(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 697**

(51) Int. CI.:

C12P 5/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 11170769 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2369003**

(54) Título: **Proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno procedente de levaduras**

(30) Prioridad:

28.08.2008 US 190486 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BROEKER, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Proceso para preparar una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno procedente de levaduras

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención pertenece al campo de la fabricación de escualeno para su uso en emulsiones de aceite en agua para uso parenteral en humanos.

TÉCNICA ANTERIOR

[0002] El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado y ramificado llamado escualeno: 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. El escualeno es conocido porque se usa en emulsiones de aceite en agua para vacunas humanas, por ejemplo la emulsión MF59, que se usa para adyuvar vacunas antigripales. El escualeno también se usa en otros productos farmacéuticos (por ejemplo, pomadas y supositorios) y en cosmética.

[0003] Las actuales fuentes de escualeno son, principalmente, los aceites de pescado y, más particularmente, los aceites de hígado de tiburón. Pueden surgir problemas relacionados con el uso de escualeno extraído del aceite de hígado de tiburón, especialmente si no se respetan los rigurosos estándares de fabricación (como los que se utilizan en la producción del MF59 de Novartis). Por ejemplo, los tiburones pueden infectarse con patógenos que también son infecciosos para los humanos o que producen sustancias que son nocivas para los humanos, y puede haber agentes de tiburón como el TSE o similares a este [ver, por ejemplo, las referencias 1-3]. Asimismo, los tiburones pueden tener toxinas humanas, como la carchatoxina. Por todo ello, las fuentes de escualeno baratas y de baja calidad no son adecuadas para el uso farmacéutico en humanos. El riesgo de causar daños a un paciente humano puede verse incrementado en situaciones en las que el escualeno forma parte de un adyuvante inmunológico, ya que, por definición, el adyuvante puede provocar una fuerte respuesta inmune no deseada frente a las impurezas.

[0004] Por consiguiente, en vez de utilizar fuentes de escualeno provenientes de tiburón baratas y de baja calidad, los usos farmacéuticos de escualeno (por ejemplo, los que se utilizan en la fabricación de MF59) utilizan materiales de mayor calidad, pero estos escualenos de alta calidad son caros y su disponibilidad es limitada. Estas costosas fuentes no son útiles, por ejemplo, para su uso en los países en vías de desarrollo.

[0005] Resultaría útil hallar una fuente de escualeno que satisfaga estos elevados estándares farmacéuticos sin ser tan cara. Por consiguiente, resulta deseable contar con una fuente de escualeno alternativa y viable, especialmente cuando el escualeno está dirigido al uso parenteral en humanos y/o al uso en un adyuvante inmunológico. Una fuente más barata de escualeno de grado o nivel farmacéutico sería particularmente útil en los países en vías de desarrollo que no pueden disponer fácilmente de tiburones o no pueden permitirse con facilidad los costosos materiales de grado farmacéutico que se utilizan actualmente, por ejemplo por parte de Novartis. Una posible fuente son las levaduras [5, 37, 38].

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente invención está relacionada con los métodos para preparar escualeno a partir de levaduras que hiperproducen escualeno. Las levaduras son organismos GRAS (acrónimo de la expresión en inglés 'Generally recognized as safe' o 'considerado(s) generalmente seguro(s)') y, por lo tanto, son una fuente útil de escualeno para uso farmacéutico. Además, el escualeno que se obtiene puede estar libre de la contaminación de patógenos, priones y toxinas ambientales; por ejemplo, a priori las levaduras carecen de mercurio. Las levaduras ya se usan en el campo de las vacunas (por ejemplo, en la expresión recombinante del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y, por lo tanto, no presentan ningún problema de regulación en particular; es decir, el escualeno derivado de levadura es particularmente adecuado para la preparación de adyuvantes inmunológicos. Por último, las técnicas de cultivo de levadura están muy extendidas y pueden adaptarse fácilmente para su transferencia tecnológica.

[0007] La presente invención proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos, de manera que incluye los siguientes pasos: (a) purificar el escualeno proveniente de una levadura que aporta una alta producción de escualeno durante su cultivo, de manera que la levadura se cultiva en un medio controlado que está libre de productos de origen animal; y (b) combinar el escualeno purificado en el paso (a) con un componente acuoso a fin de obtener la emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos. La invención también proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos, de manera que comprende los siguientes pasos: (a) obtener escualeno que ha sido purificado proveniente de una levadura que aporta una alta producción de escualeno durante su cultivo, de manera que la levadura se cultiva en un medio controlado que está libre de productos de origen animal; y (b) combinar el escualeno del paso (a) con un componente acuoso a fin de obtener la emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos.

[0008] La invención también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) para su uso parenteral en humanos, de manera que comprende el paso de preparar una emulsión de

aceite en agua como se ha explicado previamente y mezclar la emulsión con un inmunógeno.

[0009] La invención también proporciona un proceso para preparar un kit para preparar una composición inmunogénica, de manera que incluye preparar una emulsión de aceite en agua como se ha explicado previamente, guardar la emulsión en un primer recipiente, y combinar el primer recipiente en forma de kit con un segundo recipiente, de manera que el segundo recipiente contiene un inmunógeno. El inmunógeno puede estar seco o ser acuoso.

Producción de escualeno en la levadura

[0010] El proceso de la invención utiliza escualeno que se purifica de la levadura. Las levaduras pueden ser cepas o variedades mutantes o que existen de forma natural y que se seleccionan por su elevada producción de escualeno, pero, generalmente, serán variedades desarrolladas genéticamente que se han manipulado para producir grandes cosechas de escualeno. Otra posibilidad es cultivar cepas de levaduras -naturales, mutantes o desarrolladas mediante ingeniería- en presencia de factores que dan como resultado una mayor producción de escualeno.

[0011] La producción de escualeno puede expresarse como un porcentaje (%) del peso celular seco (o 'cdw', por sus siglas en inglés) de una levadura en particular. Habitualmente, una variedad normal de levadura de tipo natural *Yarrowia lipolytica* puede producir escualeno a aproximadamente un 0,5% de cdw, mientras que una levadura de cerveza normal *Saccharomyces uvarum* puede producir escualeno a aproximadamente un 1,4% del cdw [4]. Una levadura que da una 'alta producción' de escualeno es aquella en la que al menos un 2% del cdw es escualeno, por ejemplo, ≥3%, ≥4%, ≥5%, ≥6%, ≥7%, ≥8%, ≥9%, ≥10%, ≥11%, ≥12%, ≥13%, ≥14%, ≥15% o más de cdw.

[0012] La producción de escualeno también puede expresarse como un porcentaje (%) de los lípidos totales en una levadura en particular. Una levadura de cerveza normal *S. uvarum* produce escualeno a un 33% de los lípidos totales [4]. Una levadura que da una 'alta producción' de escualeno puede producir escualeno en un ≥40% de los lípidos totales; por ejemplo, ≥50%, ≥60%, etc. De manera ventajosa, el escualeno es al menos un 95% en su configuración trans (isoforma natural); por ejemplo, >96%, >97%, >98%, >99% o 100%.

[0013] En este campo se conocen variedades de levaduras mutantes que existen de forma natural y que tienen una alta producción de escualeno, por ejemplo la variedad *Torulasopra delbrueckii* que se describe en la referencia 5. Las mutantes pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos para inducir mutaciones (tanto mutagénesis aleatoria como mutagénesis dirigida), por ejemplo los que se describen en las referencias 6 y 7, seguidos del 'screening' o rastreo de las células mutagenizadas en el caso de aquellas con una producción de escualeno adecuadamente alta. La referencia 8 describe cepas o variedades de levaduras mutantes con mutaciones sensibles a la temperatura de la 4-α-carboxisterol-C3-deshidrogenasa (ERG26) que provocan una acumulación de escualeno cuando se cultivan a una temperatura adecuada.

[0014] Sin embargo, normalmente el proceso de la invención utiliza levaduras desarrolladas genéticamente. Pueden usarse diversos métodos para aumentar la producción de escualeno de una variedad inicial. El metabolismo de los esteroles puede manipularse para aumentar las producciones de escualeno, por ejemplo aumentando el anabolismo del escualeno y/o disminuyendo el catabolismo del escualeno (incluyendo su descomposición y/o su conversión natural en ergosterol). Los genes involucrados en la biosíntesis del escualeno incluyen la mevalonato quinasa, la fosfomevalonato quinasa, la pirofosfomevalonato descarboxilasa, la isopentenil pirofosfato isomerasa, la HMGR (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) y la escualeno sintasa. Los genes involucrados en la conversión de escualeno en ergosterol incluyen los siguientes: escualeno epoxidasa (ERG1), lanosterol sintasa, C14-dimetilasa, d14-reductasa, C4-metiloxidasa, C4-descarboxilasa (ERG26), 3-cetorreductasa, C24-metiltransferasa, C8-isomerasa, C5-desaturasa, d22-desaturasa y d24-reductasa. Otras enzimas catabólicas incluyen LEU2 (β-isopropilmalato deshidrogenasa), oxidoescualeno ciclasa, cimosterol-24-metiltransferasa y ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-deshidrogenasa. Estas manipulaciones o modificaciones se desvelan, por ejemplo, en la referencia 9.

[0015] Los niveles de actividad de las enzimas relevantes pueden aumentarse o disminuirse de cualquier manera que sea adecuada, normalmente mediante ingeniería genética. La levadura puede modificarse genéticamente siguiendo métodos estándar, incluidos aquellos que se describen en las referencias 7 y 10. Los genes pueden introducirse en las levaduras de diversas maneras, por ejemplo en un plásmido o mediante la integración cromosómica. Las técnicas de desactivación génica también son muy conocidas para las levaduras.

[0016] Las maneras de aumentar la actividad enzimática incluyen -pero no se limitan a- las siguientes: aumentar el número de copias de una enzima que ya está presente en una variedad, por ejemplo añadiendo uno o más genes adicionales, normalmente en un plásmido; aumentar los niveles de expresión (hiperexpresión) de una enzima que ya está presente, por ejemplo dotándola de un promotor más fuerte; añadir una enzima heteróloga, esto es, una enzima que no esté presente en una variedad; reducir o evitar la expresión de un factor supresor o inhibidor; modificar la secuencia de una enzima que ya está presente en una variedad, por ejemplo para aumentar la estabilidad, para eliminar los residuos de aminoácidos que propician la inhibición, para modificar el tráfico de proteínas o la ubicación celular; etc. Por ejemplo, se sabe que el truncamiento de la secuencia de una enzima puede hacer que cambie de una proteína de membrana a una proteína citosólica de tal manera que provoca la acumulación de escualeno.

[0017] Los métodos para reducir la actividad enzimática incluyen -pero no se limitan a- los siguientes: la deleción de una enzima que ya está presente en una variedad; reducir los niveles de expresión de una enzima que ya está presente, por ejemplo dotándola de un promotor más débil; aumentar la expresión de un factor supresor o inhibidor; modificar la secuencia de una enzima que ya está presente en una variedad, por ejemplo para reducir la estabilidad, para modificar los residuos de aminoácidos que regulan la actividad enzimática, para eliminar los dominios funcionales, para modificar el tráfico de proteínas o la ubicación celular; etc.

[0018] Los niveles de subexpresión o sobreexpresión, y de mayor o menor actividad, se expresan en relación con la correspondiente variedad natural que carece de la modificación pertinente.

[0019] Existen diversos informes sobre técnicas adecuadas de manipulación genética en levaduras. Por ejemplo, la referencia 11 desvela levaduras con una mayor acumulación de escualeno debido a la hiperexpresión de HMGR con una menor expresión de cimosterol-24-metiltransferasa y/o ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-deshidrogenasa. La referencia 12 desvela levaduras que expresan una HMGR truncada (la isoenzima *HMG1*) que carece de su región de unión membranal, proporcionando así una enzima citosólica, y presentan una acumulación de escualeno. La disrupción de la escualeno epoxidasa provoca la acumulación de escualeno [13]. La referencia 14 desvela la modificación de *Yarrowia lipolytica* para inhibir acetil-CoA carboxilasa y para hiperexpresar HMGR, de manera que las cepas produjeron escualeno en un 2% de cdw utilizando fuentes económicas de carbono como suero de queso o caña de azúcar. La mutación de la oxidoescualeno ciclasa (ERG7) también puede provocar la acumulación de escualeno [8]. Se ha descubierto que un ergosterol auxótrofo que es incapaz de crecer en 3-cetosteroles -si no se añade colesterol- acumula escualeno [15]. Las variedades de levadura con una síntesis de hemo dañada o alterada pueden acumular escualeno [16].

[0020] También puede usarse una combinación de estos enfoques; por ejemplo, la expresión de HMGR truncada citosólica en combinación con el bloqueo o la desactivación de la escualeno epoxidasa.

[0021] Se prefieren las cepas de *S. cerevisiae* que expresan HMGR truncada, por ejemplo las que se describen en la referencia 12. La expresión de una forma de HMG1 soluble y que no se une a las membranas, idealmente bajo el control de un promotor constitutivo (por ejemplo, el promotor ADH1), provoca altos niveles de acumulación de escualeno (40 veces más que el tipo silvestre). La proteína truncada puede contener una parte de la región espaciadora y el dominio catalítico C-terminal de HMGlp, pero carece de la región N-terminal que abarca la membrana. Una cepa o variedad puede expresar una o más copias del gen.

[0022] La levadura (natural, mutante o modificada) puede cultivarse en presencia de factores que aumentan la producción de escualeno. Por ejemplo, los antimicóticos de alilamina (por ejemplo, Terbinafina, Naftifina) pueden inhibir la escualeno epoxidasa, lo cual provoca una deficiencia de ergosterol y una acumulación de escualeno intracelular [17]. Si se incluyen inhibidores de escualeno epoxidasa en unos niveles subletales, o se utilizan con cepas resistentes, etc., puede aumentarse la producción de escualeno de un cultivo. En la referencia 18 se observó un aumento de 100 veces en la producción de escualeno en presencia de terbinafina. Las escualeno epoxidasas de diferentes especies de *Candida* difieren en cuanto a la sensibilidad a la terbinafina en un factor de alrededor de 10, de manera que puede ser necesario optimizar la concentración de un factor en cualquier levadura que sea de interés. Otros antimicóticos que pueden provocar la acumulación de escualeno incluyen -pero no se limitan a- los siguientes: voriconazol [19], 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol [20] y antimicóticos de tiocarbamato (por ejemplo, tolnaftato y tolciclato) [21]. El crecimiento en presencia de tiamina también puede aumentar la producción de escualeno [22].

[0023] Las levaduras adecuadas incluyen cualquier levadura que produce escualeno o que puede manipularse para producir escualeno. Los ejemplos de levaduras adecuadas incluyen especies de los géneros *Arthroascus*, *Arxiozyma*, *Arxula*, *Bullera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Dipodascopsis*, *Endomyces*, *Eremothecium*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Hormoascus*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Lodderomyces*, *Metschnikowia*, *Pachysolen*, *Pachytichospora*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizoblastosporion*, *Schizosaccharomyces*, *Schwaniomyces*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*, *Sympodiomyces*, *Taphrina*, *Torula*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Zygohansenula* y *Zygosaccharomyces*. Los géneros más útiles para el proceso de la invención son *Saccharomyces* y *Torulaspora*. Una especie preferida para usarse en la invención es *Torulaspora delbrueckii* y la más preferida es *Saccharomyces cerevisiae*.

[0024] La fermentación de la levadura para producir escualeno puede realizarse a gran escala, lo cual produce cantidades casi ilimitadas de escualeno y, por lo tanto, reduce el coste por unidad del escualeno producido. La levadura puede cultivarse utilizando cualquier sistema de fermentación o cultivo conocido. Los sistemas de fermentación de levadura que son adecuados para el proceso de la invención incluyen los sistemas de fermentación continua y en lotes. También puede usarse un sistema de cultivo de dos fases o etapas. La levadura se puede cultivar en condiciones aeróbicas para aumentar la biomasa y, después, se puede cambiar a una fase -al menos parcialmente- anaeróbica para aumentar la producción de escualeno. Un sistema de cultivo de dos fases permite que la acumulación de escualeno esté separada de la fase de crecimiento. El cultivo de levadura en condiciones

anaeróbicas puede usarse para aumentar la producción de escualeno [23-25], y las fuentes de carbono también pueden tener su influencia.

[0025] Puesto que la levadura puede cultivarse en un medio controlado, existe la seguridad de que el cultivo esté libre de agentes que provocan enfermedades, toxinas ambientales y otros contaminantes. Los medios adecuados para cultivar levadura dependerán de las especies de levadura y el sistema de fermentación. Los medios adecuados incluyen los medios ricos o mínimamente ricos, con o sin suplementos. Por ejemplo, la levadura se puede cultivar en MM, EMM, YPD, YPDS, YPG, YPGS, YT, YAPD, YEPD, YPL, YEP, YNBD y SD. Se utilizan medios libres de cualquier producto de origen animal (por ejemplo, suero de leche).

[0026] Debido al control de las condiciones de cultivo, el escualeno purificado a partir de levadura de acuerdo con ell proceso de la presente invención está libre de la contaminación de patógenos, productos metabólicos de patógenos, toxinas y otras sustancias nocivas y, a priori, está libre de agentes que causan TSE (estos agentes no se encuentran en las levaduras). Los métodos para aislar el escualeno de la levadura son muy conocidos en este campo e incluyen métodos como la cromatografía, la extracción de solvente líquido-líquido, la extracción de gas subcrítico [26], la extracción de fluido supercrítico (opcionalmente precedida de liofilización), por ejemplo usando CO_2, y la extracción de solvente cloroformo-metanol [5,23,27]. De manera ideal, el escualeno purificado tiene una pureza (en peso) de más de un 97%, más preferiblemente, de más de un 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99%, e incluso un 100% de pureza. De manera ideal, el escualeno purificado contiene menos de 6153 pg de PCB/dioxina por gramo de escualeno, medido en equivalentes tóxicos (o TEQ, por sus siglas en inglés). Los TEQs permiten representar la toxicidad de una mezcla de PCBs/dioxinas como un solo número. La toxicidad de cada PCB (bifenilo policlorado) se expresa como una fracción (el factor de equivalencia tóxica o TEF, por sus siglas en inglés; WHO 2005) de la toxicidad de la dioxina 2,3,7,8-TCDD (que tiene un valor de referencia de 1). Para calcular la TEQ (o equivalencia tóxica) total de una mezcla, la masa de cada PCB se multiplica por su TEF y, así, el TEQ es la suma de estos valores. Por ejemplo, el escualeno puede tener unos niveles de dioxina/PCB de menos de 5000 pg/g, 4000 pg/g, 3000 pg/g, 2000 pg/g, 1000 pg/g, 500 pg/g, 100 pg/g o 50 pg/g (TEQ).

[0027] Cuando el escualeno se ha purificado a partir de la levadura, se utiliza para la preparación de productos derivados, tal y como se especifica en las reivindicaciones.

Emulsiones de aceite en agua

[0028] Se ha descubierto que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso en vacunas adyuvantes. Las emulsiones preparadas de acuerdo con el proceso de la invención incluyen escualeno y al menos un surfactante, además de un componente acuoso. Las emulsiones pueden contener aceites adicionales. De manera ideal, el (los) aceite(s) y el (los) surfactante(s) son biodegradables (metabolizables) y biocompatibles.

[0029] Pueden usarse combinaciones oleosas de escualeno y tocoferoles. Cuando una composición incluye un tocoferol, puede usarse cualquier tocoferol de entre α, β, γ, δ, ε o ξ, pero se prefieren los α-tocoferoles. El tocoferol puede adoptar diversas formas; por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, como succinato, acetato, nicotinato, etc. También pueden usarse D-α-tocoferol y DL-α-tocoferol. El α-tocoferol preferido es DL-α-tocoferol.

[0030] Lo habitual es un contenido de aceite de un 2-20% (en volumen).

[0031] Generalmente, las gotitas de aceite en la emulsión tienen un diámetro de menos de 5 µm, e incluso pueden tener un diámetro inferior al micrómetro (diámetro submicrónico); de manera conveniente, estos tamaños tan pequeños se obtienen usando un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotitas con un tamaño menor que 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

[0032] Los surfactantes pueden clasificarse por su 'HLB' (las siglas en inglés del 'balance o equilibrio hidrófilo-lipofílico'). Los surfactantes preferidos para el proceso de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente de al menos 15 y, más preferiblemente, de al menos 16. La invención puede usarse con surfactantes que incluyen -pero no se limitan a- los siguientes: los surfactantes de ésteres de sorbitano de polioxietileno (normalmente llamados 'Tweens'), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), que se venden con el nombre comercial DOWFAX™, como los copolímeros de bloque lineales de EO/PO; octoxinoles, que pueden variar en cuanto al número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiílo) repetidos, de manera que el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, como la serie de Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil y oleíl alcoholes (conocidos como surfactantes Brij), como trietileneglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitano (conocidos habitualmente como SPANs), como el trioleato de sorbitano (Span 85) y el monolaurato de sorbitano. Se prefieren los surfactantes no iónicos. El surfactante preferido para su inclusión en la emulsión es el polisorbato 80 (polioxietileno sorbitano monooleato; Tween 80).

[0033] Pueden usarse mezclas de surfactantes; por ejemplo, mezclas de Tween80/Span 85. Una combinación de un éster de sorbitano de polioxietileno y un octoxinol también es adecuada. Otra combinación adecuada contiene laureth 9 y un éster de sorbitano de polioxietileno y/o un octoxinol.

[0034] Las cantidades preferidas de surfactante (porcentaje (%) en peso) son las siguientes: ésteres de sorbitano de polioxietileno (como Tween 80), de un 0,01 a un 2%; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton), de un 0,001 a un 0,1%; éteres de polioxietileno (como laureth 9), de un 0,1 a un 20%. Se prefieren las emulsiones de aceite en agua que contienen escualeno y que contienen el surfactante polisorbato 80. Los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua específicos que pueden obtenerse utilizando escualeno purificado de acuerdo con el proceso de la presente invención incluyen -pero no se limitan a- los siguientes:

· Una emulsión submicrónica (inferior al micrómetro o micra) de escualeno, polisorbato 80 y trioleato de sorbitano. La composición de la emulsión -en volumen- puede ser de alrededor de un 5% de escualeno, alrededor de un 0,5% de polisorbato 80 y alrededor de un 0,5% de Span 85. En peso, estos ratios o proporciones son de un 4,3% de escualeno, un 0,5% de polisorbato 80 y un 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [28-30], tal y como se explica con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 31 y en el capítulo 12 de la referencia 32. De manera ventajosa, la emulsión de MF59 incluye iones de citrato, por ejemplo 10 mM de 'buffer' o tampón de citrato de sodio.

· Una emulsión submicrónica de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener entre un 2 y un 10% de escualeno, entre un 2 y un 10% de tocoferol y entre un 0,3 y un 3% de polisorbato 80 y, preferiblemente, la relación de peso escualeno:tocoferol es ≤1 (por ejemplo, 0,90), ya que esto puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en un ratio o relación de volumen de alrededor de 5:2 o en un ratio o relación de peso de alrededor de 11:5. Una emulsión así puede obtenerse disolviendo Tween 80 en PBS para obtener una solución de un 2%, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de 5 g de DL-α-tocoferol y 5 ml de escualeno y, por último, microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante tiene unas gotitas submicrónicas de aceite; por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm y, preferiblemente, de alrededor de 180 nm. La emulsión también puede incluir un lípido A de monofosforil 3-de-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender -por cada dosis humana- 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [33].

· Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (ver más abajo). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.

· Una emulsión que comprende escualeno, un solvente acuoso, un surfactante de polioxietilén alquil éter hidrófilo y no iónico (por ejemplo, éter de cetoestearil de polioxietileno (12)) y un surfactante no iónico e hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o un éster de mannido, como monoleato de sorbitano o Span 80). Preferiblemente, la emulsión es termorreversible y/o tiene al menos un 90% de gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [34]. La emulsión también puede incluir uno o más de los siguientes: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, como dodecilmaltosida y/o sucrosa); y/o un alquilpoliglucósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [35]. Estas emulsiones pueden liofilizarse.

· Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [36]. La concentración final (en peso) de estos componentes en las vacunas adyuvadas es de un 5% de escualeno, un 4% de poloxámero 105 (poliol plurónico) y un 2% de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).

[0035] Las emulsiones pueden mezclarse con un componente separado que contiene antígenos extemporáneamente, cuando se administran o durante la fabricación de la vacuna. Cuando estos dos componentes son líquidos, el ratio de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero, generalmente, es de aproximadamente 1:1.

[0036] Así, el proceso de la invención puede incluir el paso adicional de combinar la emulsión con un inmunógeno. El proceso también puede incluir el paso adicional de envasar la emulsión o la mezcla de emulsión/inmunógeno. Una emulsión producida de acuerdo con el proceso de la invención puede guardarse o envasarse en un primer recipiente de un kit, de manera que el kit incluye un segundo recipiente que incluye un inmunógeno. Los contenidos de los dos recipientes se pueden mezclar y después se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un humano) o se pueden coadministrar de forma separada.

General

[0037] El término '(que) comprende' abarca '(que) incluye' y '(que) está compuesto de'; por ejemplo, una composición 'que comprende' X puede estar compuesta exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X+Y. El término 'alrededor de' o 'aproximadamente', en relación con un valor numérico *x*, es opcional y

significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

[0038] Se preparan varias cepas o variedades de levaduras mutantes mediante técnicas de ingeniería genética. Las cepas mutantes sobreexpresan o subexpresan las enzimas involucradas en el metabolismo del escualeno. Una de estas levaduras es la variedad ATC1551, que se desvela en la referencia 11 y que puede producir escualeno a hasta un 16% de cdw en condiciones de crecimiento adecuadas.

[0039] Tras el cultivo, las células cultivadas se recogen y se modifican utilizando un molino de microesferas de vidrio. El escualeno se purifica a partir del lisado mediante una extracción de solvente cloroformo-metanol (2:1) o, para mejorar la producción, mediante el método que se desvela en la referencia 5, usando la liofilización y, posteriormente, la extracción de dióxido de carbono supercrítico. El escualeno resultante es muy puro (>95%).

[0040] El escualeno purificado se combina con una mezcla de los surfactantes Tween 80 y Span 85 y con un tampón de citrato para preparar una mezcla que tiene un 5% de escualeno, un 0,5% de Tween 80 y un 0,5% de Span 85 (en volumen). Esta mezcla se microfluidiza para preparar una emulsión que tiene unas gotitas con un tamaño promedio de menos de 500 nm. Esta emulsión, conocida como 'MF59', puede usarse como adyuvante de vacunas.

REFERENCIAS

[0041]

[1] Borucinska & Frasca, (2002), 'J Fish Diseases', 25:287-98.
[2] Bertone et al., (1996), 'J Fish Diseases', 19:429-34.
[3] Briones et al., (1998), 'J Vet Med B', 45:443-5.
[4] Blagovic et al., (2001), 'Food technol. Biotechnol.', 39:175-81.
[5] Bhattacharjee et al, (2003), 'World Journal of Microbiology and Biotechnology', 19: 605-608.
[6] Boeke et al., (1984), 'Mol. Gen. Genet.', 197:345-346
[7] Sherman et al., (1986), 'Methods and Yeast Genetics', Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
[8] Germann et al., (2005), 'J Biol Chem', 280:35904-13.
[9] Veen et al., (2003), 'FEMS Yeast Research', 4:87-95.
[10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T, (1989). 'Molecular cloning: a laboratory manual'. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor.
[11] Patente de EE. UU. 5460949.
[12] Polakowski et al., (1998), 'Appl Microbiol Biotechnol', 49(1):66-71.
[13] Pasrija et al., (2005), 'J Antimicrob Chemother.', 55(6):905-13.
[14] 'Performance of the Third 50 Completed ATP Projects', (2006), NIST SP 950-4, págs. 59-62.
[15] Gachotte et al., (1999), PNAS USA 96:12655-60.
[16] Ness et al., (1998), 'J Bacteriol.', 180(7):1913-9.
[17] Ryder et al., (1985), 'Biochem J.', 230:765-770
[18] Leber et al., (2001), 'European Journal of Biochemistry', 268:914-924.
[19] Sanati et al., (1997), 'Antimicrob Agents Chemother.', 41(11):2492-6.
[20] Kuchta et al., (1997), 'FEMS Microbiol Lett', 150:43-7.
[21] Ryder et al., (1986), 'Antimicrob Agents Chemother', 20:858-60.
[22] Nishikawa et al., (1978), 'Biochim Biophys Acta', 531(1):86-95.
[23] Bhattacharjee et al., (2001), 'World Journal of Microbiology and Biotechnology', 17: 811-816.
[24] Jahnke & Klein, (1983), 'J Bacteroil', 155:488-92.
[25] Valero et al., (2001), 'J Bioscience Bioengin', 92:33-8.
[26] WO94/26683.
[27] Foch et al., (1957) 'Journal of Biological Chemistry', 226: 497-509.
[28] WO90/14837.
[29] Podda & Del Giudice, (2003), 'Expert Rev Vaccines', 2:197-203.
[30] Podda, (2001), 'Vaccine', 19: 2673-2680.
[31] 'Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach', (eds. Powell & Newman), Plenum Press, 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
[32] 'Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols' (Volumen 42 de la serie 'Methods in Molecular Medicine'). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
[33] WO2008/043774.
[34] US-2007/0014805.
[35] US-2007/0191314.
[36] Suli et al., (2004), 'Vaccine', 22(25-26):3464-9.
[37] Spanova et al., (2008), 'Abstract' (sinopsis) P042, 'Chemistry and Physics of Lipids', 154S:S32-S36.
[38] Chang et al., (2008), 'Appl. Microbiol. Biotechnol.', 78:963-972.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos, de manera que comprende los siguientes pasos: (a) purificar escualeno a partir de una levadura que produce o aporta una alta producción de escualeno durante su cultivo, de manera que la levadura se cultiva en un medio controlado que está libre de productos de origen animal; y (b) combinar el escualeno purificado en el paso (a) con un componente acuoso a fin de obtener la emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos.

2. Un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos, de manera que comprende los siguientes pasos: (a) obtener el escualeno que ha sido purificado a partir de una levadura que aporta una alta producción de escualeno durante su cultivo, de manera que la levadura se cultiva en un medio controlado que está libre de productos de origen animal; y (b) combinar el escualeno purificado del paso (a) con un componente acuoso a fin de obtener la emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos.

3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura produce escualeno en un >5% de 'cdw' (o 'peso celular seco').

4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura es una *Saccharomyces*.

5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura es *S. cerevisiae*.

6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura expresa una enzima HMGR truncada que tiene una ubicación citosólica.

7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura es una cepa o variedad modificada que, en relación con una cepa parental no modificada, hiperexpresa la HMGR.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura es una cepa o variedad modificada que, en relación con una cepa parental no modificada, subexpresa la cimosterol-24-metiltransferasa y/o la ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-deshidrogenasa.

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura expresa una oxidoescualeno ciclasa mutante.

10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura tiene una escualeno epoxidasa alterada o interrumpida.

11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura se cultiva en presencia de un factor que aumenta la producción de escualeno durante el cultivo.

12. El proceso de la reivindicación 11, de manera que el factor es alilamina, voriconazol, 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol, tiamina o tiocarbamato.

13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la levadura se cultiva en unas condiciones parcial o totalmente anaeróbicas antes de la purificación del escualeno.

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el escualeno tiene una pureza mayor que un 97% (en peso).

15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la emulsión de aceite en agua tiene gotitas de aceite con un diámetro submicrónico.

16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la emulsión de aceite en agua es una emulsión microfluidizada.

17. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que la emulsión de aceite en agua contiene escualeno y polisorbato 80.

18. Un proceso para preparar una composición inmunogénica para su uso parenteral en humanos, que comprende el paso de preparar una emulsión de aceite en agua -mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17- y mezclar la emulsión con un inmunógeno.

19. Un proceso para preparar un kit para preparar una composición inmunogénica, que incluye preparar una emulsión de aceite en agua para su uso parenteral en humanos mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, guardar o envasar la emulsión en un primer recipiente, y combinar el primer recipiente en forma de kit con un segundo recipiente, de manera que el segundo recipiente contiene un inmunógeno.