

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 108**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2012 PCT/US2012/030298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12129483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 12718460 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2688590**

54 Título: **Nanoemulsiones adyuvantes con fosfolípidos**

30 Prioridad:

24.03.2011 US 201161466974 P

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

05.10.2020

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BRITO, LUIS;
SINGH, MANMOHAN y
O'HAGAN, DEREK**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 785 108 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanoemulsiones adyuvantes con fosfolípidos

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/466,974, presentada el 24 de marzo de 2011, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia para todos los fines.

5 **Campo técnico**

La invención pertenece al campo de las emulsiones que son útiles para administrar agentes farmacológicos anfífilos, tales como inmunopotenciadores.

Técnica antecedente

10 Los agentes farmacológicos pueden requerir formulación para optimizar sus efectos *in vivo*. Por ejemplo, podrían estar encapsulados o adsorbidos. La formulación adecuada puede proporcionar, por ejemplo, una dosificación homogénea, una eficacia mejorada, una mejor farmacocinética o una fabricación más simple. Por ejemplo, la referencia 1 indometacina encapsulada en nanopartículas poliméricas, y la referencia 2 formularon un inmunopotenciador de dipéptido de muramilo lipofílico con microesferas de polilactida.

15 Es un objeto de la invención proporcionar formas adicionales y mejoradas de formular agentes farmacológicos anfífilos para uso *in vivo*.

Divulgación de la invención

20 Los inventores intentaron formular agentes farmacológicos anfífilos (en particular, inmunopotenciadores anfífilos) en emulsiones de aceite en agua, pero las emulsiones podían acomodar solo bajas concentraciones de agente. Se logró una mayor carga al incluir fosfolípidos en las emulsiones. Esta combinación proporciona emulsiones que pueden cargarse con altos niveles de agentes farmacológicos anfífilos.

25 Por lo tanto, la invención proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa que comprende escualeno, un tensioactivo que comprende polisorbato 80, un fosfolípido y un potenciador inmunológico de molécula pequeña lipofílica (SMIP), en la que el fosfolípido es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, el SMIP es palmitoil-Cys(2[R],3-dilauroiloxi-propil)-Abu-D-Glu-NH₂ o una sal del mismo, y el tamaño medio de gotita en la emulsión es inferior a 250 nm, a condición de que el fosfolípido (i) no incluya un residuo de aminoácido y (ii) no sea un fosfolípido catiónico. Estas emulsiones son útiles para formular agentes farmacológicos anfífilos para uso *in vivo*.

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

30 La invención también proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua de la invención, que comprende una etapa de homogeneizar una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en la que el componente oleoso incluye un fosfolípido, y en el que el SMIP se agrega (i) a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización, o (ii) al componente oleoso antes de la homogeneización. La homogeneización puede comprender microfluidización.

35 La invención también proporciona un proceso para preparar una emulsión de aceite en agua de la invención, que comprende una etapa de homogeneizar una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en el que un fosfolípido y un SMIP son añadidos a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización (preferiblemente antes). La homogeneización puede comprender microfluidización.

40 La invención también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar un inmunógeno con una emulsión de la invención.

Agentes farmacológicos anfífilos

45 Las emulsiones de la invención son útiles para formular agentes farmacológicos anfífilos (APA) para uso *in vivo*. Los APA descritos en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, aminas (por ejemplo, amiodarona, clorpromazina, imipramina, trimipramina, prometazina), antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ácido flufenámico), agentes carcinostáticos (por ejemplo, estimulador de zinostatina) e inmunopotenciadores (por ejemplo, lipopéptidos, como los que se describen a continuación). El APA tiene grupos hidrofílicos y lipofílicos. El grupo hidrofílico puede estar cargado (por ejemplo, un carboxilato, sulfato, sulfonato, fosfato, amina) o no cargado (por ejemplo, un alcohol). El grupo lipofílico a menudo será un alquilo de cadena larga que comprende -(CH₂)_n- donde n>4.

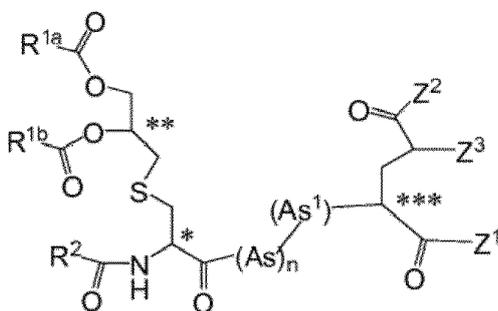
50 Los APA para usar con la invención son potenciadores inmunes de molécula pequeña (SMIP). Los SMIP tienen un peso molecular de menos de 5000 Da (por ejemplo, < 4000 Da, < 3000 Da, < 2000 Da o < 1000 Da). Pueden funcionar como agonistas de uno o más receptores humanos tipo TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9

y/o TLR11. Los SMIP pueden funcionar como agonistas de los receptores de lectina de tipo C (CLR). Los SMIP pueden funcionar como agonistas de la identificación del CD.

Los agonistas anfífilos de TLR1 incluyen lipopéptidos. Los agonistas anfífilos de TLR2 incluyen glucolípidos y ácido lipoteicoico, y también lipopéptidos (por ejemplo, que comprenden ≥ 1 residuos de ácidos grasos y ≥ 2 residuos de aminoácidos). Los agonistas anfífilos de múltiples receptores TLR incluyen Pam3Cys (tripalmitoil-S-gliceril cisteína; agoniza TLR1 y TLR2) y Pam2Cys (dipalmitoil-S-gliceril cisteína; agoniza TLR2 y TLR6) y sus derivados agonistas TLR. Los agonistas de CLR anfífilos incluyen, entre otros, trehalosa-6,6-dimicolato (TDM) y su análogo sintético D-(+)-trehalosa 6,6'-dibehenato, así como lipoarabinomanano y MAN-lipoarabinomanano. Los agonistas de CD1d anfífilos incluyen, pero no se limitan a, α -galactosilceramida y sus derivados, incluidos sus análogos aniónicos anfífilos descritos en la referencia 3.

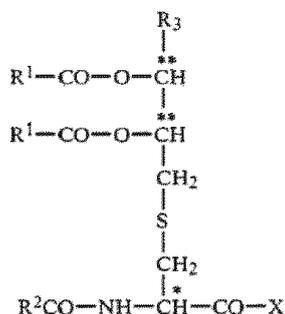
Las SMIP anfífilas específicas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, compuestos de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III).

La fórmula (I) es:



en la que: el centro quiral marcado * y el marcado *** están ambos en la configuración R; el centro quiral marcado ** está en la configuración R o S; cada R^{1a} y R^{1b} es independientemente un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene 7-21 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por funciones oxígeno, o uno de R^{1a} y R^{1b} , pero no ambos, es H; R^2 es un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene 1-21 átomos de carbono y está opcionalmente sustituido por funciones oxígeno; n es 0 o 1; (As) representa $-O-Kw-CO-$ o $-NH-Kw-CO-$, donde Kw es un grupo hidrocarburo alifático que tiene 1-12 átomos de carbono; As^1 es un D- o L-alfa-aminoácido; Z^1 y Z^2 representan cada uno independientemente $-OH$, o el radical N-terminal de un aminoácido D- o L-alfa, el radical N-terminal de un aminoácido-(alcano inferior)-sulfónico, o el radical N-terminal de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos aminocarboxílicos D- y L-alfa y ácidos amino-alquil-sulfónicos inferiores; y Z^3 es H o $-CO-Z^4$; Z^4 es $-OH$ o el radical N-terminal de un aminoácido D- o L-alfa, el radical N-terminal de un aminoácido-(alcano inferior)-sulfónico, o el radical N-terminal de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados entre los ácidos D y L-alfa-aminocarboxílicos y los ácidos amino-alkilsulfónicos inferiores; o un éster o amida formado a partir del ácido carboxílico de tales compuestos y sales de los mismos.

La fórmula (II) es:

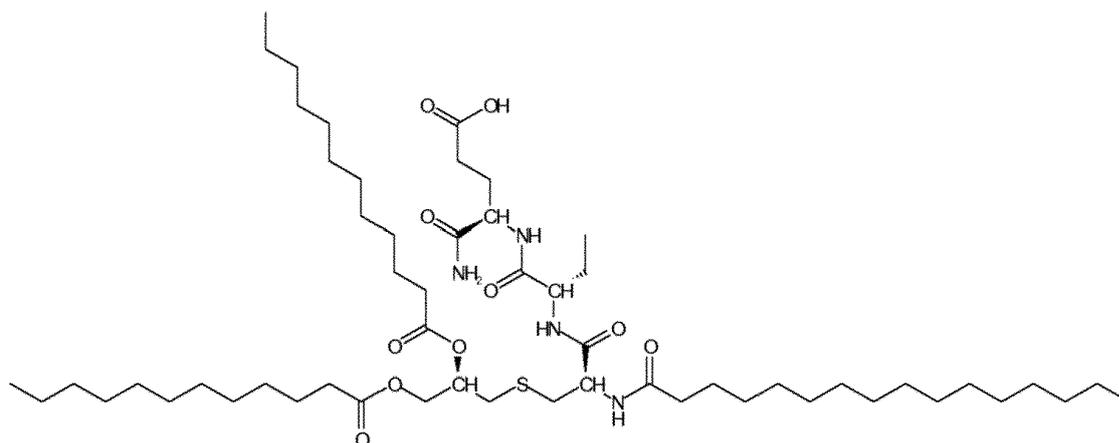


en la que: cada uno de R^1 y R^2 por separado representa un radical hidrocarburo alifático o cicloalifático saturado o insaturado, alifático o mixto que tiene de 8 a 30 (preferiblemente 11 a 21) átomos de carbono que opcionalmente también está sustituido por funciones oxígeno; R^3 representa hidrógeno o el radical $R^1-CO-O-CH_2-$; y X representa un aminoácido unido por un enlace peptídico y que tiene un grupo carboxilo libre, esterificado o amidado, o una secuencia de aminoácidos de 2 a 10 aminoácidos cuyo grupo carboxilo terminal está en forma libre, esterificada o amidada; el centro quiral marcado * está en forma de R; cada centro quiral marcado con ** puede estar en forma R o S. La secuencia de aminoácidos puede comprender un D-aminoácido, por ejemplo, ácido D-glutámico (D-Glu) o ácido D-gamma-carboxiglutámico (D-Gla).

Amidas adecuadas de fórmula (I) incluyen -NH₂ y NH(alquilo C₁-C₈, preferiblemente C₁-C₆ o C₁ a C₄), y ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo (ésteres de alquilo C₁-C₈, preferiblemente C₁-C₆ o C₁ a C₄).

Tales compuestos se describen en la referencia 4. Otro lipopéptido adecuado es "LP40" como se describe en la referencia 5. Véanse también las referencias 6 y 7.

- 5 El agonista del lipopéptido TLR2, palmitoil-Cys(2[R],3-dilauroiloxipropil)-Abu-D-Glu-NH₂, Cys es un residuo de cisteína, Abu es un residuo de ácido aminobutírico y Glu es un residuo de ácido glutámico: véase el ejemplo 16 de la referencia 4 (compuesto 'L' en el presente documento, de fórmula III):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usa en la emulsión de aceite en agua de la invención.

- 10 Las emulsiones de la invención pueden incluir solo un APA o pueden incluir múltiples APA.

La concentración de APA en una emulsión de la invención puede variar en un amplio intervalo, por ejemplo, entre 10 µg/ml a 50 mg/ml, entre 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, entre 0,1 mg/ml a 2 mg/ml, o entre 0,5 mg/ml a 2 mg/ml.

Fosfolípidos

- 15 Las emulsiones de la invención incluyen un fosfolípido. Las clases adecuadas de fosfolípidos descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerol, etc. Los fosfolípidos útiles se enumeran en la Tabla 1, incluidos los fosfolípidos zwitteriónicos y los fosfolípidos aniónicos (cuando se miden a pH 7). El fosfolípido de la invención no es un fosfolípido catiónico (a pH 7), o si se incluye un fosfolípido catiónico, entonces preferiblemente no es el único fosfolípido en la emulsión, por ejemplo, la emulsión también debe incluir un fosfolípido neutro, zwitteriónico o aniónico.

- 20 El fosfolípido de la invención no incluye un residuo de aminoácido (aunque el APA puede incluir un residuo de aminoácido).

Los dos fosfolípidos de la invención son DSPC y DOPC, pero la persona experta puede seleccionar otros fosfolípidos adecuados según sus necesidades y los otros componentes de la emulsión. El fosfolípido se puede mezclar con un aceite para formar un componente oleoso que luego se puede usar para la formación de una emulsión.

- 25 Emulsiones de aceite en agua

Las emulsiones de la invención comprenden gotitas de aceite en una fase acuosa a granel. Las emulsiones incluyen un tensioactivo y esto puede facilitar la formación y estabilización de la emulsión.

- 30 La emulsión puede comprender uno o más aceites. Los aceites adecuados incluyen los de, por ejemplo, un animal (como pescado) o una fuente vegetal. El aceite es idealmente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Se puede usar el aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido del frijol jojoba. Los aceites de semilla 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 trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares. Los ésteres de ácido graso de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, 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 usarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de origen animal son bien conocidos en la técnica.
- 40

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena como el espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan terpenoides. También se puede usar el escualano, el análogo saturado del escualeno. Los aceites de pescado, que incluyen escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren los α -tocóferoles. Se pueden usar D- α -tocóferol y DL- α -tocóferol. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol. Se puede usar una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- α -tocóferol).

Las emulsiones de la invención comprenden escualeno, un terpenoide ramificado, insaturado ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C(=CHCH_2CH_2C(CH_3))_2=CHCH_2-]_2$; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano; CAS RN 7683-64-9).

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

El componente acuoso de la emulsión puede ser agua corriente (por ejemplo, agua para inyección) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, como las sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Se prefiere una fase acuosa tamponada, y los tampones se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

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

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

Se pueden incluir mezclas de tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas Tween 80/Span 85, o mezclas Tween 80/Triton-X100. También es adecuada una combinación de un éster de sorbitán de polioxietileno tal como monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilensorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor de HLB en el rango de 10-20 (por ejemplo, polisorbato 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor de HLB en el rango de 1-10 (por ejemplo, trioleato de sorbitán, con un HLB de 1,8).

Además de los componentes oleosos, acuosos y tensioactivos, una emulsión puede incluir otros componentes. Por ejemplo, una emulsión puede incluir colesterol.

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

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre 0,001 % y 8 %. Por ejemplo: ésteres de polioxietilensorbitán (como el polisorbato 80) 0,2 a 4 %, en particular entre 0,4-0,6 %, entre 0,45-0,55 %, aproximadamente 0,5 % o entre 1,5-2 %, entre 1,8-2,2 %, entre 1,9-2,1 %, aproximadamente 2 %, o 0,85-0,95 %, o aproximadamente 1 %; ésteres de sorbitán (tales como trioleato de sorbitán) 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 8 %, preferiblemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %.

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo, y su proporción, pueden variarse dentro de amplios límites mientras se sigue formando una emulsión. Una persona experta puede variar fácilmente las proporciones relativas de los

componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para aceite y tensioactivo (exceso de aceite). Las cantidades de estos diversos componentes pueden seleccionarse para proporcionar una formulación útil del APA relevante, por ejemplo, para asegurar que haya suficiente aceite para disolver la dosis deseada de APA, etc., mientras se proporciona una emulsión estable con alta carga de APA.

- 5 Un parámetro importante para asegurar la actividad inmunoestimuladora de una emulsión, particularmente en animales grandes, es el tamaño de gotita de aceite (diámetro). Las emulsiones más efectivas tienen un tamaño de gotita en el rango submicrométrico. Adecuadamente, los tamaños de gotita estarán en el rango de 50-750 nm. Lo más útil es que el tamaño promedio de las gotitas es inferior a 250 nm, por ejemplo, menos de 200 nm, menos de 150 nm. El tamaño promedio de gotita es útil en el rango de 80-180 nm. Idealmente, al menos el 80 % (en número) de las gotitas de aceite de la emulsión tienen menos de 250 nm de diámetro, y preferiblemente al menos el 90 %. Hay disponibles comercialmente aparatos para determinar el tamaño promedio de gotita en una emulsión y la distribución del tamaño. Estos suelen utilizar las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o detección óptica de partículas individuales, por ejemplo, las series de instrumentos Accusizer™ y Nicomp™ disponibles de Particle Sizing Systems (Santa Bárbara, Estados Unidos), o los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido), o los instrumentos de análisis de distribución de tamaño de partículas de Horiba (Kyoto, Japón).

Idealmente, la distribución de tamaño de gotitas (por número) tiene solo un máximo, es decir, hay una sola población de gotitas distribuidas alrededor de un promedio (modo), en lugar de tener dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de < 0,4 por ejemplo, 0,3, 0,2 o menos.

- 20 Se pueden obtener emulsiones adecuadas con gotitas submicrométricas y una distribución de tamaño estrecha mediante el uso de microfluidización. Esta técnica reduce el tamaño promedio de las gotitas de aceite impulsando corrientes de componentes de entrada a través de canales geoméricamente fijos a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes contactan las paredes del canal, las paredes de la cámara y entre sí. Los resultados de las fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación causan una reducción en el tamaño de gotita. Se pueden realizar pasos repetidos de microfluidización hasta que se logre una emulsión con un tamaño de gotita promedio y distribución deseados.

- 25 Como alternativa a la microfluidización, se pueden usar procedimientos térmicos para causar la inversión de fase, como se describe en la referencia 8. Estos procedimientos también pueden proporcionar una emulsión submicrométrica con una distribución de tamaño de partícula ajustada.

- 30 Las emulsiones preferidas pueden esterilizarse por filtración, es decir, sus gotitas pueden pasar a través de un filtro de 220 nm. Además de proporcionar una esterilización, este procedimiento también elimina las gotitas grandes en la emulsión.

Las emulsiones preferidas son emulsiones adyuvantes, es decir, pueden proporcionar un efecto inmunoestimulador *in vivo* en un mamífero incluso si se administran sin el agente anfilílico. Emulsiones adyuvantes conocidas, en las que se puede incorporar un agente anfilílico, incluyen:

- 35 • 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 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.

- 40 • Emulsiones que comprenden escualeno, un α -tocoferol (idealmente DL- α -tocoferol) y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener (en peso) de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de α -tocoferol y de 0,3 a 3 % de polisorbato 80 por ejemplo, 4,3 % de escualeno, 4,7 % de α -tocoferol, 1,9 % de polisorbato 80. La relación en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90), ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden tener una relación de volumen presente de aproximadamente 5:2, o una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una de estas emulsiones se puede hacer disolviendo el polisorbato 80 en PBS para dar 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), y luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrónicas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente aproximadamente 180 nm.

- 50 • Una emulsión que comprende escualeno, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación 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 deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La emulsión también puede incluir una saponina, como QS21. La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.

- 55 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo polioxietileno alquil éter (por ejemplo, cetostearyl éter polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o un éster de manuro, como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente

termorreversible y/o tiene al menos el 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [8]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. También puede incluir un agonista TLR4, como uno cuya estructura química no incluya un anillo de azúcar [9]. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.

5 Immunógenos

Las emulsiones de la invención son útiles para la administración conjunta con inmunógenos, proporcionando de este modo una inmunogenicidad mejorada. Así, una composición inmunogénica de la invención puede comprender una emulsión que contiene SMIP de la invención y un inmunógeno.

10 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmune contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. Como alternativa a provocar una respuesta inmune contra un patógeno, el inmunógeno puede ser un autoantígeno para inmunoterapia, por ejemplo, un antígeno de cáncer.

Los inmunógenos bacterianos pueden comprender proteínas, sacáridos y/o lipopolisacáridos. Pueden ser bacterias vivas, bacterias inactivadas o subunidades bacterianas. Los ejemplos de inmunógenos útiles provocan una respuesta inmune contra:

15 *Neisseria meningitidis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana y/o sacáridos capsulares. Los sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 y/o Y son útiles. Las adhesinas, los autotransportadores, las toxinas, las proteínas de adquisición de hierro y las proteínas de unión al factor H son inmunógenos de proteínas de membrana útiles. Una vacuna preferida incluye los antígenos proteicos descritos en la referencia 10.

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

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas y/o sacáridos capsulares. Las proteínas útiles se describen en las referencias 11 y 12.

25 *Moraxella catarrhalis*.

Bordetella pertussis: los inmunógenos útiles para la tosferina incluyen, pero no se limitan a, toxina o toxoide pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.

Staphylococcus aureus: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas y/o sacáridos capsulares. Por ejemplo, se pueden usar sacáridos capsulares tipo 5 y/o tipo 8.

30 *Clostridium tetani*: el inmunógeno típico es el toxoide tetánico.

Cornynebacterium diphtheriae: el inmunógeno típico es el toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae tipo B: el inmunógeno típico de Hib es su sacárido capsular, PRP.

Pseudomonas aeruginosa

35 *Streptococcus agalactiae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas y/o sacáridos capsulares. Las proteínas útiles se describen en la referencia 13. Se pueden usar sacáridos capsulares de uno o más de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

Chlamydia trachomatis: los inmunógenos útiles incluyen, entre otros, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, OmpH-like, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, como se describe en la referencia 14. LcrE [15] y HtrA [16] son dos inmunógenos preferidos.

40 *Chlamydia pneumoniae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, las proteínas descritas en la referencia 17.

Helicobacter pylori: los inmunógenos útiles incluyen, entre otros, CagA, VacA, NAP y/o ureasa [18].

45 *Escherichia coli*: los inmunógenos útiles incluyen, entre otros, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* adherida difusamente (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas de ExPEC incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos UPEC útiles se describen en las referencias 19 y 20. Los inmunógenos MNEC útiles se describen en la referencia 21. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD [22].

Bacillus Anthracis

Yersinia pestis: los inmunógenos útiles incluyen, entre otros, los descritos en las referencias 23 y 24.

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

Cuando el inmunógeno es un sacárido, generalmente se conjugará con una proteína transportadora. Por ejemplo, las vacunas conjugadas de neumococo, Hib, *S. aureus*, *S. typhi* y sacárido meningocócico son conocidas en la técnica.

5 Las proteínas transportadoras son típicamente una toxina bacteriana o un toxoide (por ejemplo, un toxoide de la difteria o el tétanos, o una forma mutante no tóxica de los mismos, por ejemplo, CRM197 [25]), pero se pueden usar otros vehículos. Por ejemplo, las proteínas transportadoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a: complejo de proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* [26], péptidos sintéticos [27,28], proteínas de choque térmico [29,30], proteínas de tosferina [31,32], citoquinas [33], linfoquinas [33], hormonas [33], factores de crecimiento [33], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4⁺ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [34] como N19 [35], proteína D de *H. influenzae* [36-38], proteínas de absorción de hierro [39], toxina A o B de *C. difficile* [40], exoproteína recombinante de *P. aeruginosa* A (rEPA) [41], neumolisina [42] o sus derivados no tóxicos [43], proteína de superficie neumocócica PspA [44], etc.

15 Los inmunógenos virales pueden comprender proteínas. Pueden ser virus vivos, virus inactivados o subunidades virales. Los ejemplos de inmunógenos útiles provocan una respuesta inmune contra:

Ortomixovirus: los inmunógenos útiles pueden ser de un virus de influenza A, B o C. Se puede usar un virus atenuado vivo o un virus inactivado, que incluye un virus inactivado completo, un virus dividido o glucoproteínas de la superficie viral (incluida la hemaglutinina). La vacuna puede ser monovalente, bivalente, trivalente, tetravalente o más.

20 Virus *Paramyxoviridae*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de neumovirus (por ejemplo, virus sincicial respiratorio), paramixovirus (por ejemplo, virus de la parainfluenza), metapneumovirus y morbilivirus (por ejemplo, sarampión).

Poxviridae: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados del *Orthopoxvirus* como *Variola vera*, incluidos, entre otros, *Variola major* y *Variola minor*.

25 *Picornavirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de picornavirus, como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. El enterovirus puede ser un poliovirus, por ejemplo, un poliovirus tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3.

30 *Bunyavirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un virus *Orthobunya*, como el virus de la encefalitis de California, un *Phlebovirus*, como el virus de la fiebre del Valle del Rift, o un *Nairovirus*, como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

Heparnavirus: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un heparnavirus, como el virus de la hepatitis A (VHA).

Togavirus: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un Togavirus, como un Rubivirus, un Alphavirus o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubéola.

35 *Flavivirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un flavivirus, como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), el virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, virus del bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo occidental, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, virus de la encefalitis de Powassan.

40 *Pestivirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un Pestivirus, como la diarrea viral bovina (BVDV), la peste porcina clásica (CSFV) o la enfermedad de Border (BDV).

Hepadnavirus: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un hepadnavirus, como el virus de la hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

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

45 *Rabdovirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un rabdovirus, como el Lyssavirus (virus de la rabia) y el Vesiculovirus (VSV).

Caliciviridae: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de Caliciviridae, como el virus Norwalk y los virus similares a Norwalk, como el virus Hawaii y el virus de Snow Mountain.

50 *Coronavirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un coronavirus SARS, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). Los antígenos de coronavirus pueden comprender proteína espiga.

Retrovirus: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un Oncovirus, un Lentivirus o un Spumavirus.

Reovirus: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.

5 *Parvovirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados del parvovirus B19.

Virus del herpes: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de un virus del herpes humano, como, a modo de ejemplo solamente, virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (HHV6), virus del herpes humano 7 (HHV7) y virus del herpes humano 8 (HHV8).

10 *Papovavirus*: los inmunógenos virales incluyen, entre otros, los derivados de virus del papiloma y virus del polioma. El virus del papiloma puede ser de serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65 por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

Adenovirus: los inmunógenos virales incluyen los derivados del adenovirus serotipo 36 (Ad-36).

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

Formación de emulsión

35 Las emulsiones de la invención se pueden hacer por varios procedimientos. Como se mencionó anteriormente, la microfluidización o inversión de fase se puede usar para proporcionar emulsiones con pequeñas gotitas de aceite. Idealmente, los componentes de la emulsión se combinan antes de usar estas técnicas, por ejemplo, de modo que todos los componentes se microfluidicen juntos. Sin embargo, en otras realizaciones, se puede formar una emulsión a partir de los componentes acuosos, tensioactivos y oleosos, y luego se pueden agregar el APA y el fosfolípido. Por
40 lo general, el APA y el fosfolípido se agregan al aceite, y esta mezcla oleosa se combina con el componente acuoso antes de la microfluidización, y el tensioactivo se agrega como un tercer componente o como parte del componente aceitoso o acuoso. También se pueden usar otros órdenes de mezcla. En general, se agregará un inmunógeno después de que se forme una emulsión, por ejemplo, después de la microfluidización.

45 Un procedimiento para formar la emulsión comprende combinar componentes acuosos, oleosos y tensioactivos con una solución orgánica del APA, por ejemplo, en un solvente orgánico volátil tal como diclorometano o cloruro de metileno. El disolvente volátil de la mezcla se puede evaporar, por ejemplo, después se puede homogeneizar la mezcla. Después de la evaporación, la mezcla homogeneizada puede microfluidizarse.

Composiciones y productos farmacéuticos

50 Las emulsiones y las composiciones inmunogénicas de la invención son para uso *in vivo* (en humanos o animales) y, por lo tanto, deben incluir solo componentes farmacéuticamente aceptables. Componentes farmacéuticos útiles, tales como vehículo(s) y/o excipiente(s), se discuten en la referencia 45.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxtetanol. Se prefieren las composiciones sin mercurio, y se pueden preparar vacunas sin conservantes.

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

Las composiciones farmacéuticas tienen típicamente un pH entre 5,0 y 9,5, p. entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles.

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

5 Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente sin gluten.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en forma de dosis unitaria. Una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml.

Las composiciones pueden prepararse como inyectables, por ejemplo, para inyección intramuscular

Métodos de tratamiento y usos médicos

10 La invención describe un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica de la invención. La respuesta inmune es preferiblemente protectora y preferiblemente implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

15 La invención también proporciona una emulsión o composición inmunogénica de la invención para su uso en el aumento de una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también describe el uso de una emulsión o composición inmunogénica de la invención en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un mamífero.

20 Mediante el aumento de una respuesta inmune en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, el mamífero puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o virales como se discutió anteriormente.

La invención también describe un dispositivo de administración que contiene una composición inmunogénica de la invención. Este dispositivo puede usarse para administrar la composición a un sujeto mamífero.

25 El mamífero es preferiblemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; donde la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferiblemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc.

30 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. El suministro directo se puede lograr mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o por vía mucosa, como por administración por vía rectal, oral (por ejemplo, tableta, aspersión), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra mucosa.

La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, preferiblemente para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada.

35 Preferiblemente, la inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada se refleja en una respuesta inmune potenciada TH1 y/o TH2. Preferiblemente, la respuesta inmune mejorada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

40 La dosificación puede ser por un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Se pueden usar dosis múltiples en un programa de vacunación primaria y/o en un programa de vacunación de refuerzo. En un programa de dosis múltiples, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes rutas, por ejemplo, un refuerzo primario parenteral y de la mucosa, un refuerzo primario de la mucosa y un refuerzo parenteral, etc. Por lo general, se administrarán dosis múltiples con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). Se pueden administrar dosis múltiples aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa con frecuencia en el World Health Organisation's Expanded Program on Immunisation ("EPI"). Alternativamente, se administran dos dosis primarias separadas por dos meses, por ejemplo, aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. Se pueden administrar tres dosis primarias separadas por dos meses, por ejemplo, aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

5 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Por lo tanto, un paciente humano puede tener menos de 1 año, menos de 5 años, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años o al menos 55 años. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años y preferiblemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, servicio militar y personal militar, mujeres embarazadas, pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden usarse de manera más general en una población.

General

10 El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que 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.

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

15 A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por lo tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Donde hay tres componentes, entonces dos componentes se pueden combinar entre sí, y luego la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

20 Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que están libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), y en particular libres de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces dicho compuesto puede reemplazarse alternativamente por un profármaco adecuado.

25 **Modos para realizar la invención**

La referencia 6 usa agonistas anfífilos de TLR2 para estimular las respuestas inmunes. Aunque estos compuestos tienen colas lipofílicas, no son solubles en aceite a concentraciones que serían deseables para uso *in vivo*. Por ejemplo, la adición del compuesto 'L' a MF59 (emulsión "ANE04" o "ANE25") a una concentración de 0,5 mg/ml dio una emulsión con solo un 50 % de carga.

30 La capacidad de la emulsión para solubilizar el agonista se aumentó al 100 % añadiendo DSPC a la emulsión. DSPC es un fosfolípido C18 y se incorporó convenientemente mezclándolo con escualeno antes de la microfluidización de los componentes de la emulsión. Aunque se aumentó la carga de la emulsión, su tamaño de gotita permaneció constante, lo que indica que la adición de fosfolípidos no tuvo un impacto negativo en su estabilidad.

35 La carga de 'L' en las emulsiones ANE29, ANE30 y ANE26 fue la siguiente, con una monodispersión simple de 'L' incluida para comparación:

Formulación	Contenido esperado	Contenido medido	% de diferencia
Monodispersión	1 mg/ml	1,02 mg/ml	+2 %
ANE29	0,2	0,10	-50 %

(continuación)

Formulación	Contenido esperado	Contenido medido	% de diferencia
ANE30	0,2	0,21	+7 %
ANE26	0,5	0,44	-13 %

Por lo tanto, la baja carga observada con ANE29 (similar a ANE04 y ANE25) se abordó agregando fosfolípidos.

Detalles de emulsión y caracterización

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

ANE04	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg 'L'
ANE25	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg 'L'
ANE26	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg 'L', 50 mg DSPC
ANE27	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg 'L', 100 mg DSPC
ANE28	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 10 mg 'L', 100 mg PC
ANE29	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 4 mg 'L'
ANE30	4,3 % esc, 0,5 % S85, 0,5 % T80, 4mg 'L', 50 mg DSPC

T80 = Tween 80; S85 = Span 85; PC = fosfatidilcolina de huevo; esc = escualeno

10 Estas emulsiones se prepararon generalmente como sigue. Los componentes lipofílicos (escualeno, Span 85, fosfolípidos) se combinaron en un vaso de precipitados. 'L' se sometió a sonicación en triclorometano para formar una suspensión de 'L' y luego se añadió esta suspensión al vaso de precipitados. La fase oleosa se combinó luego con la fase acuosa y se homogeneizó inmediatamente durante 2 minutos usando un homogeneizador IKA T25 a 24K RPM para proporcionar una alimentación homogénea. Las emulsiones se emulsionaron inmediatamente y luego se dejaron reposar a temperatura ambiente en una placa de agitación durante 2-3 horas después de la homogeneización primaria en una campana extractora. Las emulsiones primarias se pasaron de tres a cinco veces a través de un homogenizador Microfluidizer M110S con un serpentín de enfriamiento de baño de hielo a una presión de homogeneización de aproximadamente 15k-20k PSI (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras discontinuas de 20 ml se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4°C, y se almacenaron alícuotas de 5 ml a temperatura ambiente para evaluar la estabilidad.

20 El tamaño de partícula de las emulsiones se midió usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments,) y un analizador de distribución de partículas LA-920 (Horiba), de acuerdo con las directrices del fabricante. Las partículas se diluyeron en agua desionizada. El instrumento Horiba proporciona valores d10, d50 y d90, es decir, los diámetros que dividen las gotitas de la muestra en 10 %, 50 % y 90 % (respectivamente) en masa. Los resultados fueron los siguientes:

	ZETASIZER		HORIBA				
	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersidad	d10 (µm)	d50 (µm)	d90 (µm)	Mediana (µm)	Media (µm)
ANE25	118	0,13	0,24	0,45	1,29	0,45	0,63
ANE26	119	0,11	0,11	0,15	0,21	0,15	0,16

(continuación)

	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersidad	d10 (µm)	d50 (µm)	d90 (µm)	Mediana (µm)	Media (µm)
ANE27	124	0,12	0,11	0,15	0,21	0,15	0,15
ANE28	98	0,09	0,10	0,13	0,18	0,13	0,14
ANE29	129	0,10	0,10	0,14	0,21	0,14	0,15
ANE30	123	0,08	0,10	0,14	0,19	0,14	0,15

Tabla 1: Fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA-NA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DEPC	1,2-Erucoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG-NA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3 [fosfatidil-rac-(1-glicerol...)](sal de sodio)
DLPG-NH4	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(sal de sodio)
DMPA-NA	1,2-diimiristoil-sn-glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG-NA	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPG-NH4	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPG-NH4/NA	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]

ES 2 785 108 T3

(continuación)

DMPS-NA	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina(sal de sodio)
DOPA-NA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DOPS-NA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina(sal de sodio)
DPPA-NA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG-NA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DPPG-NH4	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DPPS-NA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina(sal de sodio)
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA-NA	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato(sal de sodio)
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-glicerina-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG-NA	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DSPG-NH4	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DSPS-NA	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(sal de sodio)
EPC	Fosfatidilcolina de huevo
HEPC	Fosfatidilcolina de huevo hidrogenada
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
LYSOPC MIRÍSTICO	1-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICO	1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICO	1-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

ES 2 785 108 T3

Esfingomielina de leche MPPC	1-miristoilo, 2-palmitoil-sn-glicero 3-fosfatidilcolina
MSPC	1-miristoilo, 2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PMPG	1-palmitoil, 2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)...](Sal de sodio)
PSPC	1-palmitoil, 2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-estearoilo, 2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-estearoilo, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-estearoilo, 2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

Referencias

- [1] Bodmeier & Chen (1990) J Controlled Release 12:223-33.
- [2] Tabata & Ikada (1980) Pharm Res 6:296-301.
- [3] Faroux-Corlay et al. (2001) J Med Chem 44:2188-203.
- 5 [4] US-4,666,886.
- [5] Akdis et al. (2003) Eur J Immunol 33:2717-26.
- [6] WO2010/009277.
- [7] US-5,342,977.
- [8] US-2007/0014805.
- 10 [9] WO2007/080308.
- [10] Giuliani et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(29):10834-9.
- [11] WO02/34771.
- [12] WO2005/032582.
- [13] WO02/34771.
- 15 [14] WO2005/002619.
- [15] WO2006/138004.
- [16] WO2009/109860.
- [17] WO02/02606.
- [18] WO03/018054.
- 20 [19] WO2006/091517.
- [20] WO2008/020330.
- [21] WO2006/089264.
- [22] WO2009/104092.

- [23] WO2009/031043.
- [24] WO2007/049155.
- [25] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002).
- [26] EP-A-0372501.
- 5 [27] EP-A-0378881.
- [28] EP-A-0427347.
- [29] WO93/17712.
- [30] WO94/03208.
- [31] WO98/58668.
- 10 [32] EP-A-0471177.
- [33] WO91/01146.
- [34] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [35] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- [36] EP-A-0594610.
- 15 [37] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [38] WO00/56360.
- [39] WO01/72337.
- [40] WO00/61761.
- [41] WO00/33882
- 20 [42] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [43] Michon et al. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- [44] WO02/091998.
- [45] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472)

REIVINDICACIONES

1. Una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa que comprende escualeno, un tensioactivo que comprende polisorbato 80, un fosfolípido y un potenciador inmunológico de molécula pequeña lipofílica (SMIP), en la que el fosfolípido es 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina o 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina, el SMIP es palmitoil-Cys(2[R],3-dilauroiloxi-propil)-Abu-D-Glu-NH₂ o un sal del mismo, y el tamaño medio de gotita en la emulsión es inferior a 250 nm, a condición de que (i) el fosfolípido no incluya un residuo de aminoácido y (ii) el fosfolípido no sea un fosfolípido catiónico.
2. La emulsión de cualquier reivindicación precedente, en la que la fase acuosa comprende un tampón.
3. La emulsión de cualquier reivindicación precedente, que comprende 2-20 % (en volumen) de aceite y 0,001 %-8 % (en peso) de tensioactivo.
4. La emulsión de cualquier reivindicación precedente, en la que la relación en peso de aceite a tensioactivo está entre 4:1 y 5:1.
5. Una composición inmunogénica que comprende (a) la emulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y (b) un inmunógeno.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el inmunógeno provoca una respuesta inmune *in vivo* contra una bacteria o un virus.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que la bacteria es *Neisseria meningitidis*.
8. La composición de la reivindicación 6, en la que el virus es un virus de la gripe, un virus sincicial respiratorio o un citomegalovirus.
9. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar un inmunógeno con la emulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. La emulsión de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso en elevar una respuesta inmune en un mamífero.
11. Un procedimiento de preparación de la emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una etapa de homogeneizar una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en el que un fosfolípido y un SMIP son añadidos a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización.
12. Un procedimiento de preparación de la emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una etapa de homogeneizar una mezcla que comprende un componente acuoso, un componente oleoso y un componente tensioactivo, en el que el componente oleoso incluye un fosfolípido, y en el que el SMIP se agrega (i) a la mezcla antes, durante o después de la homogeneización, o (ii) al componente oleoso antes de la homogeneización.
13. Un kit que comprende en recipientes separados (A) una emulsión de aceite en agua que comprende una fase acuosa, una fase oleosa que comprende escualeno, un tensioactivo que comprende polisorbato 80 y un fosfolípido, en el que el fosfolípido es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, y el tamaño promedio de gotita en la emulsión es inferior a 250 nm, a condición de que (i) el fosfolípido no incluya un residuo de aminoácido y (ii) el fosfolípido no sea un fosfolípido catiónico, y (B) un potenciador inmunitario de molécula pequeña lipofílica (SMIP), en el que el SMIP es palmitoil-Cys(2[R],3-dilauroiloxipropil)-Abu-D-Glu-NH₂ o una sal del mismo.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que el componente del kit (A) o (B) también incluye un inmunógeno.