbato 20), Tween®40 (polisorbato 40), Tween®60 (polisorbato 60), Tween®80 (polisorbato 80), Triton™ X-100, IGEPAL CA-630, Nonidet P-40, Pluronic® F-68, Pluronic® F-88 y Pluronic® F-127 (poloxámeros), y Brij 35 (polioxietilnalquiléter). El tensioactivo para uso con la invención es polisorbato 80, que es un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán también conocido como monooleato de polioxietileno (20) sorbitán. Está disponible en una amplia gama de fabricantes comerciales, incluso de grado farmacéutico (por ejemplo, el producto "Polisorbato (HX2)" ultra puro de NOF Corporation), y está presente en los inventarios de aceite "MF59" y "AS03". Adyuvantes de vacunas en emulsión de agua. Generalmente se suministra como un líquido amarillo/marrón claro puro.

El polisorbato 80 contiene enlaces éter y cadenas de alquilo insaturadas que se ha demostrado que se autooxidan en solución acuosa, lo que lleva a aldehídos reactivos que incluyen acetaldehído que pueden causar reacciones secundarias indeseables (por ejemplo, al reaccionar con grupos amino primarios en proteínas).

Por lo tanto, la invención pretende reducir los niveles de acetaldehído en polisorbato 80 y en emulsiones que contienen polisorbato 80, utilizando la etapa de filtración descrita en el presente documento. El material filtrado se utiliza luego para preparar la emulsión de aceite en agua, proporcionando así emulsiones finales que tienen niveles reducidos de impurezas de acetaldehído.

Durante la fabricación de emulsiones de aceite en agua con polisorbato 80, es habitual dispersarlo en un vehículo acuoso y luego usar este material acuoso para formar la emulsión. Aunque la etapa de filtración de la invención se puede realizar después de que el polisorbato 80 se haya mezclado (diluido) con un vehículo acuoso (por ejemplo, agua para inyectables o tampón), que se puede usar para reducir la viscosidad, se prefiere filtrar el polisorbato 80 antes de dicha mezcla. ocurre (es decir, se realiza en polisorbato no acuoso 80); incluso se puede realizar en material anhidro (es decir, sin un contenido sustancial de agua), aunque la especificación del producto para el polisorbato 80 a menudo permite hasta un 3 % en peso de agua (material que no es acuoso, ya que no tiene agua

añadida, pero no es anhidro). El material no acuoso filtrado puede diluirse luego con un vehículo acuoso y usarse de la manera ya conocida en la técnica (véase más adelante). También es posible mezclar polisorbato 80 no acuoso con un vehículo acuoso, luego filtrarlo y luego agregar un vehículo acuoso adicional para proporcionar un material acuoso final listo para la emulsión. Normalmente, el material a filtrar está sustancialmente exento de cualquier componente distinto del polisorbato 80 y cualquier vehículo acuoso opcional, en cuyo caso el polisorbato 80 no se mezcla con ningún componente (excepto, opcionalmente, el vehículo acuoso) antes de filtrarlo.

Filtración por tamaño de tensioactivos.

La invención utiliza una etapa de prefiltración para un tensioactivo. En algunas realizaciones, dicho tensioactivo es un componente de un producto a formular. Como se ha tratado anteriormente, se ha descubierto que esta etapa de prefiltración tiene un efecto beneficioso. Al tener una concentración inicial reducida de acetaldehído, se mejora la vida útil del adyuvante. Por lo tanto, la filtración de un tensioactivo de acuerdo con la invención proporciona un tensioactivo purificado.

Por lo tanto, la invención incluye una etapa de prefiltración para tensioactivos no iónicos, que de acuerdo con las reivindicaciones es polisorbato 80,

La filtración del polisorbato 80 proporciona polisorbato 80 purificado para uso con la invención. Los tensioactivos no iónicos purificados, polisorbato 80 purificado, contienen menos de 0,85 ppm de acetaldehído. En algunas realizaciones, un tensioactivo no iónico prefiltrado de acuerdo con la presente invención contiene no más de 0,85 ppm de acetaldehído, no más de 0,80 ppm de acetaldehído, no más de 0,75 ppm de acetaldehído, no más de 0,70 ppm de acetaldehído, no más de 0,65 ppm de acetaldehído, no más de 0,60 ppm de acetaldehído, no más de 0,55 ppm de acetaldehído, no más de 0,50 ppm de acetaldehído, no más de 0,45 ppm de acetaldehído, no más de 0,40 ppm de acetaldehído, no más de 0,35 ppm de acetaldehído, no más de 0,30 ppm de acetaldehído, no más de 0,25 ppm de acetaldehído, no más de 0,20 ppm de acetaldehído, o menos.

Como se ha mencionado anteriormente, un tensioactivo a filtrar, polisorbato 80, se puede mezclar con agua, para dar un tensioactivo acuoso, por ejemplo, polisorbato acuoso 80, antes de la filtración, pero en algunas realizaciones se prefiere filtrar el tensioactivo no acuoso, por ejemplo, polisorbato no acuoso 80,

La filtración de tensioactivos no iónicos, como el polisorbato 80, utiliza un filtro que tiene un tamaño de poro que está entre 5 μm y 50 μm , por ejemplo, entre 10-40 μm , entre 10-30 μm , entre 15-25 μm , entre 18 y 25 μm , 22 μm , o alrededor de 20 μm . El tamaño de los poros de un filtro se evalúa como el diámetro de la partícula de vidrio más grande que pasará a través del filtro en condiciones normales de operación.

En algunas realizaciones, los filtros de cápsula son útiles. Las cápsulas incluyen membranas internas de filtración que proporcionan una gran área de superficie dentro de un pequeño volumen para permitir un alto rendimiento y tasas de flujo.

Los filtros adecuados incluyen los formados a partir de vellón de polipropileno, vellón de polietersulfona, acetato de celulosa o fibra de vidrio. Los filtros particularmente útiles incluyen filtros de polipropileno, por ejemplo, un filtro Sartopure™ PP 2 MidiCap™ (que está disponible con un tamaño de poro de 5 μm , 8 μm , 20 μm y 50 μm). Un filtro de vellón de polipropileno de 20 μm puede ser particularmente útil, como el filtro apropiado Sartopure™ PP 2 MidiCap™. Este filtro utiliza un material de vellón de filtro de polipropileno plisado de 20 μm . El fabricante hace referencia a su tamaño de poro de 20 μm como su "tasa de retención", y los parámetros operativos de este filtro permiten una presión diferencial máxima permitida de 5 bar a 20 °C, con una contrapresión máxima permitida de 2 bar.

Se sabe que los filtros a menudo no funcionan de manera eficiente hasta que se ha procesado una cierta cantidad de muestra. La supervisión del filtrado se puede utilizar para determinar cuándo el filtro se ha asentado y está funcionando según lo deseado. Un filtro Sartopure™ PP 2 MidiCap™ de 20 μm generalmente necesita un flujo de aproximadamente 200 ml de polisorbato 80 antes de que funcione bien, por lo que los primeros 200 ml de filtrado generalmente se descartan.

Típicamente, la prefiltración de tensioactivo (s) de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, condición ambiental), lo cual se encuentra en el contexto de la invención definido como entre aproximadamente 14-25 °C, más típicamente entre aproximadamente 18 -22 °C. En algunas realizaciones, dicha prefiltración se puede llevar a cabo a una temperatura elevada, tal como entre aproximadamente 26-45 °C. Se puede utilizar una bomba peristáltica.

El polisorbato 80 filtrado (purificado) se puede combinar con un vehículo acuoso para formar un componente acuoso que luego se puede usar para la (s) etapa (s) posterior (es) de fabricación o formulación. Por ejemplo, en casos de producción de emulsión, el polisorbato 80 tensioactivo filtrado (purificado) se puede usar para la emulsificación de un componente de aceite y un componente acuoso, para formar una emulsión, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua y agua. Emulsiones de aceite. Los vehículos acuosos adecuados pueden ser agua simple (por ejemplo, agua

para inyectables) o pueden incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-50 mM, pero el experto en la técnica puede optar por utilizar cualquier resistencia adecuada de los tampones.

Cuando la invención incluye una etapa de mezcla previa a la emulsión posterior a la filtración con un vehículo acuoso, esta mezcla utiliza idealmente un exceso de volumen del vehículo acuoso, por ejemplo, en una relación de volumen entre 1:40 y 2:5 (por ejemplo, de 1:20 a 1:5, 1:15 a 1:7, o de aproximadamente 1:10).

Un tensioactivo generalmente se usará en un plazo de 2 años desde que se ha filtrado (es decir, prefiltrado). Por lo tanto, por ejemplo, si el tensioactivo se usa para preparar una emulsión (como se describe en el presente documento), se puede producir en un plazo de 2 años desde la filtración. En algunas realizaciones, se puede usar después de duraciones más cortas, por ejemplo, en un plazo de 18 meses, en un plazo de 12 meses, en un plazo de 9 meses, en un plazo de 6 meses, en un plazo de 3 meses, en un plazo de 1 mes, en un plazo de 2 semanas, en un plazo de 10 días, en un plazo de 1 semana, en un plazo de 6 días, en un plazo de 5 días, en un plazo de 4 días, en un plazo de 72 horas, en un plazo de 60 horas, en un plazo de 48 horas, en un plazo de 24 horas o menos. En algunas realizaciones, un tensioactivo prefiltrado que se almacenó durante más tiempo que una cierta duración puede volver a filtrarse (es decir, prefiltración repetida) antes de formularse en productos de interés. Por ejemplo, un tensioactivo prefiltrado que ha sido almacenado durante más de 2 años, 18 meses, 12 meses, 6 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mes, 3 semanas, 2 semanas, 10 días, 1 semana, 6 días, 5 días 4 días, 72 horas, 60 horas, 48 horas o 24 horas, pueden filtrarse nuevamente antes de formularse en una composición, como emulsiones.

De acuerdo con la invención, las composiciones formuladas con un agente tensioactivo procesado como se describe en el presente documento muestran una estabilidad mejorada. En algunas realizaciones, la vida útil de tales composiciones se puede aumentar en al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 % o más, en comparación con el control negativo (es decir, equivalente que contiene los mismos componentes pero en el que al menos un tensioactivo no se trata previamente de acuerdo con el presente invención y se almacena en las mismas condiciones).

Emulsiones

Los procesos de la invención también son útiles para la fabricación de emulsiones, tales como emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite o emulsiones de agua en aceite en agua. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para preparar una emulsión que comprende al menos un tensioactivo filtrado (purificado) (es decir, prefiltrado antes de formular una emulsión). Estas emulsiones, o productos formulados con ellas, son particularmente adecuados para la administración parenteral con fines farmacéuticos, por ejemplo. Adyuvantes de vacunas. Estas emulsiones incluyen al menos tres ingredientes básicos: un componente de aceite; un componente acuoso; y un componente tensioactivo.

En general, las emulsiones de aceite en agua de la invención se forman combinando al menos un aceite (es decir, un componente de aceite), un componente acuoso tal como agua, y al menos un agente tensioactivo que se ha sometido a los métodos descritos en el presente documento. Aunque la emulsificación espontánea es posible, la mezcla normalmente involucrarán ayuda mecánica, como el uso de un homogeneizador y/o un microfluidizador. Un proceso de emulsificación útil mezcla componentes primero utilizando un homogeneizador y luego utilizando un microfluidizador. Cuando un componente incluye más de un compuesto (por ejemplo, dos aceites diferentes en el componente de aceite, dos tensioactivos diferentes en el componente de tensioactivo, etc.), estos pueden combinarse en varios órdenes antes de la emulsificación, por ejemplo, un primer tensioactivo y un aceite puede ser premezclado, para combinarse con una mezcla de un segundo tensioactivo y un componente acuoso.

Los detalles del componente de aceite adecuado se discuten más adelante.

En algunas realizaciones, las emulsiones de la invención comprenden un tensioactivo no iónico. En algunas realizaciones, las emulsiones de la invención son emulsiones de aceite en agua que comprenden un tensioactivo no iónico. El término "no iónico" se usa indistintamente en el presente documento. En algunas realizaciones, tales emulsiones de aceite en agua comprenden más de un tensioactivo, al menos uno de los cuales es opcionalmente un tensioactivo no iónico que se ha procesado de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el componente tensioactivo de una emulsión comprende un polisorbato que se ha procesado de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el componente tensioactivo de una emulsión comprende polisorbato 80 que se ha procesado como se describe en el presente documento. El polisorbato 80 puede ser el único tensioactivo en una emulsión de la invención, o es posible usar múltiples tensioactivos, es decir, que comprende polisorbato 80 filtrado y al menos un tensioactivo adicional. Por ejemplo, "AS03" tiene polisorbato 80 como su único componente tensioactivo, mientras que "MF59" usa una mezcla de polisorbato 80 y trioleato de sorbitán ("Span® 85").

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (balance hidrófilo/lipófilo), donde un HLB en el intervalo 1-10

generalmente significa que el tensioactivo es más soluble en aceite que en agua, y un HLB en el intervalo 10-20 es más soluble en agua que en aceite. El polisorbato 80 tiene un HLB de 15.0. Si se usan múltiples tensioactivos, entonces será usual incluir un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, Span® 85, con un HLB de 1.8). Los tensioactivos que se pueden usar además del polisorbato 80 incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de los ésteres de polioxietileno sorbitán (comúnmente denominados Tweens), como el polisorbato 20; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos con el nombre comercial DOWFAX™, como los copolímeros de bloques lineales EO/PO; los octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiolo) repetitivos, con octoxinol-9 (Triton™ X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) son de particular interés; (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes lauril, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauriléter (Brij 30); polioxietileno-9-lauril éter; y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), como el trioleato de sorbitán (Span® 85) y el monolaurato de sorbitán. Una mezcla de polisorbato 80 y trioleato de sorbitán es particularmente útil con la invención, por ejemplo, a una relación en volumen de 1:1.

El polisorbato 80 es biodegradable (metabolizable) y biocompatible; Si se incluyen otros tensioactivos, este/estos también pueden ser biodegradables y biocompatibles.

El componente acuoso comprende una solución acuosa que puede ser agua simple (por ejemplo, agua para inyectables) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, soluto (s). Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón adecuado, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen, pero no se limitan a: un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón de histidina y un tampón citrato. Los tampones normalmente se incluirán en el intervalo de 5-50 mM, dependiendo del búfer en particular que se esté utilizando.

En algunas realizaciones, la cantidad total de aceite (s) (% en volumen) en la emulsión final está entre aproximadamente 1-25 %, por ejemplo, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, la cantidad total de aceite (s) (% en volumen) en la emulsión final está entre aproximadamente 2-20 %, entre aproximadamente 4-15 %, entre aproximadamente 8-12 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %. Cuando una emulsión comprende escualeno como un componente de aceite, un contenido de escualeno (% en volumen) de entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 % es particularmente útil, por ejemplo, aproximadamente el 5 %. En algunas realizaciones, una emulsión comprende un contenido de escualeno (p/v) de entre aproximadamente 30-50 mg/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 35-45 mg/ml, aproximadamente 36-43 mg/ml, aproximadamente 38-40 mg/ml, etc.

En algunas realizaciones, las cantidades de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final son: ésteres de polioxietileno sorbitán (como Tween® 80) de 0,02 a 2 %, en particular aproximadamente 0,5 % o aproximadamente 1 % o aproximadamente 2 %; ésteres de sorbitán (tales como Span® 85) 0,02 a 2 %, en particular aproximadamente 0,5 % o aproximadamente 1 %; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (como Triton™ X-100) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20 %, preferentemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %. Un contenido de polisorbato 80 (p/v) de entre 4-6 mg/ml es útil, por ejemplo, entre 4.1-5.3 mg/ml, pero también son útiles niveles más altos, por ejemplo, de 19-20 mg/ml. Un contenido de trioleato de sorbitán (p/v) de entre 4-6 mg/ml es útil, por ejemplo, entre 4,1-5,3 mg/ml.

La emulsión comprende polisorbato 80 y escualeno y contiene menos de 0,85 ppm de acetaldehído.

Las emulsiones de la invención se pueden preparar de acuerdo con las técnicas descritas de manera diversa en las Referencias 10, 11 y 12 (el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia). De este modo, la emulsificación puede implicar la formación de una primera emulsión por homogeneización, seguida de una microfluidización para proporcionar una segunda emulsión. Los componentes pueden recircularse a través del homogenizador y/o el microfluidizador utilizando la circulación "tipo II" [Referencia 11], o una combinación de circulación "tipo I" y "tipo II". Se puede utilizar una atmósfera inerte durante la mezcla. La temperatura se puede controlar a alrededor de 40 °C, por ejemplo, entre alrededor de 35 °C y 45 °C, por ejemplo, alrededor de 35 °C, alrededor de 36 °C, alrededor de 37 °C, alrededor de 38 °C, alrededor de 38 °C, alrededor de 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C y aproximadamente 45 °C. Las emulsiones se pueden filtrar utilizando una membrana de PES hidrófila asimétrica estéril. En algunas realizaciones, las emulsiones pueden filtrarse utilizando un filtro de membrana de PES hidrófilo asimétrico de doble capa (doble capa) estéril (doble capa) de 0,45 µm/0,22 µm.

Las emulsiones de la invención tienen idealmente un diámetro medio de gota de aceite por debajo de 200 nm. En algunas realizaciones, una gota de aceite promedio de dichas emulsiones tiene un diámetro de entre

aproximadamente 50 nm y 200 nm, por ejemplo, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, aproximadamente 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm y aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, un diámetro de gotitas de aceite que es de 155 ± 20 nm es típico, y generalmente no será inferior a 50 nm. El diámetro promedio (es decir, el diámetro promedio en número de las gotitas de aceite de la emulsión) se puede medir utilizando una técnica de dispersión dinámica de la luz, como se describe en la referencia 13, por ejemplo. Un ejemplo de una máquina de medición de dispersión de luz dinámica es el analizador Nicomp 380 Submicron particle Size Analyzer (de sistemas de dimensionamiento de partículas).

En algunas realizaciones, los tensioactivos procesados por los métodos de la presente invención son útiles para producir emulsiones uniformes, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua uniformes y emulsiones de agua en aceite uniformes. La uniformidad de una emulsión se refiere a tener menos gotas de aceite que caen fuera de un intervalo de tamaño preferido dentro de una población de gotas de aceite. En algunas realizaciones, una emulsión uniforme de aceite en agua que incorpora al menos un tensioactivo procesado por los métodos de la invención contiene $\leq 5\%$ (por ejemplo, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$ y $\leq 1\%$) del número de gotas de aceite que caen fuera de un intervalo preferido de diámetros. En algunas realizaciones, una emulsión uniforme de aceite en agua que incorpora al menos un tensioactivo procesado por los métodos de la invención se caracteriza porque el número de gotitas de aceite en una población (por ejemplo, preparación) que tiene un diámetro de $> 1.2 \mu\text{m}$ es $5 \times 10^8/\text{ml}$ o menos, por ejemplo, $5 \times 10^8/\text{ml}$ o menos, $5 \times 10^7/\text{ml}$ o menos, $5 \times 10^6/\text{ml}$ o menos, y $5 \times 10^5/\text{ml}$ o menos.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse a gran escala, adecuados para la producción a escala comercial de una composición que comprende un tensioactivo que se ha filtrado previamente de acuerdo con los métodos abarcados en la presente solicitud. Por lo tanto, un método puede implicar la preparación de una emulsión final con un volumen superior a 1 litro, por ejemplo, > 5 litros, > 10 litros, > 20 litros, > 50 litros, > 100 litros, > 250 litros, etc.

El proceso es particularmente útil para preparar cualquiera de los siguientes ejemplos de emulsiones de aceite en agua:

Una emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80 (Tween® 80), y trioleato de sorbitán (Span® 85):

La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5 % de trioleato de sorbitán. En términos de peso, estas cantidades se convierten en 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de trioleato de sorbitán. Este adyuvante se conoce como "MF59". La emulsión MF59 puede incluir ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato sódico 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración final de cada uno de dichos componentes presentes en un producto puede reducirse a la mitad, por ejemplo, aproximadamente 2,5 % de escualeno, aproximadamente 0,25 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,25 % de trioleato de sorbitán en volumen (aproximadamente 2,15 % de escualeno, 0,25 % de polisorbato 80 y 0,24 % de trioleato de sorbitán en términos de peso). En algunas realizaciones, la concentración final de cada uno de dichos componentes presentes en un producto puede dividirse en un cuarto, por ejemplo, aproximadamente 1,25 % de escualeno, aproximadamente 0,125 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,125 % de trioleato de sorbitán por volumen (aproximadamente 1.075 % de escualeno, 0,125 % de polisorbato 80 y 0,12 % de trioleato de sorbitán en términos de peso).

Como se describe en la Referencia 14, MF59 se fabrica a escala comercial mediante la dispersión de Span® 85 en la fase de escualeno (el componente de aceite) y Tween® 80 en el componente acuoso, seguido de una mezcla de alta velocidad para formar una emulsión gruesa (es decir, primera emulsión). Esta emulsión gruesa se pasa luego a través de un microfluidizador para producir una emulsión que tiene un tamaño de gotita de aceite uniforme (es decir, una segunda emulsión). Como se describe en la Referencia 6, la emulsión microfluidizada se filtra luego a través de un filtro de membrana adecuado para eliminar las gotas de aceite de gran tamaño, y el tamaño de gota promedio de la emulsión uniforme resultante permanece sin cambios durante al menos 3 años a 4 °C. El contenido de escualeno de la emulsión final se puede medir como se describe en la Referencia 15.

Una emulsión que contiene escualeno, un α tocoferol (idealmente DL α tocoferol) y polisorbato 80:

La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. Estas emulsiones pueden tener en volumen de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0,3 a 3 % de polisorbato 80, por ejemplo, 4,3 % de escualeno, 4,7 % de tocoferol, 1,9 % de polisorbato 80. La proporción en peso de escualeno: el tocoferol es preferentemente < 1 (por ejemplo, 0,90) ya que esto puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5: 2 o en una relación en peso de aproximadamente 11: 5. Por lo tanto, los tres componentes (escualeno, tocoferol, polisorbato 80) pueden estar presentes en una proporción en peso de 1068: 1186: 485 o alrededor de 55:61:25. Una de estas emulsiones ("AS03" [Referencia 16]) tiene 4,86 mg de polisorbato 80, 10,69 mg de escualeno y 11,86 mg de tocoferol α por dosis (o una fracción del mismo, pero manteniendo las relaciones de masa), por ejemplo, en un volumen de 0,5 ml. AS03 se

puede hacer disolviendo Tween® 80 en PBS para obtener una solución al 2 %, luego mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, v.g. con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente alrededor de 180 nm. La emulsión también puede incluir un lípido A monofosforílico 3-de-O-acilado (3d MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [Referencia 17], por ejemplo, en las proporciones analizadas anteriormente.

Una emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80, un detergente Triton (por ejemplo, Triton X 100) y α -tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol):

La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de 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 deberían incluir cualquier aporte de estos componentes a partir de antígenos. La emulsión también puede incluir un 3d MPL. La emulsión también puede incluir una saponina, tal como QS21. El componente acuoso puede contener un tampón fosfato.

Las composiciones de estas emulsiones, expresadas anteriormente en términos porcentuales, pueden modificarse por dilución o concentración (por ejemplo, por un número entero, como 2 o 3 o por una fracción, como 2/3 o 3/4), en las que sus proporciones se mantienen igual. Por ejemplo, un MF59 concentrado 2 veces tendría aproximadamente 10 % de escualeno, aproximadamente 1 % de polisorbato 80 y aproximadamente 1 % de trioleato de sorbitán. Las formas concentradas se pueden diluir (por ejemplo, con una solución de antígeno) para dar una concentración final deseada de emulsión.

Las emulsiones de la invención se almacenan idealmente entre 2°C y 8°C. No deben ser congelados. Idealmente, deben mantenerse fuera de la luz directa. En particular, las composiciones que contienen escualeno, tales como emulsiones y vacunas de la invención, deben protegerse para evitar la descomposición fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones de la invención se almacenan, entonces esto es preferentemente en una atmósfera inerte, por ejemplo, N₂ o argón.

Componente de aceite

Debido a que las emulsiones que contienen al menos un tensioactivo procesado por los métodos de la invención pretenden incluir el uso farmacéutico, en tales realizaciones, el aceite o los aceites en el componente de aceite de la emulsión típicamente serán biodegradables (metabolizables) y biocompatibles.

Como se ha tratado anteriormente, la invención es particularmente adecuada para usar en la preparación de emulsiones que incluyen escualeno. El escualeno es un aceite natural (por ejemplo, en el hígado de tiburón) que es un terpenoide insaturado ramificado (C₃₀H₅₀; [(CH₃)₂C [= CHCH₂CH₂C (CH₃)₂= CHCH₂]₂; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS RN 7683-64-9). El escualeno se suele purificar de fuentes animales, como el tiburón, pero también es posible usar escualeno de fuentes no animales, por ejemplo, levaduras modificadas genéticamente [Referencia 18] y aceites vegetales como el aceite de oliva [Referencias 19, 20]. Otras fuentes posibles incluyen aceite de germen de trigo, aceite de palma, semilla de amaranto (por ejemplo, ver referencia 21) y aceite de salvado de arroz. Se puede purificar por destilación, por ejemplo, como se describe en la Referencia 22.

El componente de aceite en una emulsión de la invención puede incluir un solo aceite, o puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, que comprende escualeno y al menos un aceite adicional. Por ejemplo, "MF59" tiene escualeno como su único componente de aceite, mientras que "AS03" tiene escualeno y α -tocoferol.

En lugar de (o además de) usar escualeno, una emulsión puede comprender aceite (s), incluidos los de, por ejemplo, un animal (como el pescado) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la haba de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereales como el trigo, la avena, el centeno, el arroz, el teff, el triticale y similares. Los ésteres de glicerol y 1,2-propanodiol con ácido graso al carbono 6-10, aunque no se producen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y, por lo tanto, pueden utilizarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, como el espermacti,

ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Un número de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan terpenoides. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también se puede usar. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales o pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando el componente de aceite de una emulsión incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los tocoferoles α . D α tocoferol y DL α tocoferol pueden ser utilizados. Un α tocoferol preferido es DL α tocoferol. El tocoferol puede tomar varias formas, por ej. Diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, como succinato, acetato, nicotinato, etc. Si se va a usar una sal de este tocoferol, la sal preferida es el succinato. Una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL α -tocopherol) es particularmente útil con la invención.

Cuando la invención utiliza escualeno derivado de tiburón, se puede usar cualquier especie de tiburón adecuada, como el pez corral espinoso (*Squalus acanthias*). Otras especies adecuadas incluyen *Centrophorus atromarginatus*, *Cetorhinus maximus*, *Echinorhinus brucus*, *Scymnodon squamulosus*, *Centrophorus atromarginatus*, *Etmopterus frontimaculatus*, *Deania eglantina* y *Scymnodon foliaceus*.

Como se discutió en la Referencia 23, cuando se usa escualeno derivado de tiburón, se prefiere que los bifenilos policlorados (PCB) estén presentes a un nivel de menos de 661 pg de PCB por g de escualeno (TEQ). Este límite de 661 pg/g se puede aplicar al escualeno usado para hacer una emulsión, a la emulsión final ya una vacuna preparada usando la emulsión. Por lo general, se aplica al escualeno utilizado para hacer una emulsión. Los detalles completos de cómo alcanzar un nivel de PCB dentro de este umbral se encuentran en la Referencia 23. Se pueden alcanzar niveles mucho más bajos que 661 pg/g, incluso tan bajos como p2 pg/g.

Los PCB son una familia de compuestos químicos formados por la adición de cloro a las 10 posiciones disponibles para la sustitución de cloro en un anillo de bifenilo. Cualquier compuesto químico individual en la categoría de PCB se llama "congéneres". Los niveles de congéneres individuales se convierten en un equivalente tóxico (TEQ) que permite que la toxicidad de una mezcla de PCB se represente como un solo número. La toxicidad de cada PCB se expresa como una fracción (el factor de equivalencia tóxico, TEF) de la toxicidad de 2,3,7,8-TCDD dioxina (que tiene un valor de referencia de 1). Para calcular el TEQ total de una mezcla, la masa de cada PCB se multiplica por su TEF y luego el TEQ es la suma de estos valores.

En algunas realizaciones, el escualeno no tiene cantidades detectables de uno o más de: PCB # 126; PCB # 169; PCB # 77; PCB # 81; PCB # 123; PCB # 170; y/o PCB # 180, Estos PCB están definidos por la nomenclatura IUPAC, p. Ej. PCB # 126 es 3,3', 4,4', 5-pentaclorobifenilo.

Además de tener un bajo contenido de PCB, es útil para asegurar niveles bajos de dioxinas. Por lo tanto, cada uno de los siguientes puede tener un bajo contenido de dioxinas: escualeno utilizado para formar emulsiones; la emulsión farmacéutica final; y una vacuna elaborada utilizando la emulsión. Un bajo contenido de dioxinas es menor que 1 ng por gramo de escualeno, y preferentemente menor que 1 pg/g (TEQ).

Del mismo modo es útil para garantizar niveles bajos de furano. Por lo tanto, cada uno de los siguientes puede tener un bajo contenido de furano: escualeno utilizado para formar las emulsiones de la invención; la emulsión farmacéutica final; y una vacuna preparada utilizando la emulsión de la invención. Un bajo contenido de furano es menor que 1 ng por gramo de escualeno, y preferentemente <1 pg/g (TEQ).

Vacunas

Aunque es posible administrar adyuvantes de emulsión de aceite en agua por sí mismos a los pacientes (por ejemplo, para proporcionar un efecto adyuvante para un antígeno que se ha administrado por separado al paciente), es más habitual mezclar el adyuvante con un antígeno antes de administración, para formar una composición inmunogénica, por ejemplo, una vacuna. La mezcla de la emulsión y el antígeno puede tener lugar de forma extemporánea, en el momento de su uso, o puede tener lugar durante la fabricación de la vacuna, antes del llenado. Los métodos de la invención se pueden aplicar en ambas situaciones.

Por lo tanto, un proceso de la invención puede incluir una etapa adicional del proceso de mezclar la emulsión con un componente de antígeno. Como alternativa, puede incluir una etapa adicional de empaquetar el adyuvante en un kit como un componente del kit junto con un componente de antígeno.

En general, por lo tanto, la invención se puede usar cuando se preparan vacunas mixtas o cuando se preparan kits que incluyen antígeno y adyuvante listos para mezclar. Donde la mezcla tiene lugar durante la fabricación, entonces los volúmenes de antígeno a granel y emulsión que se mezclan serán típicamente mayores que 1 litro, por ejemplo, > 5 litros, > 10 litros, > 20 litros, > 50 litros, > 100 litros, > 250 litros, etc. Cuando la mezcla tiene lugar en el punto de uso, los volúmenes que se mezclan serán típicamente más pequeños que 1 mililitro, por ejemplo, <0,6ml, <0,5ml, <0,4ml,

<0,3ml, <0,2ml, etc. En ambos casos, es habitual que se mezclen volúmenes sustancialmente iguales de solución de emulsión y antígeno, es decir, sustancialmente 1:1 (por ejemplo, entre 1.1: 1 y 1: 1.1, preferentemente entre 1.05: 1 y 1:1,05, y más preferentemente entre 1.025):1 y 1:1,025). En algunas realizaciones, sin embargo, se puede usar un exceso de emulsión o un exceso de antígeno [Referencia 24]. Cuando se usa un exceso de volumen de un componente, el exceso generalmente será de al menos 1.5: 1, por ejemplo, > 2: 1, > 2.5: 1, > 3: 1, > 4: 1, > 5: 1, etc.

Cuando el antígeno y el adyuvante se presentan como componentes separados dentro de un kit, están físicamente separados entre sí dentro del kit, y esta separación se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, los componentes pueden estar en recipientes separados, como viales. El contenido de dos viales se puede mezclar cuando sea necesario, por ejemplo, eliminando el contenido de un vial y agregándolos al otro vial, o eliminando por separado el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.

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

En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero por separado en la misma jeringa, por ejemplo, una jeringa de doble cámara. Cuando se acciona la jeringa (por ejemplo, durante la administración a un paciente), se mezclan los contenidos de las dos cámaras. Esta disposición evita la necesidad de un paso de mezcla separado en el momento del uso.

El contenido de los diversos componentes del kit generalmente estará en forma líquida. En algunas disposiciones, un componente (típicamente el componente de antígeno en lugar del componente de emulsión) está en forma seca (por ejemplo, en forma liofilizada), con el otro componente en forma líquida. Los dos componentes pueden mezclarse para reactivar el componente seco y dar una composición líquida para su administración a un paciente. Normalmente, un componente liofilizado estará ubicado dentro de un vial en lugar de una jeringa. Los componentes secos pueden incluir estabilizadores como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Una posible disposición utiliza un componente de emulsión líquida en una jeringa precargada y un componente antigénico liofilizado en un vial.

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

Los recipientes adecuados para vacunas mixtas de la invención, o para componentes de kits individuales, incluyen viales y jeringas desechables. Estos recipientes deben ser estériles.

Cuando una composición/componente está ubicado en un vial, el vial está hecho preferentemente de un material de vidrio o plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de que se le añada la composición. Para evitar problemas con los pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferentemente con un tapón sin látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de embalaje. En una realización, un vial tiene un tapón de caucho butílico. El vial puede incluir una dosis única de vacuna/componente, o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo, 10 dosis. En una realización, un vial incluye 10 x 0,25 ml de dosis de emulsión. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un bloqueo Luer) adaptado de tal manera que se pueda insertar una jeringa precargada en la tapa, el contenido de la jeringa se pueda expulsar hacia el vial (por ejemplo, Para reconstituir material liofilizado en la misma), y el contenido del vial se puede retirar de nuevo en la jeringa. Después de retirar la jeringa del vial, se puede conectar una aguja y se puede administrar la composición a un paciente. La tapa se ubica preferentemente dentro de un sello o cubierta, de modo que la junta o cubierta debe retirarse antes de poder acceder a la tapa.

Cuando una composición/componente está empaquetado en una jeringa, normalmente la jeringa no tendrá una aguja unida, aunque se puede suministrar una jeringa por separado con la jeringa para su montaje y uso. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 1 pulgada, calibre 23, 1 pulgada, calibre 25 y 5/8 pulgada. Calibre 25. Para facilitar el mantenimiento de registros, se pueden proporcionar jeringas con etiquetas desprendibles en las que se pueden imprimir el número de lote, la temporada de influenza y la fecha de vencimiento de los contenidos. El émbolo en la jeringa tiene preferentemente un tapón para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener una tapa de goma de látex y/o émbolo. Las jeringas desechables contienen una sola dosis de vacuna. La jeringa generalmente tendrá una tapa de la punta para sellar la punta antes de la unión de una aguja, y la tapa de la punta está hecha de goma de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado, la aguja se equipará preferentemente con un protector de goma de butilo.

La emulsión se puede diluir con un tampón antes de envasarla en un vial o una jeringa. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina;

o un tampón de citrato. La dilución puede reducir la concentración de los componentes del adyuvante mientras retiene sus proporciones relativas, por ejemplo, para proporcionar un adyuvante de "media resistencia".

5 Los recipientes pueden marcarse para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar el suministro a los niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre un volumen de 0,25 ml.

10 Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

15 Se pueden usar varios antígenos con emulsiones de aceite en agua, que incluyen, entre otros: antígenos virales, como las proteínas de superficie viral; antígenos bacterianos, tales como antígenos de proteínas y/o sacáridos; antígenos fúngicos; antígenos parásitos; y antígenos tumorales. La invención es particularmente útil para vacunas contra el virus de la influenza, VIH, anquilostoma, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, rabia, virus sincitial respiratorio, *citomegalovirus*, *Staphylococcus aureus*, clamidia, SARS coronavirus, virus de la varicela zoster, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, virus de Epstein Barr, virus del papiloma humano, etc. Preferentemente, el antígeno es un antígeno del virus de la influenza. A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de antígenos adecuados.

20 Antígenos del virus de la gripe: Estos pueden tomar la forma de un virus vivo o un virus inactivado. Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender viriones completos, viriones divididos o antígenos de superficie purificados (incluida la hemaglutinina y, por lo general, también la neuraminidasa). Los antígenos de la influenza también pueden presentarse en forma de virosomas. Los antígenos pueden tener cualquier subtipo de hemaglutinina, seleccionado de H1, H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. La vacuna puede incluir antígeno (s) de una o más cepas del virus de la influenza (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más), incluido el virus de la influenza A y/o el virus de la influenza B, por ejemplo, un A/H5N1 o A/H1N1 monovalentes vacuna, o una vacuna trivalente A/H1N1 + A/H3N2 + B. El virus de la influenza puede ser una cepa reordena, y puede haberse obtenido mediante técnicas de genética inversa [por ejemplo, Referencias 25-29]. Por lo tanto, el virus puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (típicamente 6 segmentos de A/PR/8/34, con los segmentos HA y N de una cepa de vacuna, es decir, un 6: 2 reordenes). Los virus utilizados como fuente de los antígenos pueden crecer en huevos (por ejemplo, huevos de gallina embrionados) o en cultivos celulares. Donde se usa el cultivo celular, tales células huésped serán típicamente un huésped/célula eucariótico, por ejemplo, células de mamíferos, células aviares, células de insectos, células vegetales y células de levadura. En algunas realizaciones, las células huésped adecuadas son células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células huésped adecuadas son de origen epitelial. En algunas realizaciones, las células hospedadoras adecuadas son células renales. Las líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero MRC 5; PER.C6; WI-38; etc. Las líneas celulares aviares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: células EB66®. Las líneas celulares de mamíferos preferidas para los virus de influenza en crecimiento incluyen: células MDCK [Referencias 30-33], derivadas de riñón canino de Madin Darby; Células Vero [Referencias 34-36], derivadas de riñón de mono verde africano; o células PER.C6 [Referencia 37], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Cuando el virus haya crecido en una línea celular de mamífero, la composición estará ventajosamente libre de proteínas de huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo así la alergenicidad. Las dosis unitarias de la vacuna se suelen estandarizar por referencia al contenido de hemaglutinina (HA), que generalmente se mide por SRID. Las vacunas existentes típicamente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden usar dosis más bajas, particularmente cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionarias como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), 1/4 y 1/8 [Referencias 38, 39], ya que tienen dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9x [Referencias 40, 41]). Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de influenza, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1 15 µg, 0,1 10 µg, 0,1 7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5 µg de HA, etc. por cepa.

55 Virus de inmunodeficiencia humana: Los antígenos adecuados incluyen los derivados de VIH 1 y VIH 2. El antígeno típicamente será un antígeno de envoltura.

60 Antígenos de la superficie del virus de la hepatitis B: Este antígeno se obtiene preferentemente por métodos de ADN recombinante, por ejemplo, después de la expresión en un *Saccharomyces cerevisiae* levadura. A diferencia del HBsAg viral nativo, el antígeno recombinante expresado en levadura no está glicosilado. Puede estar en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro promedio de aproximadamente 20 nm), incluida una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. A diferencia de las partículas nativas de HBsAg, las partículas expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol. El HBsAg puede ser de cualquiera de los subtipos ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr-q- y adr-q+.

65 Anquilostoma: Los antígenos de anquilostoma adecuados incluyen aquellos particularmente vistos en caninos (*Ancylostoma caninum*). Dicho antígeno puede ser Ac-MTP-1 recombinante (metaloproteasa tipo astacina) y/o una hemoglobinasa aspártica (Ac APR 1), que puede expresarse en un sistema de expresión del huésped adecuado,

como el sistema de células baculovirus/insecto como una proteína secretada [Referencias 42, 43].

Antígenos del virus del herpes simple (VHS): Un antígeno de HSV preferido para uso con la invención es la glicoproteína de membrana gD. Se prefiere usar gD de una cepa HSV 2 (antígeno "gD2"). La composición puede usar una forma de gD en la que la región de anclaje de la membrana C terminal se ha eliminado [Referencia 44], por ejemplo, una gD truncada que comprende los aminoácidos 1 306 de la proteína natural con la adición de aparagina y glutamina en el extremo C-terminal. Esta forma de la proteína incluye el péptido señal que se escinde para producir una proteína madura de 283 aminoácidos. La eliminación del anclaje permite que la proteína se prepare en forma soluble.

Antígenos del virus del papiloma humano (VPH): Los antígenos de HPV preferidos para uso con la invención son proteínas de la cápside L1, que pueden ensamblarse para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLP). Las VLP pueden producirse por expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S.cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en *Spodoptera* células, tales como *S. frugiperda*, o en *Drosophila* Células). Para las células de levadura, los vectores plasmídicos pueden portar el gen o genes L1; para las células de insecto, los vectores de baculovirus pueden portar los genes L1. Más preferentemente, la composición incluye VLP de L1 tanto de las cepas de HPV-16 como de HPV-18. Esta combinación bivalente ha demostrado ser muy efectiva [Referencia 45]. Además de las cepas HPV 16 y HPV 18, también es posible incluir VLP de L1 de las cepas HPV 6 y HPV 11. El uso de cepas oncogénicas de HPV también es posible. Una vacuna puede incluir entre 20 y 60 µg/ml (por ejemplo, aproximadamente 40 µg/ml) de L1 por cepa de HPV.

Antígenos del ántrax: El ántrax es causado por *Bacillus Anthracis*. Adecuado *B.anthraxis* los antígenos incluyen componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). Los antígenos se pueden desintoxicar opcionalmente. Se pueden encontrar más detalles en la literatura, por ejemplo, [Referencias 46-48].

Antígenos de *S. aureus*: Una variedad de *S. aureus* Los antígenos son conocidos. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de una cepa de tipo 5 y/o tipo 8) y proteínas (por ejemplo, IsdB, Hla, etc.). Los antígenos de sacáridos capsulares se conjugan idealmente con una proteína transportadora.

Antígenos de *S. pneumoniae*: Una variedad de *S. pneumoniae* Los antígenos son conocidos. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de uno o más de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F) y proteínas (por ejemplo, neumolisina, neumolisina detoxificada, proteína tríada de polihistidina). D (PhtD), etc.). Los antígenos de sacáridos capsulares se conjugan idealmente con una proteína transportadora.

Una solución del antígeno se mezclará normalmente con la emulsión, por ejemplo, en una relación de volumen de 1: 1. Esta mezcla puede ser realizada por un fabricante de vacunas, antes del llenado, o puede ser realizada en el punto de uso por un trabajador de la salud.

40 **Composiciones farmacéuticas**

Las composiciones hechas usando un tensioactivo procesado por los métodos de la invención incluyen composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas. La invención no está limitada por un tipo particular de productos, siempre que sea deseable usar uno o más tensioactivos preparados de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento para formular dichos productos. En algunas realizaciones, dichos productos exhiben una calidad más alta (por ejemplo, pureza, estabilidad, vida útil o cualquier combinación de los mismos), en comparación con una contraparte de referencia (control), que contiene componentes o ingredientes equivalentes, con la excepción de uno o más tensioactivos. no sometido a los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, prefiltración). Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden uno o más tensioactivos preparados de acuerdo con la invención contienen niveles más bajos de impurezas de carbonilo, en comparación con la contraparte de referencia (control).

En algunas realizaciones, tales composiciones de la presente invención son farmacéuticamente aceptables. En relación con las vacunas para la inmunización, una composición puede incluir uno o más componentes adicionales, como un antígeno. En algunas realizaciones, dicha inmunización se lleva a cabo junto con el uso de un adyuvante, por ejemplo, adyuvantes de aceite en agua. Por lo tanto, dichas vacunas pueden contener un adyuvante basado en emulsión, que puede incluir al menos un agente tensioactivo procesado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, y un antígeno opcional.

La composición puede incluir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que tal composición esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [Referencias 49, 50]. Las composiciones y componentes que no contienen mercurio son los más preferidos. Por ejemplo, las vacunas sin conservantes también son útiles.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5. Por lo tanto, un proceso de la invención puede incluir una etapa de ajuste del pH de la composición antes

del envasado.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxinas, una medida estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

La invención incluye kits y composiciones preparadas usando los métodos de la invención. En algunas realizaciones, tales composiciones son composiciones profilácticas, tales como vacunas. En cualquiera de las realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un tensioactivo procesado por los métodos proporcionados en el presente documento pueden proporcionar una estabilidad mejorada (por ejemplo, una vida útil más larga) en comparación con composiciones equivalentes que comprenden el mismo tensioactivo pero no se procesan de acuerdo con la invención.

La composición puede incluir material para una inmunización de administración única, o puede incluir material para inmunizaciones de múltiples administraciones (es decir, un kit "multidosis"). Cuando la composición es una vacuna para la inmunización, la vacuna puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit "multidosis"). En algunas realizaciones, la inclusión de un conservante puede ser preferible en disposiciones multidosis.

Las composiciones que contienen uno o más agentes tensioactivos procesados por los métodos descritos en el presente documento pueden rellenarse en sistemas cerrados estériles. Los sistemas cerrados estériles adecuados incluyen, entre otros, viales, jeringas (como jeringas desechables), recipientes de vidrio y plástico, incluidos recipientes rígidos o flexibles (por ejemplo, bolsas). En algunas realizaciones, un sistema cerrado estéril adecuado para uso en la presente divulgación está recubierto para la superficie modificada, por ejemplo, siliconado.

25

Métodos de tratamiento y administración de la composición farmacéutica.

Las composiciones preparadas de acuerdo con los métodos de la invención son adecuadas para la administración a sujetos, incluyendo pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un tensioactivo procesado por los métodos proporcionados en el presente documento son adecuadas para la administración a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, dicha composición es una composición terapéutica que se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en el que la composición comprende un ingrediente activo adecuado destinado al tratamiento. En algunas realizaciones, la respuesta inmune se provoca con el fin de proporcionar efectos terapéuticos, efectos profilácticos, o ambos. En algunas realizaciones, la respuesta inmune se provoca con el fin de proporcionar efectos terapéuticos. En algunas realizaciones, la respuesta inmune se provoca para proporcionar efectos profilácticos, por ejemplo, como una vacuna. En algunas realizaciones, dicha respuesta inmune se ve aumentada por la presencia de al menos un adyuvante. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

40

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para generar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente una composición de la invención que incluye un inmunógeno, para potenciar una respuesta inmune.

45

Las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar a un sujeto (por ejemplo, pacientes) que lo necesiten, incluidos niños y adultos, que cumplan ciertos criterios, como criterios clínicos, criterios genéticos, factores de riesgo, grupos de edad, etc. el paciente puede tener menos de 1 año, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años. El paciente puede ser anciano (por ejemplo, > 50 años, preferentemente > 65 años), los jóvenes (por ejemplo, <5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal militar y militar, mujeres embarazadas, personas con enfermedades crónicas, inmunodeficientes o pacientes inmunocomprometidos, y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, cuando las composiciones farmacéuticas son vacunas profilácticas para la inmunización, tales vacunas son adecuadas no solo para estos grupos, sino que pueden usarse más generalmente en una población, por ejemplo, en sujetos sanos.

50

Las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud) otras vacunas.

Las composiciones pueden administrarse de cualquier forma adecuada, que incluye, entre otras: inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), inyección subcutánea, intranasal [Referencias 51-53], oral [Referencia 54], intradérmica [Referencias 55, 56], transcutánea, transdérmica [Referencia 57], etc.

60

Las composiciones farmacéuticas, incluidas las vacunas, se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque se puede administrar a los niños media dosis (por ejemplo, aproximadamente 0,25 ml). Sin embargo, los volúmenes de administración son fácilmente ajustados por el experto en la técnica para adaptarse al uso o propósito particular.

65

La invención también proporciona estos kits y composiciones para uso como medicamentos.

5 La invención también proporciona el uso de: (i) una preparación acuosa de un antígeno o una proteína o péptido terapéutico; y (ii) una emulsión de aceite en agua que comprende un agente tensioactivo preparado según la invención, en la fabricación de un medicamento para administrar a un paciente.

10 La respuesta inmune provocada por estos métodos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora.

Aspectos generales

15 A lo largo de la especificación, incluidas las reivindicaciones, cuando el contexto lo permita, el término "que comprende" y sus variantes, como "comprende", debe interpretarse como que incluye el elemento declarado (por ejemplo, un número entero) o elementos (por ejemplo, números enteros) sin excluir necesariamente Cualquier otro elemento (por ejemplo, enteros). Por lo tanto, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

20 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención. En algunas realizaciones, "una composición que está sustancialmente libre de un componente" puede incluir una composición de este tipo con una cantidad residual del componente, en donde la cantidad residual está (i) por debajo de niveles de detección confiables por medios de medición adecuados o aceptados en la técnica; y/o (ii) la cantidad residual no afecta adversamente a un propósito previsto de la composición.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x + 10 %.

30 A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Así los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

35 Cuando se utilicen materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que no tengan encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) y, en particular, que estén libres de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

40 Por consiguiente, las siguientes realizaciones son concebibles a partir de lo anterior y los ejemplos:

A1. Una preparación en masa de un tensioactivo, caracterizada porque el tensioactivo contiene menos agregados que el tensioactivo no sometido a prefiltración con un filtro que tiene un tamaño de poro de entre 5 y 50 μm ;

45 en el que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico; y,

en la que la preparación a granel tiene un volumen de al menos 10 litros.

A2. La preparación a granel de la realización A1, en la que el tensioactivo es un tensioactivo anhidro.

50 A3. La preparación a granel de cualquiera de las realizaciones anteriores, que tiene un volumen de al menos 20 litros, 50 litros, al menos 100 litros, al menos 125 litros, al menos 150 litros, al menos 175 litros, al menos 200 litros, al menos 250 litros, o al menos 300 litros.

55 A4. La preparación en masa de una cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizada porque la preparación en masa de un agente tensioactivo contiene un nivel de carbonilo que es inferior al del agente tensioactivo no sometido a la prefiltración.

A5. La preparación en masa de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en:

60 Tween®20 (polisorbato 20), Tween®40 (polisorbato 40), Tween®60 (polisorbato 60), Tween®80 (polisorbato 80), Triton™ X-100, IGEPAL CA-630, Nonidet P-40, Pluronic® F-68, Pluronic® F-88 y Pluronic® F-127 (poloxámeros), y Brij 35 (polioxietilenaquiléter).

65 A6. Una composición líquida que comprende un componente acuoso y un tensioactivo prefiltrado,

en el que el tensioactivo prefiltrado se obtiene a partir de la preparación en masa de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 5 A7. La composición líquida de la realización A6, que comprende además un componente de aceite.
- A8. La composición líquida de la realización A6 o A7, en la que la composición líquida es una emulsión.
- 10 A9. La composición líquida de la realización A8, en la que la composición líquida es una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.
- A10. La composición líquida de la realización A7, en la que el componente de aceite se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media, ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena muy larga y precursores de esterol.
- A11. La composición líquida de la realización de la realización A10, en la que el componente de aceite es o comprende escualeno.
- 20 A12. La composición líquida de la realización A6, en la que la composición líquida comprende un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en polisorbatos.
- A13. La composición líquida de la realización A12, en la que el tensioactivo es polisorbato 80,
- 25 A14. Un método para preparar la composición líquida, el método que comprende los pasos de:
- prefiltrando un tensioactivo con un filtro que tiene un tamaño de poro promedio de 5-50 micras a temperatura ambiente para formar un tensioactivo prefiltrado; y,
- 30 combinando el tensioactivo prefiltrado con un componente acuoso para formar la composición líquida de una cualquiera de las realizaciones A6-A13.
- A15. Un método para preparar la composición líquida, el método que comprende los pasos de:
- 35 proporcionar un tensioactivo prefiltrado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones A1-A5; y,
- combinando el tensioactivo prefiltrado con un componente acuoso para formar la composición líquida de una cualquiera de las realizaciones A6-A13.
- 40 A16. El método de la realización A14 o A15, en el que la composición líquida es una composición farmacéutica que comprende al menos un API.
- A17. El método de la realización A16, en el que la composición líquida comprende además un componente de aceite.
- 45 A18. El método de la realización A16 o A17, que comprende además los pasos de:
- emulsionando la composición líquida para formar una primera emulsión;
- 50 someter la primera emulsión a una alta fuerza de cizallamiento y alta presión para formar una segunda emulsión; y,
- filtrando la segunda emulsión, para formar una emulsión uniforme.
- A19. El método de la realización A18, en el que la primera emulsión se caracteriza porque un primer tamaño promedio de gotas de aceite es de 5000 nm o menos, y en el que el número de gotitas de aceite que tiene un tamaño de $> 1,2 \mu\text{m}$ en la primera emulsión es de $5 \times 10^{11}/\text{ml}$ o menos.
- 55 A20. El método de la realización A18 o A19, en el que la segunda emulsión se caracteriza porque un segundo tamaño de gota de aceite promedio es de 500 nm o menos, y en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño de $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión es de $5 \times 10^{10}/\text{ml}$ o menos.
- 60 A21. El método de una cualquiera de las realizaciones A18-A20, en el que la emulsión uniforme se caracteriza porque un tercer tamaño promedio de gotas de aceite está entre aproximadamente 80 y 220 nm, y en el que el número de gotas de aceite tiene un tamaño de $> 1,2 \mu\text{m}$ en el uniforme La emulsión es de $5 \times 10^8/\text{ml}$ o menos.
- 65

A22. El método de la realización A21, en el que la emulsión uniforme comprende escualeno, polisorbato 80 y trioleato de sorbitán.

5 A23. El método de la realización A22, en el que la emulsión uniforme comprende aproximadamente 4,3 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,48 % de trioleato de sorbitán en peso.

Específicamente, la presente invención se refiere a las siguientes realizaciones:

10 B1. Un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende las etapas de: (a) filtrar el polisorbato 80 a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm , para proporcionar el polisorbato 80 purificado; y (b) combinar el polisorbato 80 purificado con un componente de aceite para proporcionar la emulsión.

15 B2. El proceso de la realización B1, en el que la etapa (a) comprende: filtrar polisorbato no acuoso 80 a través de un filtro de polipropileno que tiene un tamaño de poro entre 5-50 μm .

B3. El proceso de cualquier realización anterior, en el que el polisorbato 80 purificado se combina con un material acuoso entre las etapas (a) y (b).

20 B4. El proceso de cualquier realización precedente, en el que la etapa (b) comprende homogeneización para formar una emulsión homogeneizada.

B5. El proceso de cualquier realización precedente, en el que la etapa (b) comprende microfluidización para formar una emulsión microfluidizada.

25 B6. El proceso de la realización B4 o la realización B5, en donde la etapa (b) comprende la filtración estéril de la emulsión homogeneizada o microfluidizada.

30 B7. El proceso de cualquier realización precedente, en el que la emulsión de aceite en agua es un adyuvante de vacuna que incluye escualeno.

B8. El proceso de la realización B7, en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno, el polisorbato 80 y trioleato de sorbitán, v.g. 5 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,5 % de trioleato de sorbitán (en volumen).

35 B9. El proceso de cualquier realización anterior, en el que la emulsión de aceite en agua tiene menos de 0,85 ppm de acetaldehído.

40 B10. El proceso de cualquier realización anterior, en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno y la emulsión tiene menos de 661 picogramos de bifenilos policlorados (PCB) por gramo de escualeno (equivalente tóxico TEQ).

45 B11. Un método para preparar (i) una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión de aceite en agua de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones B1 a B10 y combinar la emulsión con un antígeno, o (ii) un kit de vacuna que comprende preparar un aceite en emulsión acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y envasado de la emulsión en un kit como un componente del kit junto con un componente antigénico.

50 B12. El método de la realización B11, en el que el antígeno es un antígeno del virus de la gripe; por ejemplo, en donde la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna y en donde la composición de vacuna incluye aproximadamente 15 μg , aproximadamente 10 μg , aproximadamente 7.5 μg , aproximadamente 5 μg , aproximadamente 3.8 μg , aproximadamente 1.9 μg , aproximadamente 1.5 μg de Hemaglutinina por cepa del virus de la influenza.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

55 EJEMPLOS

El adyuvante de emulsión MF59 con escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y tampón de citrato se preparó utilizando los métodos descritos en las Referencias 10 a 12, con: preparación de una mezcla de escualeno/sorbitán triolato y una solución de polisorbato 80 en tampón de citrato; formación de una primera emulsión por homogeneización de estos componentes utilizando la circulación de "tipo I" y luego de "tipo II"; formación de una segunda emulsión mediante microfluidización (nuevamente utilizando la circulación de "tipo II") con una disposición de canal Z IXC-APM, para reducir el diámetro de las gotitas de aceite con respecto a la primera emulsión; y filtración de la emulsión microfluidizada a través de una membrana de PES de doble capa hidrófila. Para la circulación "tipo II", la emulsión se pasó entre dos recipientes, pero después de la homogeneización o microfluidización final se recolectó en un tercer recipiente (nuevo). Los tamaños de los lotes fueron de 50 o 250 litros.

65 Se utilizaron dos tipos diferentes de polisorbato 80 no acuoso. Con referencia a la tabla 1 a continuación, los

números de lote 2111-2118 utilizaron polisorbato 80 que no se filtró antes de ser utilizado, mientras que los números de lote 2119 en adelante usaron polisorbato 80 que se prefiltró a través de una cápsula de filtro de vellón de polipropileno de 20 µm (Sartopure™ PP 2 MidiCap™, 20 µm) a temperatura ambiente con una bomba peristáltica, antes de mezclarse con tampón de citrato. Cuando se utiliza un nuevo filtro Sartopure™ PP 2 MidiCap™ de 20 µm, los primeros 200 ml se descartaron.

La Tabla 1 muestra el efecto de esta prefiltración sobre la cantidad (ppm) de acetona, acetaldehído y formaldehído en los lotes de adyuvante de emulsión MF59 final que se produjeron. La línea gruesa en la tabla 1, debajo de la fila 2118, indica el lote en el que se inició la prefiltración del polisorbato 80 anhidro. Todos los lotes debajo de esta línea se fabricaron utilizando un método en el que el polisorbato 80 anhidro se prefiltró. Los niveles de acetaldehído por encima de la línea están todos por encima de 0,85 ppm, mientras que los niveles por debajo de la línea son todos menores de 0,70 ppm.

La Figura 1 muestra una representación gráfica de los datos en la tabla 1 (incluidos los lotes adicionales). Esta figura muestra en términos visuales claros que los lotes anteriores al número de lote 2119 (es decir, aquellos sin un paso de prefiltración) tienen un mayor contenido de acetaldehído que los producidos después del número de lote 2119 (es decir, aquellos para los cuales se incluyó el paso de prefiltración). Aunque los resultados muestran una variabilidad de lote a lote, el inventor cree que la prefiltración contribuye a la reducción de los niveles de carbonilo, y que el proceso es más robusto al usar material prefiltrado.

Tabla 1:

Carga 549...010	Escualeno	Trioleato de sorbitán	Polisorbato 80	Tamaño medio de partícula	Número de partículas grandes	Acetona	Acetaldehído	Formaldehído
	[36;42]	[4,1;5,3]	[4,1;5,3]	[135;175]	1x10 ⁷	≤1,5	≤2,6	≤0,2
2111	40,1	4,4	4,4	164	594890	0,22	0,89	0,03
2112	39,7	4,5	4,5	175	464840	0,22	0,87	0,03
2113	39	4,4	4,4	171	444140	0,18	0,86	0,03
2114	38,5	4,3	4,3	162	358150	0,22	0,86	0,03
2115	39	4,6	4,5	160	537910	0,24	0,86	0,03
2116	39,1	4,4	4,4	166	314300	0,21	0,85	0,03
2117	38,7	4,7	4,5	161	600830	0,28	0,86	0,03
2118	39,8	4,7	4,5	166	890760	0,12	0,85	0,03
2119	39,3	4,6	4,4	166	695530	0,06	0,67	0,03
2120	39,5	4,6	4,5	170	482050	0,06	0,39	0,04
2121	39,9	4,1	4,2	161	792860	0,06	0,4	0,04
2122	38,9	4,3	4,2	172	500990	0,08	0,39	0,04
2123	39,4	4,8	4,7	162	509460	0,06	0,4	0,04
2124	39,3	4,6	4,4	163	518690	0,29	0,45	0,05
2125	38,6	4,8	4,6	168	1092500	0,36	0,44	0,05
2126	38,3	4,5	4,4	167	409460	0,22	0,43	0,05
2127	37,6	4,4	4,4	169	1196670	0,21	0,43	0,05
2128	38,3	4,5	4,4	167	334780	0,18	0,44	0,05
2129	38,2	4,6	4,4	168	534930	0,2	0,43	0,06
2130	38,1	4,4	4,5	168	434100	0,12	0,42	0,05
2131	38,3	4,4	4,4	174	321950	0,11	0,42	0,05
2132	39,7	4,6	4,5	172	418630	0,11	0,43	0,05
2133	39,6	4,5	4,5	175	524520	0,06	0,45	0,05
2134	39,6	4,5	4,5	165	431690	0,06	0,47	0,06
2135	39,5	4,5	4,6	164	428420	0,07	0,49	0,06

Referencias

[1] WO90/14837.

[2] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2: 197-203.

[3] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680,

[4] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[5] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

[6] New Generation Vaccines (eds. Levine et al.). 3rd edition, 2004. ISBN 0-8247-4071-8.

[7] Kishore et al, (2011) Pharm Res 25: 1194-1210,

- [8] Maggio (2012), J. Excipients and Food Chem 3 (2): 45-53.
- [9] Yeo et al, (1992) Lipids 27 (1): 50-53.
- 5 [10] WO2011/067669
- [11] WO2011/067673
- [12] WO2011/067672
- 10 [13] Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions (W. Scharfl), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.
- [14] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines 6 (5): 699-710,
- 15 [15] EP B 2029170
- [16] Garçon et al. (2012) Expert Rev Vaccines 11: 349-66.
- 20 [17] WO2008/043774.
- [18] WO2010/023551
- [19] Brito et al. (2011) Vaccine 29: 6262-6268.
- 25 [20] WO94/26683.
- [21] He et al. (2002) J Agric Food Chem 50: 368-72.
- 30 [22] WO2011/141819
- [23] Patente de Estados Unidos 8.092.813.
- [24] WO2007/052155.
- 35 [25] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20: 3165-3170,
- [26] Subbarao et al. (2003) Virology 305: 192-200,.
- 40 [27] Liu et al. (2003) Virology 314: 580-590,.
- [28] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78: 1851-1857.
- [29] Webby et al. (2004) Lancet 363: 1099-1103.
- 45 [30] WO97/37000,
- [31] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98: 93-100,
- 50 [32] Halperin et al. (2002) Vaccine 20: 1240-7.
- [33] Tree et al. (2001) Vaccine 19: 3444-50,
- [34] Kistner et al. (1998) Vaccine 16: 960-8.
- 55 [35] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98: 101-110,
- [36] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19: 1149-58.
- 60 [37] Pau et al. (2001) Vaccine 19: 2716-21.
- [38] WO01/22992.
- [39] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103 (1-2): 163-71.
- 65 [40] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173: 1467-70,

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

[42] Williamson et al. (2006) Infection and Immunity 74: 961-7.

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

[44] EP A 0139417.

[45] Harper et al. (2004) Lancet 364 (9447): 1757-65.

[46] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39: 85-100,

[47] Demicheli et al. (1998) Vaccine 16: 880-884.

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

[49] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71: 91-96.

[50] WO02/097072.

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

[52] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 295-304.

[53] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Washington DC). 43: 728-30,

[54] Mann et al. (2004) Vaccine 22: 2425-9.

[55] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69: 1247-50,

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

[57] Chen et al. (2003) Vaccine 21: 2830-6.

Las diversas características y realizaciones de la presente invención, mencionadas en las secciones individuales anteriores, se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, mutatis mutandis. En consecuencia, las características especificadas en una sección pueden combinarse con las características especificadas en otras secciones, según corresponda.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento . Dichos equivalentes están destinados a incluirse en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende las etapas de: (a) filtrar el polisorbato 80 a través de un filtro que tiene un tamaño de poro entre 5-50 µm, para proporcionar el polisorbato 80 purificado; y (b) combinar el polisorbato 80 purificado con un componente de aceite para proporcionar la emulsión.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende: filtrar polisorbato no acuoso 80 a través de un filtro de polipropileno que tiene un tamaño de poro entre 5 - 50 µm.
- 10 3. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que el polisorbato 80 purificado se combina con un material acuoso entre las etapas (a) y (b).
4. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (b) comprende homogeneización para formar una emulsión homogeneizada.
- 15 5. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (b) comprende microfluidización para formar una emulsión microfluidizada.
- 20 6. El proceso de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la etapa (b) comprende la filtración estéril de la emulsión homogeneizada o microfluidizada.
7. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la emulsión de aceite en agua es un adyuvante de vacuna que incluye escualeno.
- 25 8. El proceso de la reivindicación 7, en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno, el polisorbato 80 y trioleato de sorbitán.
9. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la emulsión de aceite en agua tiene menos de 0,85 ppm de acetaldehído.
- 30 10. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno y la emulsión tiene menos de 661 picogramos de bifenilos policlorados por gramo de escualeno (equivalente tóxico TEQ).
- 35 11. Un método para preparar (i) una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión de aceite en agua de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y combinar la emulsión con un antígeno, o (ii) un kit de vacuna que comprende preparar un aceite en - emulsión acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y envasado de la emulsión en un kit como un componente del kit junto con un componente antigénico.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en el que el antígeno es un antígeno del virus de la gripe; por ejemplo, en donde la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna y en donde la composición de vacuna incluye aproximadamente 15 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 7,5 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 3,8 µg, aproximadamente 1,9 µg, aproximadamente 1,5 µg de Hemaglutinina por cepa del virus de la gripe.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

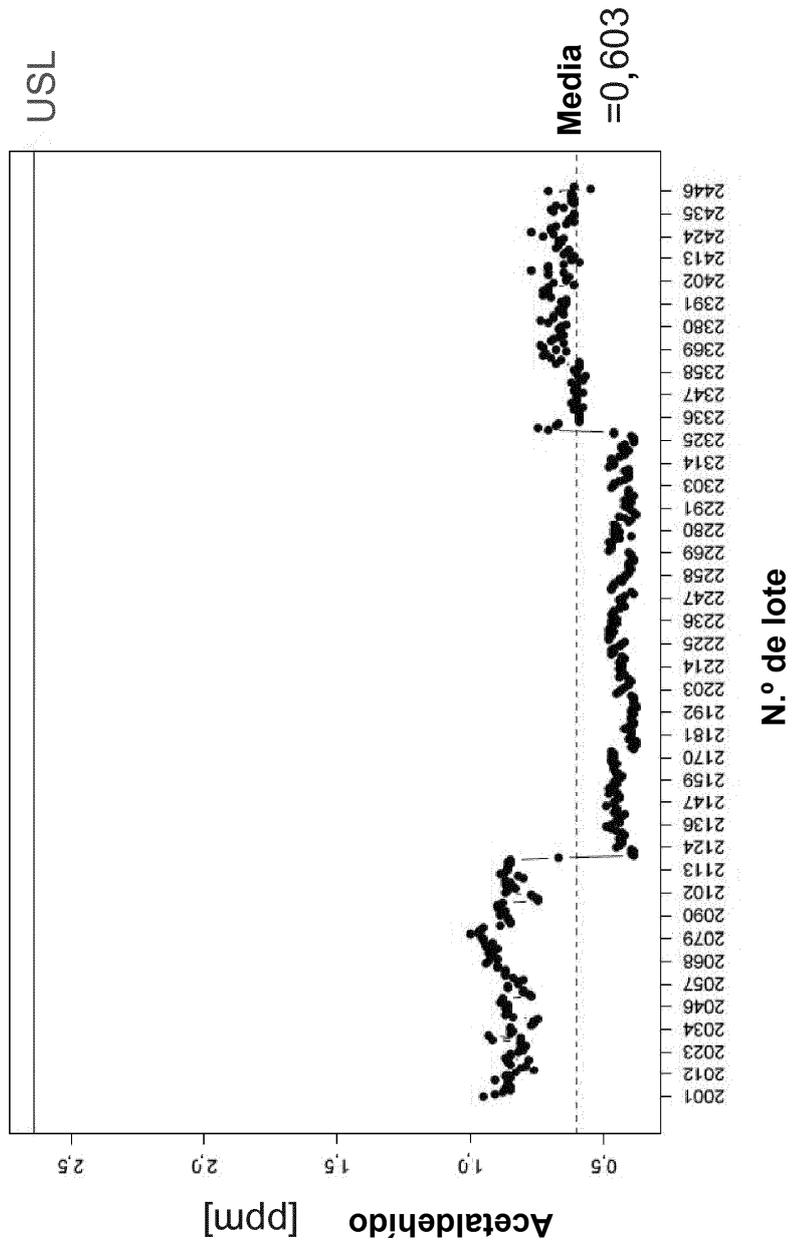


FIG. 1