



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610633-1 A2**

(22) Data de Depósito: 13/04/2006  
(43) Data da Publicação: 13/07/2010  
(RPI 2062)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/02  
A61K 39/12

(54) Título: **FORMULAÇÕES DE VACINA**

(30) Prioridade Unionista: 15/04/2005 US 11/107,000

(73) Titular(es): Merial Limited

(72) Inventor(es): Alexis Guy Andre Parisot, Catherine Charreyre, Claude Jean Marie Roulet, Stephanie Marie-Catherine Desgouilles-Blechet

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006013936 de 13/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/113373 de 26/10/2006

(57) **Resumo:** Patente de Invenção: FORMULAÇÕES DE VACINA. A presente invenção refere-se a emulsões de óleo em água, seu uso como adjuvantes e composições farmacêuticas, imunológicas ou de vacina que possam compreendê-las. Em uma modalidade, a emulsão de óleo em água (O/A) pode compreender uma solução aquosa contendo um imuno-gênico, um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico e um surfactante hidrofílico não iônico. Em outra modalidade, a emulsão de óleo em água (O/A) pode compreender uma solução aquosa contendo um imuno-gênico, um surfactante lipofílico não iônico, um óleo mineral e um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico. A presente invenção também engloba um método de preparação de uma composição de vacina usando o adjuvante da presente invenção, a composição de vacina assim obtida e métodos de uso.

Pet 020080002952  
Pi 0610633-1

Relatório Descritivo da patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DE VACINA**".

**PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS**

Este pedido de patente reivindica a prioridade do Pedido de Patente Norte-americano nº de série 11/107.000, depositado em 15 de abril de 2005, cujo conteúdo é aqui expressamente incorporado por referência.

**INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA**

Os pedidos de patente precedentes, e todos os documentos aí citados ou durante seu processamento ("documentos citados no pedido de patente") e todos os documentos citados ou referenciados nos documentos citados no pedido de patente, e todos os documentos aqui citados ou referenciados ("documentos aqui citados"), e todos os documentos citados ou referenciados nos documentos aqui citados, juntamente com quaisquer instruções, descrições, especificações de produto e folhas de produto do fabricante para quaisquer produtos aqui mencionados ou em qualquer documento aqui incorporado por referência, são aqui incorporados por referência e podem ser empregados na prática da invenção.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a emulsões de óleo em água, seu uso como adjuvantes e composições farmacêuticas, imunológicas ou de vacina compreendendo-as.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O uso de adjuvantes em vacinas é bem-conhecido. Um adjuvante é um composto que, quando combinado com um imunógeno de vacina, aumenta a resposta imune ao imunógeno de vacina. Um adjuvante é um composto que, quando combinado com um imunógeno de vacina, aumente a resposta imune ao imunógeno de vacina. Entre as estratégias que promovem imunogenicidade de uma proteína, glicoproteína ou peptídeo estão aquelas que emulsificam imunógenos de vacina. (Nossal 1999, em: Fundamental Immunology. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel e Powell, 1995, em: Vaccine Design. The Subunit and Adjuvante Approach. Powell e Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. p. 141). Por

causa da função essencial que os adjuvantes desempenham para melhorar a imunogenicidade de imunógenos de vacina, o uso de adjuvantes na formulação de vacinas se tornou virtualmente universal (Nossal, 1999, supra; Vogel and Powell, 1995, supra; cujos ensinamentos são aqui incorporados por referênci

5 a). Adjuvantes convencionais, bem-conhecidos na técnica, são de naturezas diversas. Podem, por exemplo, consistir em sais inorgânicos insolúveis em água, lipossomos, micelas ou emulsões, isto é, adjuvante de Freund. Outros adjuvantes podem ser encontrados em Vogel e Powell, 1995, acima mencionado. Embora não haja um mecanismo único de ação do adjuvante, uma característica essencial é sua capacidade de aumentar significativamente a resposta imune a um imunógeno de vacina em comparação com a resposta induzida pelo imunógeno de vacina isoladamente (Nossal, 1999, supra; Vogel e Powell, 1995, supra). Com relação a isso, alguns adjuvantes são mais eficazes para aumentar respostas imunes humorais; outros adjuvantes são mais eficazes para aumentar respostas imunes mediadas por células (Vogel e Powell, 1995, supra); e ainda outro grupo de adjuvantes aumentam tanto respostas imunes humorais, quanto mediadas por células contra antígenos de vacina antigens (Vogel e Powell, 1995, supra).

20 Geralmente, as emulsões usadas em formulações de vacina compreendem uma mistura de óleo, solução aquosa e surfactantes. Algumas emulsões incorporam um surfactante lipofílico, como Span 80<sup>®</sup>, e um surfactante hidrofílico, como Tween 80<sup>®</sup>. Essas emulsões também podem conter compostos como lecitina ou saponina, conhecidas como possuindo propriedades de surfactante iônico.

25 Entretanto, podem-se observar problemas de estabilidade com emulsões usadas como adjuvantes de vacina, em particular durante o armazenamento ou transporte. As atividades enzimáticas de lipase ou esterase presentes na solução ou suspensão de imunógeno podem hidrolisar os surfactantes da emulsão e podem levar a uma falta de estabilidade do adjuvante. As lipases ou esterases podem vir, por exemplo, de uma cultura celular usada para cultivar vírus ou de bactérias. Isso é particularmente verdadeiro quando essas composições contêm imunógenos concentrados, particular-

30

mente imunógenos concentrados não purificados. Tipicamente, esse é o caso com adjuvantes usados em vacinas inativadas (mortas). Esse problema é ainda mais significativo com composições de vacina multivalentes, porque os imunógenos estão mais concentrados no mesmo volume de diluente.

5                    Outro problema com o uso do adjuvante está relacionado a um risco de eventos adversos, como toxicidade ou inflamação local no sítio de injeção. Por exemplo, uma resposta inflamatória local e/ou granulomas podem resultar após a injeção. Para limitar essa reação adversa, os surfactantes e similares componentes na emulsão podem ser reduzidos; entretanto, a  
10                    redução pode resultar, então, em uma diminuição na estabilidade da composição de vacina. Conseqüentemente, há necessidade de novos adjuvantes e de composições de vacina contendo esses adjuvantes com maior segurança e estabilidade.

                         A citação ou identificação de qualquer documento neste pedido  
15                    de patente não é uma admissão de que esse documento esteja disponível como técnica anterior à presente invenção.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

                         Em uma primeira modalidade, a presente invenção apresenta uma nova emulsão de óleo em água (O/A), com maior estabilidade na presença de suspensões de bactérias, parasitos ou vírus, particularmente aque-  
20                    las concentradas e não purificadas ou fracamente purificadas.

                         Outra modalidade da presente invenção apresenta uma emulsão O/A estável, segura e facilmente administrável, em particular injetável, que age como veículo para a distribuição de uma composição farmacêutica com-  
25                    prendendo pelo menos um ingrediente ativo que pode ser, mais particularmente, um imunógeno.

                         Ainda outra modalidade da presente invenção apresenta uma emulsão O/A estável, segura e injetável, que age como um adjuvante para aumentar a resposta imune induzida por um imunógeno. Em particular, a  
30                    presente invenção apresenta um novo adjuvante que, quando usado em uma composição de vacina contendo um imunógeno aumenta a resposta imune celular, a resposta imune humoral ou, vantajosamente, ambas do va-

cinado ao imunógeno.

Ainda outra modalidade da presente invenção apresenta uma composição ou vacina estável, segura e imunogênica compreendendo uma emulsão O/A.

- 5 Uma modalidade adicional da presente invenção apresenta um método de preparação de uma composição de vacina usando o adjuvante da presente invenção; a composição de vacina assim obtida; e métodos de seu uso.

- 10 Ainda outra modalidade da presente invenção apresenta um kit compreendendo um imunógeno ou outro produto farmacêutico em um primeiro frasco e um adjuvante preparado de acordo com a presente invenção em um segundo frasco, com o adjuvante projetado para ser misturado com o imunógeno ou outro produto de vacina antes do uso.

- 15 Em uma modalidade, a presente invenção apresenta uma emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

- (1) uma solução aquosa contendo um imunógeno;
  - (2) um óleo mineral;
  - (3) um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
  - (4) um surfactante hidrofílico não iônico selecionado do
- 20 grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno ou qualquer de suas combinações.

Em outra modalidade, a presente invenção apresenta uma emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

- (1) uma solução aquosa contendo um imunógeno;
  - (2) um surfactante lipofílico não iônico selecionado do grupo
- 25 de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno ou qualquer de suas combinações;
- (3) um óleo mineral;
  - (4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico.

- 30 As emulsões preparadas de acordo com a presente invenção se baseiam em uma combinação de pelo menos dois surfactantes escolhidos entre os membros de dois grupos diferentes de surfactantes (surfactantes

lipofílicos e hidrofílicos), e é possível usar um ou mais surfactantes pertencentes a cada grupo.

Em ainda outra modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta uma composição de vacina compreendendo uma nova emulsão que pode conter pelo menos um imunógeno adequado para provocar uma resposta imunológica em um vacinado. A invenção também apresenta composições em que a emulsão age como um adjuvante para aumentar a resposta imune induzida pelo imunógeno, em particular para aumentar a resposta celular, a resposta humoral ou, vantajosamente, ambas.

Em uma modalidade vantajosa, o antígeno ou imunógeno é, ou é derivado de, Mycoplasma, vantajosamente Mycoplasma hyopneumoniae, circovírus suíno, vantajosamente circovírus suíno 2, ou Helicobacter, vantajosamente Helicobacter cerdo ou Helicobacter pylori.

Em outra modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta um método de preparação de uma composição de vacina, em que um imunógeno, particularmente um imunógeno em forma liofilizada ou em uma solução aquosa, é misturado com o adjuvante de acordo com a presente invenção. O imunógeno pode ser selecionado do grupo que consiste em: patógenos inativados, patógenos atenuados, antígenos de subunidade, vetores de expressão recombinantes, incluindo plasmídios, e similares. O patógeno pode ser de origem bacteriana, viral, protozoária, parasitária ou fúngica, ou o imunógeno pode ser um toxóide.

Em outra modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta um método de indução de uma resposta imune em um vacinado contra um patógeno, compreendendo a administração da composição de vacina da presente invenção ao vacinado.

Em outra modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta kits compreendendo pelo menos dois frascos, em um primeiro frasco um imunógeno, particularmente um imunógeno em forma liofilizada ou em solução em um meio aquoso, e, em um segundo frasco, um adjuvante ou emulsão de acordo com a presente invenção.

Deve-se notar que, nesta descrição e particularmente nas rei-

vindicações, termos como "compreende", "compreendido", "compreendendo" e similares podem ter o significado atribuído a esses termos na lei de propriedade industrial norte-americana; por exemplo, podem significar "inclui", "incluído", "incluindo" e similares; e que termos como "consistindo essencialmente em" e "consiste essencialmente em" têm o significado atribuído a eles pela lei de propriedade industrial norte-americana, por exemplo, permite elementos não explicitamente citados, mas excluem elementos que sejam encontrados na técnica anterior ou que afetem uma característica básica ou nova da invenção.

Essas e similares modalidades são apresentadas ou ficam óbvias na e estão englobadas pela Descrição Detalhada a seguir.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

Por razões de conveniência, certos termos empregados no relatório, exemplos e parágrafos e reivindicações anexas são apresentados aqui.

Conforme aqui usado, o termo "animal" engloba todos os animais vertebrados, incluindo seres humanos. Também inclui um animal individual em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo os estágios embrionários e fetais. Em particular, o termo "animal vertebrado" inclui, mas não se limita a, seres humanos, caninos (por exemplo, cães), felinos (por exemplo, gatos), eqüinos (por exemplo, cavalos), bovinos (por exemplo, gado), suínos (por exemplo, porcos), ovinos (por exemplo, ovelhas), caprinos (por exemplo, cabras), coelhos, assim como aves. O termo "aves", conforme aqui usado se refere a qualquer espécie ou subespécie da classe taxonômica Aves, como, mas não limitadas a, galinhas (reprodutoras, para abate e poedeiras), perus, patos, gansos, codornas, faisões, papagaios, tentilhões, gaviões, corvos e ratitas, incluindo avestruz, emu e casuar.

Conforme aqui usado, o termo "porco" ou "leitão" se refere a um animal de origem suína, ao passo que "porca" se refere a uma fêmea de idade e capacidade reprodutiva.

Conforme aqui usado, o termo "virulento" se refere a um isolado que retenha sua capacidade de ser infeccioso em um hospedeiro animal.

Conforme aqui usado, o termo "vacina inativada" engloba uma composição de vacina contendo um organismo ou patógeno infeccioso que não seja mais capaz de replicação ou crescimento. O patógeno pode ser de origem bacteriana, viral, protozoária, parasitária ou fúngica. A inativação pode ser realizada por vários métodos, incluindo alta pressão, tratamento químico (por exemplo, tratamento com timerosal ou formalina), sonicação, radiação, calor ou qualquer outro meio convencional suficiente para evitar a replicação ou crescimento do organismo, mantendo, ao mesmo tempo, sua imunogenicidade.

10 Conforme aqui usado, o termo "imunogenicidade" significa capaz de produzir uma resposta imune em um animal hospedeiro contra um imunógeno ou imunógenos. Essa resposta imune forma a base da imunidade protetora provocada por uma vacina contra um organismo infeccioso específico.

15 Conforme aqui usado, o termo "resposta imune" se refere a uma resposta provocada em um animal. Uma resposta imune pode se referir a imunidade celular (CMI); imunidade humoral ou pode envolver ambas. A presente invenção também considera uma resposta limitada a uma parte do sistema imune. Por exemplo, uma composição de vacina da presente invenção pode induzir especificamente uma resposta aumentada a interferon gamma.

20 Conforme aqui usado, o termo "antígeno" ou "imunógeno" significa uma substância que induza uma resposta imune específica em um animal hospedeiro. O antígeno pode compreender um organismo inteiro, morto, atenuado ou vivo; uma subunidade ou parte de um organismo; um vetor recombinante contendo um enxerto com propriedades imunogênicas; um pedaço ou fragmento de DNA capaz de induzir uma resposta imune ao ser apresentado a um animal hospedeiro; uma proteína, uma glicoproteína, uma lipoproteína, um polipeptídeo, um peptídeo, um epitopo, um hapteno, ou qualquer de suas combinações. Alternativamente, o imunógeno ou antígeno pode compreender uma toxina ou antitoxina.

30 Conforme aqui usado, o termo "multivalente" significa uma vaci-

na contendo mais de um antígeno, da mesma espécie (por exemplo, diferentes isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae*), de espécies diferentes (por exemplo, isolados tanto de *Pasteurella hemolytica*, quanto de *Pasteurella multocida*), ou uma vacina contendo uma combinação de antígenos de diferentes gêneros (por exemplo, uma vacina compreendendo antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* e *Clostridium*).

Conforme aqui usado, o termo "adjuvante" significa uma substância adicionada a uma vacina para aumentar a imunogenicidade de uma vacina. O mecanismo de como um adjuvante opera é mal compreendido. Acredita-se que alguns adjuvantes aumentem a resposta imune por ligação lenta do antígeno, ao passo que similares adjuvantes podem mediar seus efeitos por qualquer um dos seguintes mecanismos: aumento da infiltração celular, inflamação e deslocamento para o sítio de injeção, particularmente para células apresentadas de antígeno (APC); promoção do estado de ativação de APCs por regulação positiva de sinais co-estimuladores ou expressão do complexo de histocompatibilidade maior (MHC); intensificação da apresentação do antígeno; ou indução da liberação de citocina para efeito indireto. O adjuvante mais apropriado para um dado imunógeno de vacina dependerá, em grande medida, do tipo de resposta imune que é requerido para a imunidade protetora. A seleção do adjuvante pode ser ligeiramente empírica. Adjuvantes de vacina conhecidos incluem, mas não se limitam a, emulsões de óleo em água (por exemplo, adjuvante de Freund completo e adjuvante de Freund incompleto), em particular emulsões de óleo em água, emulsões de água em óleo, emulsões de água em óleo em água. Incluem também, por exemplo, saponina, hidróxido de alumínio, sulfato de dextrano, carbômero, alginato de sódio, "AVRIDINE" (N, N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), óleo de parafina, muramil dipeptídeo, lipídios catiônicos (por exemplo, DMRIE, DOPE e suas combinações) e similares.

Conforme aqui usados, o termo "veículo farmacologicamente aceitável" são intercambiáveis e se refere a um veículo fluido para conter imunógenos de vacina que possam ser injetados em um hospedeiro sem e-

feitos adversos significativos. Carreadores farmacologicamente aceitáveis adequados conhecidos na técnica incluem, mas não se limitam a, água estéril, solução salina, glicose ou soluções tamponadas. Os veículos podem incluir agentes auxiliares, incluindo, mas não limitados a, diluentes, estabilizadores (isto é, açúcares e aminoácidos), conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificadores, agentes de tamponamento de pH, aditivos de aumento de viscosidade, corantes e similares. Os carreadores farmacêuticos ou veterinariamente aceitáveis são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um carreador ou excipiente farmacêutico ou veterinariamente aceitável pode ser uma solução de NaCl a 0,9% (por exemplo, solução salina) ou um tampão fosfato. As doses e volumes de doses são aqui discutidos na descrição geral e também podem ser determinadas por aqueles versados na técnica a partir desta descrição, lida em conjunto com o conhecimento da técnica, sem nenhuma experimentação excessiva.

Conforme aqui usado, o termo "composição de vacina" inclui pelo menos um antígeno ou imunógeno em um veículo farmacologicamente aceitável utilizável para induzir uma resposta imune em um hospedeiro. Composições de vacina podem ser administradas em dosagens e por técnicas bem-conhecidas nas técnicas médicas e veterinárias, levando-se em consideração fatores como a idade, sexo, peso, espécie ou condição do animal receptor, e a via de administração. A via de administração por ser percutânea, mediante administração na mucosa (por exemplo, oral, nasal, ocular) ou mediante uma via parenteral (por exemplo, intradérmica, intramuscular, subcutânea). Para a administração parenteral do produto ao hospedeiro, pode-se usar uma seringa com uma agulha ou um injetor sem agulha. As composições de vacina podem ser administradas isoladamente ou podem ser co-administradas ou seqüencialmente administradas com outros tratamentos ou terapias. Formas de administração podem incluir suspensões e preparações para administração parenteral, subcutânea, intradérmica ou intramuscular (por exemplo, administração injetável), como suspensões ou emulsões estéreis. As composições de vacina podem ser administradas como uma pulverização ou misturadas em alimentos e/ou na água ou distribuí-

das em mistura com um carreador, diluente ou excipiente adequado, como água estéril, solução salina fisiológica, glicose ou similares. As composições podem conter substâncias auxiliares, como agentes umectantes ou emulsificadores, agentes de tamponamento de pH, adjuvantes, aditivos de formação de gel ou de aumento da viscosidade, conservantes, agentes de sabor, corantes e similares, dependendo da via de administração e da preparação desejada. Textos farmacêuticos padronizados, como o "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990, podem ser consultados para preparar preparações adequadas, sem experimentação excessiva.

10 A presente invenção apresenta em uma modalidade um novo adjuvante ou emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

- (1) uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
- (2) um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
- 15 (3) um óleo mineral;
- (4) um surfactante hidrofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno e/ou qualquer de suas combinações.

A presente invenção apresenta em outra modalidade um novo adjuvante ou emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

- (1) uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro ;
- (2) um surfactante lipofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno e/ou qualquer de suas combinações;
- 25 (3) um óleo mineral;
- (4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico.

As emulsões preparadas de acordo com a presente invenção se baseiam em uma combinação de pelo menos dois surfactantes escolhidos entre os membros de dois grupos diferentes de surfactantes (surfactantes lipofílicos e hidrofílicos), e é possível usar um ou mais surfactantes pertencentes a cada grupo.

30

Um álcool graxo etoxilado lipofílico pode ser um álcool graxo etoxilado que pode compreender cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO). Um copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno lipofílico (copolímero de blocos POE-POP) é um copolímero que pode compreender cerca de 35% (p/p) ou menos de óxido de etileno.

Um álcool graxo etoxilado hidrofílico pode ser um álcool graxo etoxilado compreendendo mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno (EO). Um copolímero de blocos POE-POP hidrofílico é um copolímero compreendendo cerca de 55% (p/p) ou mais de óxido de etileno.

Para os surfactantes hidrofílicos não iônicos o álcool graxo pode ser um álcool graxo C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico com 5 a 21 EO. O copolímero de blocos POE-POP tem um PM de cerca de 3.000 a cerca de 16.000.

O grupo de surfactantes hidrofílicos não iônicos inclui, mas não se limita a, os álcoois graxos etoxilados: Brij<sup>®</sup> 76 [Steareth-10], Brij<sup>®</sup> 56 [Ceteth-10], Brij<sup>®</sup> 96/97 [Oleth-10], Brij<sup>®</sup> 98 [Oleth-20], Brij<sup>®</sup> 721 [Steareth-21], Brij<sup>®</sup> 58 [Ceteth-20], Brij<sup>®</sup> 35 [Laureth-23], Brij<sup>®</sup> 78 [Steareth-20], (Uniqema) Volpo<sup>®</sup> N5 [Oleth-5], Volpo<sup>®</sup> CS6 [Cetareth-6], Volpo<sup>®</sup> CS12 [Cetareth-12], Volpo<sup>®</sup> CS20 [Cetareth-20], Volpo<sup>®</sup> CS25 [Cetareth-25], Volpo<sup>®</sup> CS23 [Cetareth-23] (Croda), BL9-EX [Laureth-9], BC-7 [Ceteth-7], BT-5 [C12-14 Pareth-5], BT-7 [C12-14 Pareth-7], BT-9 [C12-14 Pareth-9], BT-12 [C12-14 Pareth-12], BD-10 [C12-15 Pareth-10], BO-7V [Oleth-7], BC5.5 [Ceteht-6], , BL-21 [Laureth-21], BL-25 [Laureth-25], BC-15TX [Ceteth-15], BC-23 [Ceteth-23], BC-25TX [Ceteth-25], BO-15V [Oleth-15], BO-50V [Oleth-50], BB-20 [Beheneth-20], (Nikko Chemicals), e suas combinações, os copolímeros de blocos POE-POP: Lutrol<sup>®</sup> F127 [Poloxamer 407], Lutrol<sup>®</sup> F68 [Poloxamer 188], Lutrol<sup>®</sup> F108 [Poloxamer 338], Lutrol<sup>®</sup> F98 [Poloxamer 278], Lutrol<sup>®</sup> F87 [Poloxamer 227], Lutrol<sup>®</sup> F88 [Poloxamer 228], Lutrol<sup>®</sup> F77 [Poloxamer 207], Lutrol<sup>®</sup> F38 [Poloxamer 108] (BASF), Tetronics<sup>®</sup>T1307, Tetronics<sup>®</sup>T1107, Tetronics<sup>®</sup>T908 (BASF), e suas combinações.

Para os surfactantes lipofílicos não iônicos, o álcool graxo é um álcool graxo C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico, mais vantajosamente um álcool oleílico etoxilado com 1 a 4 EO. O copolímero de blocos POE-POP tem um PM de cerca de 1.000 a cerca de 8.000.

O grupo de surfactantes lipofílicos não iônicos inclui, mas não se limita a, os álcoois graxos etoxilados: Brij<sup>®</sup> 30 [Laureth-4], Brij<sup>®</sup> 92/93 [Oleth-2], Brij<sup>®</sup> 72 [Steareth-2], Brij<sup>®</sup> 52 [Ceteth-2] (Uniqema), Volpo<sup>®</sup> L3 [C12-13 Pareth-3], Volpo<sup>®</sup> N3 [Oleth-3], Volpo<sup>®</sup> L4 [C12-13 Pareth-4] (Croda), BS-4 [Steareth-4], BD-2 [C12-15 Pareth-2], BD-4 [C12-15 Pareth-4], BT-3 [C12-14 Pareth-3] (Nikko Chemicals) e suas combinações, os copolímeros de blocos POE-POP: Pluronic<sup>®</sup> L121 [Poloxamer 401], Pluronic<sup>®</sup> L101 [Poloxamer 331], Pluronic<sup>®</sup> L81 [Poloxamer 221], Pluronic<sup>®</sup> L62 [Poloxamer 182], Pluronic<sup>®</sup> L43 [Poloxamer 123], Pluronic<sup>®</sup> P103 [Poloxamer 333], Pluronic<sup>®</sup> L123 [Poloxamer 403], Lutrol<sup>®</sup> L63 [Poloxamer 183], Lutrol<sup>®</sup> P122 [Poloxamer 402], Lutrol<sup>®</sup> L92 [Poloxamer 272], Lutrol<sup>®</sup> L72 [Poloxamer 202], Lutrol<sup>®</sup> L42 [Poloxamer 122], Lutrol<sup>®</sup> L61 [Poloxamer 181] (BASF), Tetronics<sup>®</sup>T1301, Tetronics<sup>®</sup>T701, Tetronics<sup>®</sup>T901 (BASF), e suas combinações.

Os surfactantes da invenção podem ter um álcool graxo de origem animal ou vegetal. A troca de uma origem pela outra pode ser feita simplesmente, com apenas um pequeno ajuste na formulação da emulsão.

Uma emulsão de acordo com a invenção pode ter uma concentração global de surfactantes, em peso por volume de emulsão, de cerca de 0,2% a cerca de 6,5%, em particular de cerca de 1% a cerca de 6%, vantajosamente de cerca de 1,5% a cerca de 5%, mais vantajosamente de cerca de 2% a cerca de 3%.

Essas emulsões têm uma baixa viscosidade e são facilmente injetáveis.

Em uma modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta uma emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

- (1) uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunó-

geno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;

(2) um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;

(3) um óleo mineral;

5 (4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno;

(5) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno.

10 O álcool graxo etoxilado compreendendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno é vantajosamente um álcool oleílico etoxilado com 5 a 14 EO. O álcool graxo compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno é vantajosamente um álcool oleílico etoxilado com 15 EO ou mais.

15 Nessa modalidade vantajosa, a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico é, em geral, de cerca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5% a cerca de 4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v). Para o álcool graxo etoxilado altamente hidrofílico não iônico, a concentração é, em geral, de cerca de 0,01% a cerca  
20 de 3,0%, particularmente de cerca de 0,05% a cerca de 2,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,1% a cerca de 2,0% (p/v). A concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é, em geral, de cerca de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%, vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,2% a  
25 cerca de 1,2% (p/v).

Em uma modalidade vantajosa, a presente invenção apresenta uma emulsão de óleo em água (O/A) que pode compreender:

(1) uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;

30 (2) um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;

(3) um óleo mineral;

(4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico;

(5) um copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno hidrofílico não iônico.

O álcool graxo etoxilado hidrofílico é vantajosamente um álcool graxo compreendendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno, e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 5 a 14 EO. O copolímero de blocos POE-POP não iônico pode compreender, vantajosamente, 70% (p/p) ou mais de óxido de etileno.

Nessa modalidade vantajosa, a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico é, em geral, de cerca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5% a cerca de 4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v). Para o copolímero de blocos POE-POP não iônico a concentração é, em geral, de cerca de 0,01% a cerca de 2,0%, mais particularmente de cerca de 0,1% a cerca de 1,5% (p/v). A concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é, em geral, de cerca de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%, vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,2% (p/v).

Geralmente, a emulsão de acordo com a invenção pode ter uma temperatura de inversão de fase (TIF), que é  $\geq 25^{\circ}\text{C}$ , em particular varia de cerca de  $28^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $65^{\circ}\text{C}$ , mais particularmente de cerca de  $33^{\circ}\text{C}$  a cerca de  $60^{\circ}\text{C}$ .

A TIF é a temperatura em que uma emulsão de água em óleo muda para uma emulsão de óleo em água ou defasa (ruptura da emulsão e separação das 2 fases). O valor da TIF pode ser medido por vários meios, por exemplo, por aparência visual ou por condutividade. A emulsão é colocada a uma temperatura abaixo da TIF da emulsão, por exemplo, de cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ , em um banho de água. A temperatura é progressivamente aumentada. A alteração do aspecto visual da emulsão é observado em comparação com uma emulsão de controle, particularmente a fluidez, a separação em duas fases, a mudança do aspecto da superfície devido à migração da fase oleosa para a superfície. A temperatura em que essa mudança de aspecto

visual é observada é o valor TIF da emulsão. Alternativamente, a TIF é determinada pela passagem rápida de um valor de condutividade de cerca de 5 - 15 miliSiemens/centímetro (mS/cm) (emulsão de óleo em água) para um valor de cerca de 0 mS/cm (emulsão de água em óleo), para solução salina fisiológica como fase aquosa, medida por uma sonda colocada na emulsão, próxima a sua superfície. A temperatura em que a transição é observada é o valor TIF da emulsão. Aqueles versados na técnica serão capazes de determinar combinações de surfactantes e óleo, incluindo suas respectivas concentrações, para produzir emulsões de acordo com a invenção e, em particular, emulsões com um valor TIF dentro das faixas acima definidas, sem experimentação excessiva.

Geralmente, emulsões de acordo com a presente invenção podem conter, em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa. Por definição, as faixas de valores no presente relatório incluem sempre o limite da faixa, a menos que indicado de outra forma.

O óleo usado pode ser um óleo mineral incluindo, mas não limitados a, óleo de parafina como óleo isoparafínico e/ou óleo naftênico, esqualano, esqualeno, pristano, poliisobuteno, poliisobuteno hidrogenado, polidéceno, poliisopreno, poliisopropeno e similares. Um óleo mineral vantajoso utilizável na presente invenção pode incluir um óleo compreendendo uma cadeia de carbonos linear ou ramificada com um número de átomos de carbono maior do que 15, vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos. Esses óleos podem, por exemplo, ser aqueles comercializados sob o nome MARCOL<sup>®</sup> 52 ou MARCOL<sup>®</sup> 82 (Esso) ou "DRAKEOL<sup>®</sup> 6VR" (Penreco).

O óleo também pode ser uma mistura de óleos compreendendo pelo menos 2 óleos selecionados dentre os óleos aqui descritos, e em qualquer proporção. A mistura de óleos também pode compreender pelo menos um óleo selecionado dentre os óleos acima descritos e pelo menos um óleo

vegetal, e esse óleo vegetal representa de cerca de 0,1% a cerca de 33% da fase oleosa, vantajosamente de cerca de 5% a cerca de 15% v/v. Esses óleos vegetais são óleos insaturados ricos em ácido oléico que sejam biodegradáveis e vantajosamente líquidos à temperatura de armazenamento (cerca de +4°C), ou que pelo menos tornem possível fornecer emulsões que sejam líquidas a essa temperatura. Por exemplo o óleo vegetal pode ser óleo de amendoim, óleo de noz, óleo de girassol, óleo de açafrão, óleo de soja, óleo de primula e similares.

Geralmente, a presente invenção considera o uso de uma solução aquosa compreendendo um veículo, excipiente ou diluente farmacêutica ou veterinariamente aceitável adequado, incluindo, mas não limitados a, água estéril, solução salina fisiológica, glicose, tampão e similares. O veículo, excipiente ou diluente também pode incluir polióis, glúcides ou agentes de tamponamento de pH. O veículo, excipiente ou diluente também pode, por exemplo, compreender aminoácidos, peptídios, antioxidantes, bactericidas, compostos bacteriostáticos. A solução aquosa é adicionada ao óleo e aos surfactantes em uma quantidade que obtenha 100% do volume da emulsão de acordo com a invenção.

A presente invenção considera uma emulsão compreendendo um óleo de parafina; um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico; um álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO como surfactante hidrofílico não iônico; e um copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80% EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 como surfactante hidrofílico não iônico. Em particular, o óleo de parafina está a uma concentração de cerca de 5% a cerca de 50% e, vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,1% a 1,5%, vantajosamente de 0,1% a 1,2% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO está à concentração de 1% a 5%, vantajosamente de 1% a 4% (p/v); e o copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 está à concentração de 0,01% a 2%, vantajosamente de 0,05% a 1,5% (p/v).

Em uma segunda modalidade de acordo com a presente inven-

ção, a emulsão compreende um óleo de parafina, um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico; um álcool oleílico etoxilado com 10 OE como surfactante hidrofílico não iônico; e um copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 como surfactante hidrofílico não iônico. Em particular, o óleo de parafina está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 30% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,2% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 10 EO está à concentração de 0,2 % a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); e o copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 está à concentração de 0,01% a 2%, vantajosamente de 0,05% a 1,5% (p/v).

Em uma terceira modalidade de acordo com a presente invenção, a emulsão compreende um óleo de parafina, um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico e um álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 OE como surfactante hidrofílico não iônico. Em particular, o óleo de parafina está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 35% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,1% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 2% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO está à concentração de 1% a 5%, vantajosamente de 2,0% a 4,5% (p/v).

Opcionalmente, outros compostos podem ser adicionados como co-adjuvantes à emulsão, incluindo, mas não limitados a, alumínio; oligonucleotídeos CpG (ODN), em particular ODN 2006, 2007, 2059, 2216 ou 2135 (Pontarollo R.A. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84: 43-59; Wernette C.M. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84: 223-236; Mutwiri G. et al., Vet. Immunol. Immunopath, 2003, 91: 89-103; Kerkmann M. et al., J. Immunol., 2003, 170: 4465-4474 ); poliA-poliU ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell e Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6: 03); brometo de dimetildiocadecilamônio (DDA) ("Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell e Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, volume

6: 157), N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina (como Avridine<sup>®</sup>) (Ibid, p. 148), carbômero, quitosano (veja o pedido de patente norte-americano nº de série 5.980.912 por exemplo).

5 A presente invenção também apresenta um método de preparação de uma composição de vacina ou composição imunológica compreendendo pelo menos um antígeno ou imunógeno e um adjuvante ou emulsão preparada de acordo com a presente invenção. O imunógeno pode ser incorporado durante a formação da emulsão ou, em uma modalidade alternativa, o imunógeno pode ser adicionado à emulsão posteriormente como, por  
10 exemplo, pouco antes do uso.

A quantidade total da solução aquosa usada pode estar presente na emulsão primeiro produzida. Ou pode ser que apenas uma parte dessa solução aquosa seja usada para formar a emulsão, e a quantidade restante da solução aquosa seja adicionada com a incorporação do imunógeno. O  
15 imunógeno ou antígeno pode estar em uma forma liofilizada ou presente em alguma outra forma sólida apropriada e, então, misturada com a emulsão ou, alternativamente, o antígeno pode estar em solução, em particular em uma solução aquosa, e essa solução ser misturada com a emulsão.

Surfactantes são vantajosamente adicionados ao óleo ou à solução aquosa de acordo com sua solubilidade. Por exemplo, os surfactantes lipofílicos não iônicos são adicionados ao óleo de acordo com a invenção, ao  
20 passo que os surfactantes hidrofílicos não iônicos são adicionados à solução aquosa.

A emulsificação pode ser preparada de acordo com métodos  
25 convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, em uma modalidade da presente invenção, a emulsão pode ser preparada a uma temperatura abaixo da TIF da emulsão, em particular à temperatura ambiente, por exemplo, a cerca de 30°C. A fase aquosa e a fase oleosa são misturadas entre si por agitação mecânica, por exemplo, com uma turbina  
30 equipada com a rotor-estator capaz de criar uma elevada força de cisalhamento. Vantajosamente, a agitação começa a uma baixa velocidade de rotação e aumenta lentamente com relação à adição progressiva em geral da

solução aquosa ao óleo. Vantajosamente, a solução aquosa é progressivamente adicionada ao óleo. A razão de óleo/solução aquosa pode ser adaptada para se obter uma emulsão de água em óleo (A/O), por exemplo, a uma concentração de cerca de 40% a cerca de 55% de óleo (v/v). Quando se pára a agitação, a emulsão muda progressivamente para uma emulsão O/A enquanto resfria à temperatura ambiente (inversão de fase). Depois da inversão e, caso necessário, a emulsão é diluída pela adição de uma solução aquosa para se obter a concentração desejada de óleo na emulsão final. A emulsão pode ser armazenada a cerca de 5°C.

10 Em outra modalidade, a emulsão pode ser preparada a uma temperatura maior que a TIF da emulsão. Em uma primeira etapa, a fase aquosa e a fase oleosa são misturadas entre si a uma temperatura maior que a TIF da emulsão. Vantajosamente, a solução aquosa é progressivamente adicionada ao óleo. A razão de óleo/solução aquosa pode ser adaptada para se obter uma emulsão de água em óleo (A/O), por exemplo a uma  
15 concentração de cerca de 40% a cerca de 55% de óleo (v/v). A emulsificação pode ser feita por agitação com baixa ou nenhuma força de cisalhamento, por exemplo, com um misturador estático ou uma hélice (propulsor) ou com uma turbina a uma velocidade de rotação muito baixa. A emulsão  
20 obtida é uma emulsão de água em óleo (A/O). Em uma segunda etapa, a emulsão é progressivamente resfriada abaixo da TIF. Durante essa etapa, a emulsão muda para uma emulsão O/A (inversão de fase). Depois da inversão e, caso necessário, a emulsão é diluída pela adição de uma solução aquosa para se obter a concentração desejada de óleo na emulsão final. A  
25 emulsão pode ser armazenada a cerca de 5°C.

O tamanho das gotículas de óleo na emulsão pode ser de cerca de 100 nm a cerca de 500 nm. A emulsão pode ser usada, por exemplo, como um adjuvante para formular uma composição de vacina ou uma composição farmacêutica. A emulsão também pode ser usada como um solvente  
30 para dissolver um produto seco, particularmente um produto liofilizado contendo, por exemplo, microorganismos atenuados ou vetores recombinantes vivos.

Em uma modalidade particular, produz-se uma pré-emulsão com apenas uma parte da solução aquosa. Essa pré-emulsão pode ser diluída pela adição de uma suspensão de um ingrediente ativo, como um fármaco ou um imunógeno, vantajosamente um imunógeno, para se obter a composição final. Alternativamente, a pré-emulsão pode ser diluída com uma solução aquosa e usada para dissolver um produto seco, como um produto liofilizado.

O imunógeno ou antígeno adequado para uso na presente invenção pode ser selecionado do grupo que consiste em patógenos inativados, patógenos atenuados, subunidades imunogênicas (por exemplo, proteínas, polipeptídeos, peptídeos, epitopos, haptenos) ou vetores de expressão recombinantes, incluindo plasmídios com enxertos imunogênicos. Em uma modalidade da presente invenção, o imunógeno é um microorganismo inativado ou morto. Em outra modalidade da invenção, a composição de vacina compreende um imunógeno selecionado do grupo de patógenos aviários incluindo, mas não limitados a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), Vírus da Doença de Newcastle (NDV), vírus da síndrome de queda de ovos (EDS), ou Vírus da Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus da influenza aviária e similares, e suas combinações.

Alternativamente, a composição de vacina compreende um imunógeno selecionado de um patógeno de felinos como, mas não limitados a, herpesvírus felino (FHV), calicivírus felino (FCV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da raiva e similares, e suas combinações.

Em ainda outra modalidade, uma composição de vacina da presente invenção compreende um imunógeno selecionado de um patógeno canino incluindo, mas não limitados a, vírus da raiva, herpesvírus canino (CHV), parvovírus canino (CPV), coronavírus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* e similares, e suas combinações.

Em ainda outra modalidade da invenção a composição compre-

ende um imunógeno selecionado de um patógeno eqüino, como herpesvírus eqüino (tipo 1 ou tipo 4), vírus da influenza eqüina, tétano, vírus do Nilo Ocidental e similares e/ou suas combinações.

Em ainda outra modalidade da invenção, a composição compre-

5 ende um imunógeno selecionado de um patógeno bovino, como vírus da raiva, rotavírus bovino, vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3), coronavírus bovino, vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da doença do pé e boca (FMDV), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), vírus da Rinotraqueíte Bovina Infecciosa (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* e similares e suas combinações.

10

Em ainda outra modalidade da presente invenção, a composição compreende um imunógeno selecionado de um patógeno suíno como, mas não limitados a, vírus da influenza suína (SIV), circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), vírus da síndrome respiratória reprodutiva suína (PRRS), vírus da pseudo-raiva (PRV), parvovírus suíno (PPV), FMDV, cólera de porcos (HCV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Helicobacter cerdo*, *Helicobacter pylori* e similares, e suas combinações.

15

Uma modalidade vantajosa da invenção apresenta composições

20 de vacina compreendendo pelo menos um imunógeno e uma emulsão em um veículo farmacêuticamente aceitável. Imunógenos compreendendo vírus, bactérias, fungos e similares podem ser produzidos por métodos de cultura *in vitro* usando meio de cultura apropriado ou linhagens de células hospedeiras e métodos convencionais bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, PRRS pode ser cultivado em uma linhagem celular apropriada, como a linhagem celular MA-104 (veja os pedidos de patentes norte-americanos nº de série 5.587.164, 5.866.401, 5.840.563, 6.251.404 entre

25 outro). De maneira similar, PCV-2 pode ser cultivado usando-se a linhagem de células PK-15 (veja o pedido de patente norte-americano nº de série 6.391.314); SIV pode ser cultivado em ovos (pedido de patente norte-americano nº de série 6.048.537); e *Mycoplasma hyopneumoniae* pode ser

30 cultivado em um meio de cultura apropriado (pedidos de patentes norte-

americanos nº de série 5.968.525, 5.338.543; Ross R. F. et al., Am. J. Vet. Res., 1984, 45: 1899-1905).

Para se obter uma composição imunológica, ou de vacina, inativada, o patógeno é vantajosamente inativado após colheita e, opcionalmente, submetido a clarificação por meio de um tratamento químico usando, por exemplo, formaldeído, beta-propiolactona, etilenoimina, etilenoimina binária (BEI), timerosal, e similares, e/ou um tratamento físico (por exemplo, um tratamento térmico ou sonicação). Métodos para inativação são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, o vírus PRRS pode ser inativado por tratamento com beta-propiolactona (Plana-Duran et al., Vet. Microbiol., 1997, 55: 361-370) ou por tratamento com BEI (pedido de patente norte-americano nº de série 5.587.164); a inativação do vírus PCV-2 pode ser realizada usando-se tratamento com etilenoimina ou por tratamento com beta-propiolactona (pedido de patente norte-americano nº de série 6.391.314); o vírus da influenza suína pode ser inativado usando-se um detergente como Triton, ou com tratamento com formaldeído (pedido de patente norte-americano nº de série 6.048.537); a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* pode ser inativada por tratamento com formaldeído (Ross R. F. supra), por etilenoimina ou tratamento com BEI (veja WO 91/18627), ou por tratamento com timerosal (pedido de patentes norte-americanas nº de série 5.968.525 e 5.338.543).

O patógeno inativado pode ser concentrado por técnicas de concentração convencionais, em particular por ultrafiltração, e/ou purificado por meios de purificação convencionais, em particular usando técnicas de cromatografia, incluindo, mas não limitadas a, filtração em gel, ultrafiltração em um gradiente de sacarose, ou precipitações seletivas, em particular usando um polietileno glicol (PEG).

Imunógenos utilizáveis em composições de vacina de acordo com a presente invenção também incluem vetores de expressão. Um "vetor" se refere a um plasmídeo ou vírus de DNA ou RNA recombinante, por exemplo, poxvírus, adenovírus, herpesvírus, que compreende um polinucleotídeo heterólogo para ser distribuído a uma célula-alvo, in vitro ou in vivo. O poli-

nucleotídeo heterólogo pode compreender uma seqüência de interesse para fins de terapia, e pode opcionalmente estar na forma de um cassete de expressão. Conforme aqui usado, um vetor não precisa ser capaz de replicação na célula-alvo ou sujeito final. O termo inclui vetores de clonagem para  
5 tradução de uma seqüência codificadora de polinucleotídeo. Também estão incluídos vetores virais.

O termo "recombinante" significa um polinucleotídeo de origem de cDNA genômico, semi-sintética ou sintética, que não ocorra na natureza ou que esteja ligado a outro polinucleotídeo em um arranjo não encontrado  
10 na natureza.

De acordo com outra modalidade da invenção, os vetores de expressão são vetores de expressão usados para a expressão in vitro de proteínas em um sistema de células apropriado. As proteínas expressadas podem ser colhidas no ou do sobrenadante da cultura depois, ou não depois,  
15 da secreção (se não houver secreção, tipicamente ocorre ou é realizada uma lise celular), opcionalmente concentradas por métodos de concentração como ultrafiltração e/ou purificadas por meios de purificação, como métodos de cromatografia do tipo afinidade, troca de íons ou filtração em gel, e formuladas em uma emulsão de acordo com a presente invenção.

A presente invenção também engloba a formulação de composições imunológicas multivalentes ou composições de vacina em combinação. Por exemplo, antígenos utilizáveis em uma bacterina bovina em combinação preparada de acordo com a presente invenção incluem, mas não se limitam a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella* sp., particularmente *P. multocida* e *P. haemolytica*, *Haemophilus* sp., particularmente *H. somnus*, *Clostridium* sp.,  
25 *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli* e similares.

A presente invenção também apresenta métodos para induzir uma resposta imune em um hospedeiro, por exemplo, um animal, compreendendo a administração ao hospedeiro de uma composição imunológica ou  
30 composição de vacina de acordo com a invenção. As respostas imunes provocadas dessa maneira são particularmente respostas imunes de anticorpos

e/ou celulares e, em particular, uma resposta de gama-interferon.

Em particular, a presente invenção apresenta métodos para imunizar contra, ou prevenir ou reduzir os sintomas causados por, infecção de um animal com um organismo patogênico (por exemplo, infecção por um vírus, bactéria, fungo, ou parasito protozoário). O método da presente invenção é utilizável em animais vertebrados, incluindo, mas não limitados a, seres humanos, animais caninos (por exemplo, cães), felinos (por exemplo, gatos); eqüinos (por exemplo, cavalos), bovinos (por exemplo, gado), ovinos (por exemplo, ovelhas), caprinos (por exemplo, cabras), suínos (por exemplo, porcos) e coelhos, assim como em aves, incluindo, mas não limitadas a, galinhas, perus, patos, gansos, codornas, faisões, papagaios, tentilhões, gaviões, corvos e ratitas (avestruz, emu, casuar e similares).

Em um aspecto particular da invenção, esses métodos consistem na vacinação de fêmeas grávidas antes da parturição por administração de uma composição de vacina preparada de acordo com a invenção. Esses métodos também incluem a indução de anticorpos protetores provocados pelo protocolo de vacinação e a transferência desses anticorpos protetores de fêmeas grávidas vacinadas para seus descendentes. A transferência desses anticorpos maternos protege subsequente os descendentes de doenças.

A dosagem da composição de vacina preparada de acordo com a presente invenção dependerá da espécie, raça, idade, tamanho, histórico de vacinação e status de saúde do animal a ser vacinado. Outros fatores, como concentração de antígeno, componentes de vacina adicionais e via de administração (isto é, administração subcutânea, intradérmica, oral ou intramuscular) também afeterão a dosagem eficaz. A dosagem de vacina a ser administrada é facilmente determinável com base na concentração de antígeno da vacina, na via de administração e na idade e condição do animal a ser vacinado. Alternativamente, podem-se usar ensaios metódicos de imunogenicidade de diferentes dosagens, assim como estudos de LD<sub>50</sub> e similares procedimentos de triagem para determinar a dosagem eficaz para uma composição de vacina de acordo com a presente invenção sem experimen-

tação excessiva. Dos exemplos apresentados abaixo, fica prontamente claro que dosagem aproximada e que volume aproximado seriam apropriados para usar a composição de vacina aqui descrita. O fator crítico é que dosagem proporciona pelo menos um efeito protetor parcial contra infecção natural. O volume apropriado também é facilmente determinado por aqueles versados na técnica. Por exemplo, em espécies aviárias, o volume de uma dose pode ser de cerca de 0,1 mL a cerca de 0,5 mL e, vantajosamente, de cerca de 0,3 mL a cerca de 0,5 mL. Para espécies felinas, caninas e eqüinas, o volume de uma dose pode ser de cerca de 0,2 mL a cerca de 3,0 mL, vantajosamente de cerca de 0,3 mL a cerca de 2,0 mL, e, mais vantajosamente, de cerca de 0,5 mL a cerca de 1,0 mL. Para espécies bovinas e suínas, o volume de dose pode ser de cerca de 0,2 mL a cerca de 5,0 mL, vantajosamente de cerca de 0,3 mL a cerca de 3,0 mL, e, mais vantajosamente, de 0,5 mL a cerca de 2,0 mL.

Vacinações repetidas podem ser vantajosas a intervalos de tempo periódicos para aumentar a resposta imune inicialmente ou quando um longo período de tempo tiver decorrido desde a última dose. Em uma modalidade da presente invenção, a composição de vacina é administrada como uma injeção parenteral (isto é, por via subcutânea, intradérmica ou intramuscular). A composição pode ser administrada como uma dose ou, em modalidades alternativas, administrada em doses repetidas de cerca de duas a cerca de cinco doses dadas a intervalos de cerca de duas a cerca de seis semanas, vantajosamente de cerca de duas a cerca de cinco semanas. Entretanto, aqueles versados na técnica reconhecerão que o número de doses e o intervalo de tempo entre vacinações depende de inúmeros fatores, incluindo, mas não limitados a, a idade do animal vacinado; a condição do animal, em particular na presença de anticorpos maternos; a via de imunização; a quantidade de antígeno disponível por dose; e similares. Para uma vacinação inicial, o período em geral será mais longo que uma semana e, vantajosamente, estará entre cerca de duas e cerca de cinco semanas. Para animais previamente vacinados, pode-se realizar uma vacinação de reforço, antes ou durante a gravidez, em um intervalo aproximadamente anual.

A presente invenção também considera a administração de uma composição de vacina usando um injetor sem agulha, como, mas não limitados a, Pigjet<sup>®</sup>, Avijet<sup>®</sup>, Dermojet<sup>®</sup> ou Biojector<sup>®</sup> (Bioject, Oregon, EUA). Aqueles versados na técnica são capazes de ajustar as especificações do injetor conforme requerido com relação a fatores como a espécie do animal a ser vacinado; a idade e o peso do animal e similares, sem experimentação excessiva.

Em uma modalidade da presente invenção, o método compreende uma única administração de uma composição de vacina formulada com uma emulsão de acordo com a invenção. Por exemplo, em uma modalidade, a composição de vacina é uma vacina de Mycoplasma hyopneumoniae inativado, ao passo que uma modalidade alternativa apresenta uma vacina compreendendo uma composição de vírus PCV2 inativado. Outras composições imunológicas ou vacinas são adequadas para uso em um regime de dose única, incluindo, mas não limitados a, PRRS e SIV inativado. A vacina também pode ser administrada na presença de anticorpos pré-existentes.

A invenção também se refere a métodos para tratar um hospedeiro, por exemplo, um animal, compreendendo a administração ao hospedeiro de uma composição farmacêutica preparada de acordo com a invenção e compreendendo pelo menos um imunógeno selecionado do grupo que consiste em proteínas ou peptídeos, anticorpos, alérgenos, CpG ODN, fatores de crescimento, citocinas ou anticorpos e, em particular, CpG ODN ou citocinas. Essas composições farmacêuticas podem ser usadas para melhorar os desempenhos de crescimento de um animal, como uma galinha, porco ou vaca.

A presente invenção também se refere a um kit compreendendo um primeiro frasco contendo um ingrediente, como um imunógeno ou composição farmacêutica e, em um segundo frasco, uma emulsão preparada de acordo com a presente invenção. O imunógeno pode estar em forma liofilizada, forma seca ou em solução aquosa, conforme aqui descrito.

A invenção será agora adicionalmente descrita por meio dos se-

guintes exemplos não limitativos.

### EXEMPLOS

#### Exemplo 1: Método de Fabricação de Emulsão

A emulsão é produzida em duas etapas, conforme descrito a seguir:

Primeira Etapa: Um emulsificador de rotor-estator de alto cisalhamento Silverson (tipo L4RT com uma cabeça de desintegração com um diâmetro de 10 mm) foi usado para produzir as formulações. Para produzir uma emulsão, um volume de fase oleosa foi emulsificado a 35°C com um volume de fase aquosa nº 1. A fase aquosa foi adicionada à fase oleosa sob agitação, 5.000 rpm (rotações por minuto) durante 1 minuto. A velocidade de rotação foi progressivamente aumentada com o aumento do volume para 8.300 rpm durante 1 minuto. Durante essa etapa, a emulsão era uma emulsão de água em óleo. A emulsão LR4 final é uma O/A contendo 20% de fase oleosa. Para a emulsão LR4, a composição de fase era a seguinte:

Fase oleosa (72 mL):

- Oleth-2 (Brij® 92) : 1,8% p/v,  
- Oleth-5 (Volpo® N5) : 8,2%

p/v,

- Óleo de parafina (Marcol 82®) : 87,5% v/v,  
- Conservante : 2,5%

v/v

Fase aquosa nº 1 (108 mL):

- Poloxamer 407 (Lutrol® F127) : 0.58% p/v,  
- Tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) : Q. S. para 100,0% v/v

Uma solução a 5% (p/v) de Lutrol® F127 no mesmo tampão que a vacina, por exemplo, em tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) foi usada para preparar a fase aquosa nº 1.

Quando a agitação parou, a emulsão mudou para uma emulsão de óleo em água. A emulsão foi colocada em uma câmara fria a 5°C durante pelo menos 4 horas. Nesse estágio, a emulsão era uma pré-emulsão con-

tendo 40% de fase oleosa.

Segunda Etapa: A fase aquosa nº 2 foi preparada com 180 mL de tampão isotônico de fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M pH 7,8 com o(s) imunógeno(s) (imunógeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado, ou imunógeno PCV-2, conforme descrito abaixo). A pré-emulsão, conforme preparada na primeira etapa, foi resfriada a cerca de 5°C, diluída por adição do mesmo volume de uma fase aquosa nº 2 à mesma temperatura, e misturada pela rotação de uma barra magnética durante 1 minuto. A concentração de surfactante final na emulsão LR4 era de 2,18% (p/v).

Conforme aqui preparadas, as vacinas LR4 são estáveis durante pelo menos um ano a 5°C.

Usando-se o mesmo método de preparação, outras emulsões podem ser obtidas conforme descrito abaixo:

Emulsão LR3

Primeira Etapa:

A emulsão LR3 final é uma emulsão O/A contendo 33% de uma fase oleosa.

Fase oleosa (120 mL):

- Oleth-2 (Brij® 92)	: 6,24% p/v,
- Oleth-10 (Brij® 96)	: 2,76% p/v,
- Óleo de parafina (Marcol 82®)	: 89,50% v/v,
- Conservante	: 1,50%

v/v

Fase aquosa nº 1 (120 mL):

- Poloxamer 407 (Lutrol® F127)	: 1,20% p/v,
- Tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8)	: Q.S. para 100,0% v/v

Uma solução a 5% (p/v) de Lutrol® F127 no mesmo tampão que a vacina, por exemplo, em tampão isotônico de fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) foi usada para preparar a fase aquosa nº 1.

Quando a agitação parou, a emulsão mudou para uma emulsão de óleo em água. A emulsão foi colocada em uma câmara fria a 5°C durante

pelo menos 4 horas. Nesse estágio, a emulsão era uma pré-emulsão contendo 50% de fase oleosa.

Segunda Etapa: A fase aquosa nº 2 (120 mL) é constituída com o tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) e o(s) imunógeno(s). A pré-emulsão, conforme preparada na primeira etapa, foi resfriada a cerca de 5°C, diluída por adição de metade do volume de uma fase aquosa nº 2 à mesma temperatura, e misturada pela rotação de uma barra magnética durante 1 minuto. A concentração de surfactante final na emulsão LR3 é de 3,40% p/v.

Conforme aqui preparadas, as vacinas LR3 são estáveis durante pelo menos um ano a 5°C.

Emulsão BE1: A emulsão BE1 final é uma emulsão O/A contendo 33% de uma fase oleosa.

Fase oleosa (120 mL):

- Oleth-2 (Brij® 92)	: 3,0% p/v,
- Oleth-5 (Volpo® N5)	: 9,1%
p/v,	
- Óleo de parafina (Marcol 82®)	: 86,4% v/v,
- Conservante	: 1,5%

v/v

Fase aquosa nº 1 (240 mL):

- Tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) : Q.S. para 100,0% v/v

A fase aquosa nº 1 contém tampão isotônico contendo fosfato de dissódio e monopotássio a 0,02 M (pH 7,8) a 98,5% v/v e o(s) imunógeno(s). A emulsão BE1 não é diluída antes do uso. A concentração de surfactante final na emulsão BE1 é de 4% p/v.

Exemplo 2: Estabilidade das emulsões

As composições LR4 e LR3 eram estáveis mesmo na presença de imunógeno(s) concentrado(s) a 21°C durante pelo menos 9 meses. A distribuição de tamanho de partículas das emulsões não se alterou durante esse período de tempo.

Exemplo 3: Vacina combinada de *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV-2 – Composição e segurança em leitões

5                   Materiais e Métodos: Duas vacinas preparadas conforme descrito no Exemplo 1, contendo emulsão LR3 ou LR4, 12 Unidades de Antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado e 2,4 log<sub>10</sub> (Unidades de Antígeno) de circovírus suíno tipo 2 inativado / dose. Vinte e quatro (24) leitões, de três semanas de idade, foram aleatoriamente alocados em dois grupos. O grupo 2 de doze (12) leitões foi vacinado no dia ) com 4 mL da composição de vacina LR4 por via intramuscular. O grupo 1 corresponde ao grupo de controle não vacinado. Os leitões foram monitorizados diariamente. Duas semanas após a injeção, o sítio de injeção e as lesões locais são observados.

Tratamento	Choque e Reações Gerais	Hipertermia °C	Ganho de Peso Diário Médio Relativo	Tamanho da Reação Local (cm <sup>3</sup> )
Grupo 1 (controle)	Sem reação	-0,1 ± 0,3*	6,5 ± 1,9	0,0 ± 0,0
Grupo 2 (LR3)	Sem reação	0,6 ± 0,5	6,3 ± 1,3	1,8 ± 2,8
Grupo 3 (LR4)	Sem reação	0,1 ± 0,2	6,4 ± 1,7	8,4 ± 11,4

\* Média ± Desvio Padrão

15                   Resultados: adjuvantes LR3 e LR4 mostraram um bom perfil de segurança.

Exemplo 4: Resultados sorológicos após a administração de uma dose de vacina PCV-2 com adjuvante de emulsão LR4

20                   Materiais e Métodos: Uma vacina preparada conforme descrito no Exemplo 1, contendo emulsão LR4, CpG ODN nº 2216 50 µg / dose, 1,5 Unidades de Antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado e 1,5 log<sub>10</sub> (Unidades de Antígeno) de circovírus suíno tipo 2 inativado / dose. Quarenta (40) leitões, de três semanas de idade e com elevados anticorpos maternos preexistentes, foram aleatoriamente alocados em dois grupos. O grupo 2 de vinte (20) leitões foi vacinado no dia 0 com 0,5 mL da composição de vacina LR4 por via intradérmica com um injetor sem agulha. O grupo 1 corresponde

25

ao grupo de controle não vacinado. As amostras de sangue foram colhidas em D0, D21, D41, D63, D84, D126, D153 e D180 após a vacinação para titulação dos anticorpos contra PCV-2 ORF2 por ELISA.

Tratamento	D0	D21	D41	D63	D84	D126	D153	D180
Grupo 1	3,08 ± 0,58*	2,57 ± 0,50	2,15 ± 0,58	<1,51 ± 0,48	<1,51 ± 0,34	<1,51 ± 0,17	<1,51 ± 0,05	<1,51 ± 0,02
Grupo 2	2,91 ± 0,52	2,35 ± 0,52	2,44 ± 0,35	2,67 ± 0,50	2,60 ± 0,49	2,40 ± 0,49	2,48 ± 0,54	2,43 ± 0,54

\* Média ± Desvio Padrão (unidades log<sub>10</sub>)

- 5 Resultados: Conforme demonstrado na tabela a seguir, todas as vacinas mostraram uma resposta de anticorpos anti-PCV-2 ORF2 significativa de 7 a 180 dias após a vacinação, mesmo na presença de anticorpos maternos no momento de vacinação.

Exemplo 5: Método de Preparação de Helicobacter

- 10 Cultura: Culturas bacterianas foram cultivadas a partir de estoques em glicerol usando-se um inóculo de 5 - 10% em caldo de Brucella suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS). As culturas foram cultivadas em frascos com tampa ventilada em um incubador de gás triplo (85% de N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>) com agitação a cerca de 70 rpm a 37°C. No
- 15 momento da inoculação, placas de TSA + 5% de Sangue de Ovelha (SB) também foram riscadas como um teste diagnóstico para determinar a pureza da amostra. A morfologia da colônia era puntiforma e clara. Alguma hemólise foi observada nas placas deixadas no incubador durante 3-4 dias. As culturas levaram 24 - 36 horas para crescer até OD<sub>600</sub> > 1. As culturas cultivadas
- 20 também foram riscadas em placas de TSA + 5% SB, e testadas quanto à produção de catalase e urease (Helicobacter cerdo era positiva para ambas).

- Centrifugação: Culturas cultivadas até OD<sub>600</sub> > 1 foram distribuídas em alíquotas em garrafas de centrifuga estéreis e centrifugadas a 7.500 rpm durante 20 minutos com um rotor J10 Beckman a aproximadamente
- 25 8.600 g. O sobrenadante foi descartado, e os péletes de células foram lavados com 1 x solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os péletes foram ressuspendidos em PBS e distribuídos em alíquotas em frascos de vacina de 10 mL.

- Liofilização: Preparações de antígeno foram liofilizadas durante
- 30 36 horas sem estabilizadores ou conservantes. Observaram-se tortas bem-

formadas.

Digestão com pepsina: Uma solução de pepsina (0,1%) foi preparada em HCl a 10 mM e esterilizada por filtração duas vezes com um filtro de 0,2 microm. A preparação de antígeno liofilizada foi digerida com pepsina (1 µg de pepsina foi adicionado para cada mg de massa celular seca) durante 25 horas a 37°C e agitação suave. Amostras de 100 µL foram espalhadas sobre placas de TSA + 5% SB (incubadas a 37°C em um incubador microaerofílico de gás triplo) a 18 e 25 horas; nenhum crescimento foi observado após 96 horas, indicando que a digestão com pepsina tem um efeito de inativação.

Neutralização com PBS: As preparações de antígeno tinham um pH de cerca de 2,0 após a digestão com pepsina, de modo que foram neutralizadas com um volume a 2:1 de PBS. Após neutralização do pH, pH era de cerca de 7,0.

Exemplo 6: Formulações de preparações de antígeno preparadas com *Helicobacter cerdo* tratado com pepsina ou formalina

Formulam-se vacinas conforme mostrado na Tabela 1 extemporaneamente por dissolução das bactérias liofilizadas em 10 mL de adjuvante LR2 por frasco. Os valores refletem a concentração de cada ingrediente após a formulação. A emulsão LR2 é equivalente à emulsão LR4 descrita no Exemplo 1. Na emulsão LR2, a concentração final de Lutrol F127 é de 0,20% (p/v), em vez de 0,175% (p/v).

Tabela: Formulações de Vacina

Ingrediente	Componentes	Quantidade de Ingrediente mg por mL	Quantidade de Ingrediente mg por dose (2 mL)
PBS			
	NaCl	2	4
	KCl	0,05	0,1
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2875	0,575
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05	0,1
	H <sub>2</sub> O desionizada		
pepsina (solução)		3,5 µg	7,0 µg
	HCl	0,042	0,084
Células de <i>Helicobacter</i>		3,5	7,0

Exemplo 7: Animais e Métodos Para Vacinação com Vacinas à

## Base de H. cerdo

Os animais usados nesse estudo são porcos convencionais selecionados, que são livres de PRRSV, e livres de *M. hyopneumoniae*. Leitões convencionais são selecionados enquanto ainda com suas mães. Todos os pesos dos porcos são registrados. Os porcos são distribuídos em 2 grupos de pelo menos 5 porcos cada, com estratificação por peso, sexo e ninhada de origem. Todos os porcos são examinados para assegurar o estado de saúde. Apenas animais clinicamente saudáveis são incluídos no ensaio. Todos os porcos são identificados. Os porcos são vacinados em 1 semana e 2 semanas de idade, enquanto com suas mães. Um grupo de porcos é vacinado, e um grupo deixado como controle não vacinado. Os animais vacinados recebem 1 dose (2 mL por dose) por via intramuscular, como 0,5 mL em cada ombro e quadril. Os controles não vacinados não recebem nenhuma injeção.

Com 3 semanas de idade, todos os porcos são desmamados e desafiados. Cada grupo é alojado em gaiolas separadas em uma instalação de isolamento. Os porcos são necropsiados aproximadamente 28 dias após o desafio. Os porcos de controle negativo são necropsiados na dita de necrópsia final. O projeto experimental é resumido na Tabela 2.

Tabela 2: Projeto Experimental

Descrição do Tratamento	Desfio com Helicobacter	Sem desafio
Grupo vacinado	5 porcos	
Controles negativos		5 porcos

Procedimento de Desafio e avaliação: No caso de doença clínica grave, os tratamentos que são considerados para o bem-estar do animal podem ser administrados. Todos os números de etiqueta de orelha dos animais, data(s) de doença, diagnóstico presumido, regime de tratamento e disposição do animal são registrados. Nenhum tratamento é fornecido após o desafio. Animais moribundos ou com lesões sofrem eutanásia. Um animal não saudável (doença clínica ou lesão) pode ser retirado do estudo.

Sorologia e Testes cutâneos: Coleta-se sangue da veia cava anterior antes da vacinação, antes do desafio e na necrópsia. Os níveis de an-

ticorpos para *Helicobacter* são determinados. Efetuam-se testes cutâneos.

Parâmetros de Produção: Os porcos são pesados ao chegarem, antes da vacinação, antes do desafio e em cada necrópsia, para avaliar o ganho ou perda de peso em potencial.

5                   Necrópsia: Os porcos são necropsiados a 28 DPI conforme adaptado para desafio com *Helicobacter*.

Exemplo 8: Isolados de *Helicobacter*

Dois isolados bacterianos (2662 e 1268) foram recuperados da mucosa gástrica suína por cultura microaerofílica e passagem em placas de meio de Skirrow.

Com base na localização gástrica (cárdia e antro), morfologia (bastonetes Gram-negativos, curtos, curvos e "em forma de asa de gaivota"), atividade de urease, reatividade com um anticorpo anti-Hp de coelho, ambos os isolados foram classificados no gênero *Helicobacter* com base em SDS-PAGE e perfis de Western Blotting. O isolado 2662 se mostrou similar a *Helicobacter pylori* e recebeu o nome "*Helicobacter cerdo*". O isolado 1268 tinha um perfil distintivo, diferente do do 2662.

Exemplo 9: Carga Bacteriana Medida Pela Atividade de Urease

Tabela 3: Carga Bacteriana Medida Pela Atividade de Urease

Grupos	Atividade de Urease na Mucosa Gástrica			
	Nenhuma	Fraca	Moderada	Forte
Grupo vacinado	4*	0	2	-
Controles de Infecção	-	1	3	3

20                   \* Lesões macroscópicas no esôfago

Exemplo 10: Resposta Inflamatória Gástrica

A resposta inflamatória gástrica (Tabela 4) foi "contada" por folículos e infiltrados linfocíticos na lâmina própria gástrica em uma escala de 0, nenhuma; 1, leve; 2, moderada; e 3, grave. A contagem inflamatória total para cada porco foi calculada como a soma das contagens histológicas na cárdia e no antro gástricos. As contagens médias do grupo foram calculadas a partir dessas.

Tabela 4: Resposta Inflamatória Gástrica

Grupo Número	Contagem Total Média
Grupo Vacinado	3,6
Grupo de controle	4,4

## Exemplo 11: Respostas Sorológicas

Tabela 5: Respostas Sorológicas

Grupos	Dia 6	Primeira vacinação	Dia 14	Segunda vacinação	Dia 24	Dia 40
Grupo vacinado	1,0		1,3		81,0	86,5
Controles de infecção	1,0		0,8		1,3	4,5
Suivaxyn Myco hyo+H.cerdo	6,9		11,8		99,9	97,3
Controles	9,4		6,6		9,1	9,0

A vacina para H. cerdo apresentou bons índices de imunidade protetora com base na intensidade da atividade de urease, avaliação histológica cega de seções de tecido e as fortes respostas sorológicas. Uma vacina combinada compreendendo Suivaxyn, Mycoplasma hyopneumoniae e H. cerdo apresentou respostas de anticorpos similares.

A invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes parágrafos numerados:

- 10           1.       Uma emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
  - (1)       uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
  - (2)       um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
  - (3)       um óleo mineral;
  - 15       (4)       um surfactante hidrofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno (copolímero de blocos POE-POP) e/ou qualquer de suas combinações.
- 20           2.       Uma emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
  - (1)       uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
  - (2)       um surfactante lipofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno (copolímero de blocos POE-POP) e/ou qualquer de suas

combinações;

- (3) um óleo mineral;
  - (4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico.
3. Emulsão do parágrafo 1 ou 2 em que o álcool graxo etoxilado lipofílico compreende cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO).
- 5
4. Emulsão do parágrafo 2 em que o copolímero de blocos POE-POP lipofílico compreende cerca de 35% (p/p) ou menos de óxido de etileno.
- 10
5. Emulsão do parágrafo 2 em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico compreende mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno (EO).
6. Emulsão do parágrafo 1 em que o copolímero de blocos POE-POP hidrofílico compreende cerca de 55% (p/p) ou mais de óxido de etileno.
- 15
7. Emulsão do parágrafo 3 em que o o álcool graxo etoxilado é um álcool graxo C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um oleila, cetila, estearila, isostearila, álcool laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oléico e, mais vantajosamente, um óleo oleílico etoxilado com 1 a 4 EO.
- 20
8. Emulsão do parágrafo 5 em que o o álcool graxo etoxilado is um álcool graxo C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 5 a 21 EO.
- 25
9. Emulsão do parágrafo 4 em que o o copolímero de blocos POE-POP tem um PM de cerca de 1.000 a cerca de 8.000.
10. Emulsão do parágrafo 6 em que o o copolímero de blocos POE-POP tem um PM de cerca de 3000 a cerca de 16.000.
11. Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 10, em que
- 30
- o tensoativo hidrofílico não-iônico é um álcool graxo etoxilado.
12. Emulsão do parágrafo 11 em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 76, Brij® 56, Brij® 96/97, Brij® 98, Brij® 721, Brij® 58, Brij® 35, ,

Brij® 78 (Uniqema), Volpo® N5, Volpo® CS6, Volpo® CS12, Volpo® CS20, Volpo® CS25, Volpo® CS23 (Croda), BL9-EX, BC-7, , BT-5, BT-7, BT-9, BT-12, BD-10, BO-7V, BC5.5, BT-5, BL-21, BL-25, BC-15TX, BC-23, BC-25TX, BO-15V, BO-50V, BB-20, (Nikko Chemicals) ou qualquer de suas combinações.

13. Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 12 em que tensoativo hidrofílico não-iônico é um copolímero de bloco POE-POP.

14. Emulsão do parágrafo 13 em que o copolímero de blocos POE-POP é Lutrol® F127 [Poloxamer 407], Lutrol® F68 [Poloxamer 188], Lutrol® F108 [Poloxamer 338], Lutrol® F98 [Poloxamer 278], Lutrol® F87 [Poloxamer 227], Lutrol® F88 [Poloxamer 228], Lutrol® F77 [Poloxamer 207], Lutrol® F38 [Poloxamer 108] (BASF), Tetronics®T1307, Tetronics®T1107, Tetronics®T908 (BASF) ou qualquer de suas combinações.

15. Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 14, em que tensoativo lipofílico não-iônico é um álcool graxo etoxilado.

16. Emulsão do parágrafo 15 em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 30, Brij® 92/93, Brij® 72, Brij® 52 (Uniqema), Volpo® L3, Volpo® N3, Volpo® L4 (Croda), BS-4, BD-2, BD-4, BT-3 (Nikko Chemicals) qualquer de suas composições.

17. Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 16 em que o tensoativo lipofílico não-iônico é um copolímero de bloco POE-POP.

18. Emulsão do parágrafo 17 em que o o copolímero de blocos POE-POP é Pluronic® L121 [Poloxamer 401], Pluronic® L101 [Poloxamer 331], Pluronic® L81 [Poloxamer 221], Pluronic® L62 [Poloxamer 182], Pluronic® L43 [Poloxamer 123], Pluronic® P103 [Poloxamer 333], Pluronic® L123 [Poloxamer 403], Lutrol® L63 [Poloxamer 183], Lutrol® P122 [Poloxamer 402], Lutrol® L92 [Poloxamer 272], Lutrol® L72 [Poloxamer 202], Lutrol® L42 [Poloxamer 122], Lutrol® L61 [Poloxamer 181] (BASF), Tetronics®T1301, Tetronics®T701, Tetronics®T901 (BASF) ou qualquer de suas combinações.

19. Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 18, em que concentração total de tensoativos, em peso por volume de emulsão é de

cerca de 0,2 % a cerca de 6,5%, em particular de cerca de 1% a cerca de 6%, vantajosamente de cerca de 1,5% a cerca de 5%, mais vantajosamente de cerca de 2% a cerca de 3%.

- 5                   20.     Uma emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
- (1)     uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunógeno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
- (2)     um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
- (3)     um óleo mineral;
- (4)     um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compre-
- 10    endendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno (EO);
- (5)     um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compre-
- endendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno (EO).
21.     Emulsão do parágrafo 20, em que o álcool graxo etoxi-
- 15    lado hidrofílico não iônico compreendendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno (EO) é um álcool oleílico etoxilado com 5 a 14 EO.
22.     Emulsão do parágrafo 20 ou 21 em que o o álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p)
- 20    de óxido de etileno (EO) é um álcool oleílico etoxilado com 15 EO ou mais.
23.     Emulsão de qualquer um dos parágrafos 20 a 22, em que a concentração do álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compre-
- endendo mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno é de cerca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5%
- 25    a cerca de 4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v).
24.     Emulsão de qualquer um dos parágrafos 20 a 23, em que a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compre-
- endendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno é de cerca de
- 30    0,01% a cerca de 3,0%, particularmente de cerca de 0,05% a cerca de 2,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,1% a cerca de 2,0% (p/v).
25.     Emulsão de qualquer um dos parágrafos 20 a 24, em

que a concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é de cerca de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%, vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,2% (p/v).

- 5                    26.      Uma emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
- (1)      uma solução aquosa contendo um antígeno ou imunó-  
                      geno de vacina capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
- (2)      um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
- (3)      um óleo mineral;
- 10                    (4)      um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico;
- (5)      um copolímero de blocos de polioxietileno-  
                      polioxipropileno hidrofílico não iônico.

                      27.      Emulsão do parágrafo 26, em que o álcool graxo etoxi-  
                      lado hidrofílico é vantajosamente an álcool graxo etoxilado compreendendo  
15                    mais de cerca de 43% e menos de cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno.

                      28.      Emulsão do parágrafo 27, em que o o álcool graxo é um  
                      álcool oleílico etoxilado com 5 a 14 EO.

                      29.      Emulsão de qualquer um dos parágrafos 26 a 28, em  
                      que a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico é de cer-  
20                    ca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5% a cerca de  
                      4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa  
                      como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v).

                      30.      Emulsão de qualquer um dos parágrafos 26 a 29 em  
                      que a concentração de copolímero de polioxietileno-bloco de polioxipropileno  
25                    não-iônico hidrofílico é de cerca de 0,01% a cerca de 2,0%, mais particular-  
                      mente de cerca de 0,1% a cerca de 1,5% (p/v).

                      31.      Emulsão de qualquer um dos parágrafos 26 a 30 em  
                      que a concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é de cerca  
30                    de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%,  
                      vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de  
                      cerca de 0,2% a cerca de 1,2% (p/v).

                      32.      Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 31 em que

o a emulsão tem uma inversão de fase de temperatura (TIF) maior que ou igual a 25°C.

5           33.       Emulsão do parágrafo 32, em que o TIF é de cerca de 28°C a cerca de 65°C, mais particularmente de cerca de 33°C a cerca de 60°C.

10           34.       Emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 33 em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de óleo de fase incluindo o(s) óleo(s) os tensoativos, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de óleo de fase.

            35.       Emulsão do parágrafo 34, em que o óleo é um óleo mineral.

15           36.       Emulsão do parágrafo 35, em que o óleo mineral é um óleo de parafina como óleo isoparafínico e/ou óleo naftênico, esqualano, esqualeno, pristano, poliisobuteno , poliisobuteno hidrogenado , polideceno , poliisopreno , poliisopropeno e similares.

20           37.       Emulsão do parágrafo 34 ou 35 em que óleo mineral compreende uma cadeia de carbono ramificada ou linear com um número de átomos de carbono maior do que 15, vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos.

            38.       Emulsão do parágrafo 37 em que óleo é com nome comercial de MARCOL® 52 ou MARCOL® 82 (Esso,) ou "DRAKEOL® 6VR" (Penreco,):

25           39.       Emulsão de qualquer um dos parágrafos 34 a 38 em que o óleo é uma mistura de óleo compreendendo pelo menos dois óleos em qualquer proporção.

            40.       Emulsão do parágrafo 39 em que a mistura de óleo compreende pelo menos um óleo vegeta.

30           41.       Emulsão do parágrafo 40 em que o óleo vegetal representa de cerca de 0,1% a cerca de 33% da fase oleosa, vantajosamente de cerca de 5% a cerca de 15% v/v.

42. Emulsão do parágrafo 40 ou 41, em que o óleo vegetal é óleo de castanha, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de prímula.

43. Uma emulsão compreendendo um óleo de parafina; um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico; um álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO como surfactante hidrofílico não iônico; e um copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80% EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 como surfactante hidrofílico não iônico.

44. Emulsão do parágrafo 43, em que o óleo de parafina está a uma concentração de cerca de 5% a cerca de 50% e, vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,1% a 1,5%, vantajosamente de 0.1% a 1.2% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO está à concentração de 1% a 5%, vantajosamente de 1% a 4% (p/v); e o copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 está à concentração de 0,01% a 2%, vantajosamente de 0,05% a 1,5% (p/v).

45. Uma emulsão compreendendo um óleo de parafina, um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico; um álcool oleílico etoxilado com 10 OE como surfactante hidrofílico não iônico; e um copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 como surfactante hidrofílico não iônico.

46. Emulsão do parágrafo 45, em que o óleo de parafina está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 30% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,2% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 10 EO está à concentração de 0,2 % a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); e o copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80 % EO e um PM em torno de 9.800 a 16.000 está à concentração de 0,01% a 2%, vantajosamente de 0,05% a 1,5% (p/v).

47. Uma emulsão compreendendo um óleo de parafina, um álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico e

um álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 OE como surfactante hidrofílico não iônico.

48. Emulsão do parágrafo 47, em que o óleo de parafina está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 35% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está à concentração de 0,1% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 2% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 5 - 6 EO está à concentração de 1% a 5%, vantajosamente de 2,0% a 4,5% (p/v).

49. Método para preparar uma composição de vacina compreendendo misturar um antígeno de vacina ou imunógeno capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro com uma emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 48.

50. Método para induzir uma resposta imune em um hospedeiro compreendendo administrar a emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 48 ou a composição de vacina do parágrafo 49 ao hospedeiro.

51. Um Kit para realizar o método do parágrafo 49 ou 50 compreendendo a emulsão de qualquer um dos parágrafos 1 a 48 ou a composição de vacina do parágrafo 49 e instruções para realizar o método.

Tendo, desse modo, descrito e detalhado modalidades vantajosas da presente invenção, deve ser entendido que a invenção definida pelos parágrafos acima não está limitada a detalhes particulares descritos no relatório descritivo, assim como variações dos padrões são possíveis sem distanciarem-se do espírito ou escopo da presente invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
- 5 (1) uma solução aquosa contendo um antígeno de vacina ou imunógeno capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
- (2) um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico;
- (3) um óleo mineral;
- (4) um surfactante hidrofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno (copolímero de blocos POE-POP) e/ou qualquer combinação desses.
- 10 2. Emulsão de óleo em água (O/A) compreendendo:
- (1) uma solução aquosa contendo um antígeno de vacina ou imunógeno capaz de induzir uma resposta imune em um hospedeiro;
- (2) um surfactante lipofílico não iônico selecionado do grupo de álcool graxo etoxilado, copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno (copolímero de blocos POE-POP) e/ou qualquer combinação desses;
- 15 (3) um óleo mineral;
- (4) um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico.
3. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que o álcool graxo etoxilado lipofílico compreende cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO), ou
- 20 em que o copolímero de blocos POE-POP hidrofílico compreende cerca de 55% (p/p) ou mais de óxido de etileno, ou em que o álcool graxo etoxilado lipofílico compreende cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO), e
- 25 em que o álcool graxo etoxilado é um álcool graxo de C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 1 a 4 EO, ou
- 30 em que o copolímero de blocos POE-POP hidrofílico compreende cerca de 55% (p/p) ou mais de óxido de etileno, e em que o copolímero de blocos POE-POP tem um PM de

cerca de 3.000 a cerca de 16.000, ou

em que o surfactante hidrofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, ou

em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico compreende mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno, ou

em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico compreende mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno, e em que o álcool graxo etoxilado é um álcool graxo de C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 5 a 21 EO, ou

em que o surfactante hidrofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, e

em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 76, Brij® 56, Brij® 96/97, Brij® 98, Brij® 721, Brij® 58, Brij® 35, Brij® 78 (Uniqema), Volpo® N5, Volpo® CS6, Volpo® CS12, Volpo® CS20, Volpo® CS25, Volpo® CS23 (Croda), BL9-EX, BC-7, BT-5, BT-7, BT-9, BT-12, BD-10, BO-7V, BC5.5, BT-5, BL-21, BL-25, BC-15TX, BC-23, BC-25TX, BO-15V, BO-50V, BB-20 (Nikko Chemicals) ou qualquer combinação desses, ou

em que o surfactante hidrofílico não iônico é um copolímero de blocos POE-POP, ou

em que o surfactante hidrofílico não iônico é um copolímero de blocos POE-POP, e

em que o copolímero de blocos POE-POP é Lutrol® F127 [Poloxamer 407], Lutrol® F68 [Poloxamer 188], Lutrol® F108 [Poloxamer 338], Lutrol® F98 [Poloxamer 278], Lutrol® F87 [Poloxamer 227], Lutrol® F88 [Poloxamer 228], Lutrol® F77 [Poloxamer 207], Lutrol® F38 [Poloxamer 108] (BASF), Tetronics®T1307, Tetronics®T1107, Tetronics®T908 (BASF) ou qualquer combinação desses, ou

em que o surfactante lipofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, ou

em que o surfactante lipofílico não iônico é um álcool graxo

etoxilado, e

em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 30, Brij® 92/93, Brij® 72, Brij® 52 (Uniqema), Volpo® L3, Volpo® N3, Volpo® L4 (Croda), BS-4, BD-2, BD-4, BT-3 (Nikko Chemicals) ou qualquer composição dessas, ou

5 em que a concentração global de surfactantes, em peso por volume de emulsão é de cerca de 0,2% a cerca de 6,5%, em particular de cerca de 1% a cerca de 6%, vantajosamente de cerca de 1,5% a cerca de 5%, mais vantajosamente de cerca de 2% a cerca de 3%.

4. Emulsão, de acordo com a reivindicação 2, em que o álcool graxo etoxilado lipofílico compreende cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO), ou

em que o copolímero de blocos POE-POP lipofílico compreende cerca de 35% (p/p) ou menos de óxido de etileno, ou

15 em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico compreende mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno (EO), ou

em que o álcool graxo etoxilado lipofílico compreende cerca de 43% do peso molecular (p/p) ou menos de óxido de etileno (EO), e

em que o álcool graxo etoxilado é um álcool graxo de C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 1 a 4 EO, ou

em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico compreende mais de cerca de 43% (p/p) de óxido de etileno (EO), e

25 em que o álcool graxo etoxilado é um álcool graxo de C9 a C22 e vantajosamente selecionado do grupo que consiste em um álcool oleílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, laurílico, e suas combinações, vantajosamente um álcool oleílico e, mais vantajosamente, um álcool oleílico etoxilado com 5 a 21 EO, ou

30 em que o copolímero de blocos POE-POP lipofílico compreende cerca de 35% (p/p) ou menos de óxido de etileno, e

em que o copolímero de blocos POE-POP tem um PM de

- cerca de 1.000 a cerca de 8.000, ou
- em que o surfactante hidrofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, ou
  - em que o surfactante hidrofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, e
  - em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 76, Brij® 56, Brij® 96/97, Brij® 98, Brij® 721, Brij® 58, Brij® 35, Brij® 78 (Uniqema), Volpo® N5, Volpo® CS6, Volpo® CS12, Volpo® CS20, Volpo® CS25, Volpo® CS23 (Croda), BL9-EX, BC-7, BT-5, BT-7, BT-9, BT-12, BD-10, BO-7V, BC5.5, BT-5, BL-21, BL-25, BC-15TX, BC-23, BC-25TX, BO-15V, BO-50V, BB-20, (Nikko Chemicals) ou qualquer combinação desses, ou
  - em que o surfactante lipofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, ou
  - em que o surfactante lipofílico não iônico é um álcool graxo etoxilado, e
  - em que o álcool graxo etoxilado é Brij® 30, Brij® 92/93, Brij® 72, Brij® 52 (Uniqema), Volpo® L3, Volpo® N3, Volpo® L4 (Croda), BS-4, BD-2, BD-4, BT-3 (Nikko Chemicals) ou qualquer composição dessas, ou
  - em que o surfactante lipofílico não iônico é um copolímero de blocos POE-POP, ou
  - em que o surfactante lipofílico não iônico é um copolímero de blocos POE-POP, e
  - em que o copolímero de blocos POE-POP é Pluronic® L121 [Poloxamer 401], Pluronic® L101 [Poloxamer 331], Pluronic® L81 [Poloxamer 221], Pluronic® L62 [Poloxamer 182], Pluronic® L43 [Poloxamer 123], Pluronic® P103 [Poloxamer 333], Pluronic® L123 [Poloxamer 403], Lutrol® L63 [Poloxamer 183], Lutrol® P122 [Poloxamer 402], Lutrol® L92 [Poloxamer 272], Lutrol® L72 [Poloxamer 202], Lutrol® L42 [Poloxamer 122], Lutrol® L61 [Poloxamer 181] (BASF), Tetronics®T1301, Tetronics®T701, Tetronics®T901 (BASF) ou qualquer combinação desses, ou
  - em que a concentração global de surfactantes, em peso por volume de emulsão é de cerca de 0,2% a cerca de 6,5%, em particular de

cerca de 1% a cerca de 6%, vantajosamente de cerca de 1,5% a cerca de 5%, mais vantajosamente de cerca de 2% a cerca de 3%.

5 5. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que o surfactante hidrofílico não iônico compreende um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo mais do que cerca de 43% e menos do que cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno (EO) e um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno (EO).

10 6. Emulsão, de acordo com a reivindicação 5, em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo mais do que cerca de 43% e menos do que cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno (EO) é um álcool oléico etoxilado com 5 a 14 EO, ou

15 em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno (EO) é um álcool oléico etoxilado com 15 EO ou mais, ou

20 em que a concentração do álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo mais do que cerca de 43% e menos do que cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno é de cerca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5% a cerca de 4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v), ou

25 em que a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico compreendendo cerca de 71% ou mais (p/p) de óxido de etileno é de cerca de 0,01% a cerca de 3,0%, particularmente de cerca de 0,05% a cerca de 2,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,1% a cerca de 2,0% (p/v), ou

30 em que a concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é de cerca de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%, vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,2% (p/v).

7. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que o surfactante hidrofílico não iônico compreende um álcool graxo etoxilado

hidrofílico não iônico e um copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno hidrofílico não iônico.

8. Emulsão, de acordo com a reivindicação 7, em que o álcool graxo etoxilado hidrofílico é vantajosamente um álcool graxo etoxilado compreendendo mais do que cerca de 43% e menos do que cerca de 71% (p/p) de óxido de etileno, ou

em que o álcool graxo é um álcool oléico etoxilado com 5 a 14 EO, ou

em que a concentração de álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico é de cerca de 1,0% a cerca de 5,0%, em particular de cerca de 1,5% a cerca de 4,5%, mais vantajosamente de cerca de 2,0% a cerca de 3,5%, expressa como uma porcentagem em peso por volume de emulsão (p/v), ou

em que a concentração do copolímero de blocos de polioxietileno-polioxipropileno hidrofílico não iônico é de cerca de 0,01% a cerca de 2,0%, mais particularmente de cerca de 0,1% a cerca de 1,5% (p/v), ou

em que a concentração do álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico é de cerca de 0,1% a cerca de 2,5%, em particular de cerca de 0,2% a cerca de 2,0%, vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,5%, mais vantajosamente de cerca de 0,2% a cerca de 1,2% (p/v).

9. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que a emulsão tem uma temperatura de inversão de fase (TIF) maior do que ou igual a 25°C, ou

em que a emulsão tem uma temperatura de inversão de fase (TIF) maior do que ou igual a 25°C, e

em que o TIF é de cerca de 28°C a cerca de 65°C, mais particularmente de cerca de 33°C a cerca de 60°C.

10. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de

8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%,  
5 vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%,  
10 vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, e

em que o óleo mineral é um óleo parafínico como óleo isoparafínico e/ou óleo naftênico, esqualano, esqualeno, pristano, poliisobuteno, poliisobuteno hidrogenado, polideceno, poliisopreno, poliisopropeno e similares, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%,  
20 vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral e

em que o óleo mineral compreende uma cadeia de carbonos linear ou ramificada com um número de átomos de carbono maior do que 15, vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%,  
30 vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

- em que o óleo é um óleo mineral, e
- em que o óleo mineral compreende uma cadeia de carbonos linear ou ramificada com um número de átomos de carbono maior do que 15, vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos, e
- 5 em que o óleo é comercializado sob o nome MARCOL® 52 ou MARCOL® 82 (Esso) ou "DRAKEOL® 6VR" (Penreco), ou
- em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo menos dois óleos em qualquer proporção, ou
- em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo
- 10 menos dois óleos em qualquer proporção, e
- em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo vegetal, ou
- em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo menos dois óleos em qualquer proporção, e
- 15 em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo vegetal, e
- em que o óleo vegetal representa de cerca de 0,1% a cerca de 33% da fase oleosa, vantajosamente de cerca de 5% a cerca de 15% v/v,
- em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo
- 20 menos dois óleos em qualquer proporção, e
- em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo vegetal, e
- em que o óleo vegetal é óleo de amendoim, óleo de noz, óleo de girassol, óleo de açafraão, óleo de soja, óleo de primula e similares.
- 25 11. Emulsão, de acordo com a reivindicação 2, em que a emulsão tem uma temperatura de inversão de fase (TIF) maior do que ou igual a 25°C, ou
- em que a emulsão tem uma temperatura de inversão de fase (TIF) maior do que ou igual a 25°C, e
- 30 em que o TIF é de cerca de 28°C a cerca de 65°C, mais particularmente de cerca de 33°C a cerca de 60°C.
12. Emulsão, de acordo com a reivindicação 2, em que a

emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, e

em que o óleo mineral é um óleo parafínico como óleo isoparafínico e/ou óleo naftênico, esqualano, esqualeno, pristano, poliisobuteno, poliisobuteno hidrogenado, polideceno, poliisopreno, poliisopropeno e similares, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s) óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%, vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, e

em que o óleo mineral compreende uma cadeia de carbonos linear ou ramificada com um número de átomos de carbono maior do que 15, vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos, ou

em que a emulsão compreende em volume por volume (v/v) de emulsão, de cerca de 2% a cerca de 50% de fase oleosa incluindo o(s)

óleo(s) e os surfactantes, em particular de cerca de 4% a cerca de 40%,  
vantajosamente de cerca de 8% a cerca de 35% e, mais vantajosamente, de  
cerca de 15% a cerca de 30% de fase oleosa, e

em que o óleo é um óleo mineral, e

5 em que o óleo mineral compreende uma cadeia de carbonos  
linear ou ramificada com um número de átomos de carbono maior do que 15,  
vantajosamente de 15 a 32, e livre de compostos aromáticos, e

em que o óleo é comercializado sob o nome MARCOL® 52 ou  
MARCOL® 82 (Esso) ou "DRAKEOL® 6VR" (Penreco), ou

10 em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo  
menos dois óleos em qualquer proporção, ou

em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo  
menos dois óleos em qualquer proporção, e

15 em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo  
vegetal, ou

em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo  
menos dois óleos em qualquer proporção, e

em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo  
vegetal, e

20 em que o óleo vegetal representa de cerca de 0,1% a cerca de  
33% da fase oleosa, vantajosamente de cerca de 5% a cerca de 15% v/v,

em que o óleo é uma mistura de óleos compreendendo pelo  
menos dois óleos em qualquer proporção, e

25 em que a mistura de óleos compreende pelo menos um óleo  
vegetal, e

em que o óleo vegetal é óleo de amendoim, óleo de noz, óleo  
de girassol, óleo de açafraão, óleo de soja, óleo de prímula e similares.

30 13. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, em que o  
antígeno ou imunógeno de vacina é Mycoplasma hyopneumoniae, porcine  
circovirus 2 ou Helicobacter pylori.

14. Emulsão, de acordo com a reivindicação 2, em que o  
antígeno ou imunógeno de vacina é Mycoplasma hyopneumoniae, porcine

circovirus 2 ou Helicobacter pylori.

15. Emulsão compreendendo um óleo parafínico, um álcool oléico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico; um álcool oléico etoxilado com 10 OE como surfactante hidrofílico não iônico; e um copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80% de EO e um PM de cerca de 9.800 a 16.000 como surfactante hidrofílico não iônico.

16. Emulsão, de acordo com a reivindicação 15, em que o óleo parafínico está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 30% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está a uma concentração de 0,2% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 10 EO está a uma concentração de 0,2% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 3% (p/v); e o copolímero de blocos POE-POP com aproximadamente 70 a 80% de EO e um PM de cerca de 9.800 a 16.000 está a uma concentração de 0,01% a 2%, vantajosamente de 0,05% a 1,5% (p/v).

17. Emulsão compreendendo um óleo parafínico, um álcool oléico etoxilado com 2 - 3 EO como surfactante lipofílico não iônico e um álcool oléico etoxilado com 5 - 6 OE como surfactante hidrofílico não iônico.

18. Emulsão, de acordo com a reivindicação 17, em que o óleo parafínico está a uma concentração de 5% a 50%, vantajosamente de 15% a 35% (v/v); o álcool oleílico etoxilado com 2 - 3 EO está a uma concentração de 0,1% a 3%, vantajosamente de 0,5% a 2% (p/v); o álcool oleílico etoxilado com 5-6 EO está a uma concentração de 1% a 5%, vantajosamente de 2,0% a 4,5% (p/v).

19. Composição compreendendo a emulsão, como definida na reivindicação 15, e um antígeno ou imunógeno de vacina, em que o antígeno ou imunógeno de vacina é Mycoplasma hyopneumoniae, porcine circovirus 2 ou Helicobacter pylori.

20. Composição compreendendo a emulsão, como definida na reivindicação 17, e um antígeno ou imunógeno de vacina, em que o antígeno ou imunógeno de vacina é Mycoplasma hyopneumoniae, porcine circovirus 2 ou Helicobacter pylori.

## RESUMO

Patente de Invenção: "**FORMULAÇÕES DE VACINA**".

A presente invenção refere-se a emulsões de óleo em água, seu uso como adjuvantes e composições farmacêuticas, imunológicas ou de vacina que possam compreendê-las. Em uma modalidade, a emulsão de óleo em água (O/A) pode compreender uma solução aquosa contendo um imunógeno, um óleo mineral, um álcool graxo etoxilado lipofílico não iônico e um surfactante hidrofílico não iônico. Em outra modalidade, a emulsão de óleo em água (O/A) pode compreender uma solução aquosa contendo um imunógeno, um surfactante lipofílico não iônico, um óleo mineral e um álcool graxo etoxilado hidrofílico não iônico. A presente invenção também engloba um método de preparação de uma composição de vacina usando o adjuvante da presente invenção, a composição de vacina assim obtida e métodos de uso.