



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1104358-0 B1



(22) Data do Depósito: 14/10/2011

(45) Data de Concessão: 01/06/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES ADJUVANTES, NA FORMA DE EMULSÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS, PARA AUMENTAR A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS

(51) Int.Cl.: A61K 39/39; A61K 9/107; A61P 37/04.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): MARCO ANTONIO STEPHANO; MARMEN ALMEIDA CARVALHO; CELSO PEREIRA CARICATI.

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES ADJUVANTES, NA FORMA DE EMULSÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS, PARA AUMENTAR A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS. A presente invenção se refere a composições adjuvantes, a partir de óleos vegetais puros ou blends, na forma de emulsões simples ou múltiplas, para aumentar a resposta imunológica em animais. A emulsão obtida consiste de uma parte oleosa que varia de 45% a 85% e de outra aquosa que varia de 15% a 55%, sendo a composição da parte oleosa (COT) constituída de 70 a 97% de óleos vegetais e de 3% a 30% de surfactantes.

COMPOSIÇÕES ADJUVANTES, NA FORMA DE EMULSÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS, PARA AUMENTAR A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere a composições adjuvantes, entre óleos puros (originados somente de uma espécie vegetal) ou em misturas de diferentes óleos vegetais (blends), na forma de emulsões simples ou múltiplas, para aumentar a resposta imunológica em animais.

Estado da técnica

[002] Adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que impulsionam a potência e longevidade de uma resposta imune específica a antígenos. Um bom adjuvante deve causar toxicidade mínima e efeitos imunológicos duradouros por si mesmos. São essenciais na indução e modificação da resposta imune e, por isso, uma variedade de substâncias está disponível para esta finalidade.

[003] O desenvolvimento de uma vacina ou de um antígeno requer primariamente a identificação de frações imunológicas responsáveis pela proteção, isto é, o mecanismo imunológico efetivo responsável pela proteção contra doenças e subsequentemente a seleção de um antígeno capaz de obter a resposta adaptativa desejada. Identificado o antígeno apropriado, é essencial fornecê-lo eficientemente ao sistema imunológico do hospedeiro.

[004] As vacinas podem ser classificadas de diversas formas. Contudo, uma classificação usual é a capacidade dos componentes vacinais se replicarem ou não no hospedeiro, ou seja, vacinas vivas atenuadas ou patógenos inativados, respectivamente. Na segunda categoria estão incluídas as vacinas derivadas de subunidades. Estas, por sua vez, são bem mais seguras do que os outros tipos de vacinas, porém, devido a sua fraca imunogenicidade, requerem com frequência a utilização de adjuvantes para obter uma resposta imune desejada. Portanto, o adjuvante interfere diretamente no mecanismo de ação da vacina, uma vez que com o auxílio do adjuvante, uma dose menor de antígeno

é necessária para estimular a resposta imunológica, diminuindo assim o custo da produção de vacinas. Na ausência de um adjuvante, a carência da resposta imunológica pode ser grave, levando as células T imaturas antígeno-específico a reconhecer o antígeno de forma não eficiente, levando a uma tolerância.

[005] Os adjuvantes são utilizados com a finalidade de aumentar a imunogenicidade de um antígeno recombinante ou altamente purificado; reduzir a quantidade de antígenos ou o número de imunizações necessárias para uma imunidade protetora; aumentar a eficácia de uma vacina em recém-nascidos, idosos ou pessoas imunologicamente comprometidas; atuar como sistema de fornecimento de antígeno para estes serem absorvidos por mucosas.

[006] Diversos fatores estão envolvidos na resposta imune para que um adjuvante seja caracterizado. Entre estes fatores estão o antígeno, a espécie a ser vacinada, a via de administração e, provavelmente, o efeito adverso que ele pode causar. O adjuvante ideal é aquele que possui estabilidade, biodegradabilidade, baixo custo de produção, que não tenha como principal efeito adverso a indução de doenças autoimunes e que produza uma apropriada resposta imune celular ou humoral.

[007] O maior problema que pode ocorrer quando se adiciona um adjuvante numa formulação de vacina está na possibilidade deste induzir reações adversas. Tais reações podem ser locais ou sistêmicas. As reações locais geralmente se caracterizam por dor, inflamação local, edema, necrose, linfadenopatia, granuloma, úlcera e geração de abscessos estéreis. As reações sistêmicas incluem náuseas, febre, artrite, uveíte, eosinofilia, alergia, anafilaxia, toxicidade em órgãos específicos (fígado e pulmão) e imunotoxicidade (ex: liberação de citocinas imunossupressoras ou doenças autoimunes).

[008] Classicamente, os exemplos de adjuvantes mais conhecidos são sais de alumínio ou cálcio, compostos tensoativos (saponinas), emulsões, blocos de polímeros não iônicos, derivados de lipopolissacarídeos, micobactérias e muitos outros, capazes de favorecer ou ampliar a etapa particular dos eventos imunológicos e finalmente iniciar uma resposta mais eficiente.

[009] Dentre os tipos de adjuvantes citados acima, apenas as emulsões serão o foco da invenção.

[010] Pode-se definir como emulsão toda mistura de duas substâncias (ou tipos de substâncias) imiscíveis. Uma substância é dispersa noutra substância de fase contínua e estabilizada por uma ou diversas substâncias surfactantes ou emulsificadoras, presentes na interface das duas fases. Os agentes surfactantes podem ser definidos pelo valor de seu balanço ou equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) que informa suas relativas afinidades às diferentes fases: dos diferentes surfactantes (e valores) aos diferentes tipos de emulsões. Aqueles com baixo valor EHL (maior afinidade a fases oleosas), se inclinam a formar emulsões água-em-óleo, onde o antígeno se encontra diluído em partículas dispersas em uma fase contínua de óleo. Os surfactantes com alto valor EHL têm maior afinidade para fases aquosas gerando emulsões óleo-em-água, onde o óleo constitui uma fase dispersa na fase contínua de água. Já no caso de um valor EHL intermediário, dispersões água-em-óleo-em-água podem ser obtidas. Neste caso, uma fase oleosa contendo pequenas partículas de solução aquosa está dispersa numa fase contínua de água.

[011] As emulsões de óleo têm sido utilizadas como adjuvantes para vacinas desde muito tempo. Le Moignic e Pinoy descobriram em 1916 que uma suspensão de *Salmonella typhimurim* morta em óleo mineral aumentava a resposta imunológica. Em 1925, Ramon descreveu o óleo de amido como uma das substâncias que aumentam a resposta antitóxica para o toxoide da difteria. Entretanto, as emulsões de óleo não se tornaram populares até 1956 quando Freund apareceu com sua formulação adjuvante conhecida como Adjuvante Completo de Freund (CFA). O CFA é uma emulsão de água-em-óleo composta de óleo mineral (parafina) misturado com Micobacteria morta e Arlacel A. Arlacel A. é principalmente monooleato de manida e é utilizado como agente emulsificante.

[012] Embora o CFA seja excelente na indução de uma resposta de anticorpos, ele causa muita dor, formação de abscesso, febre e inflamação

granulomatosa. Para evitar estas reações colaterais indesejáveis, foi desenvolvido o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA). O IFA é similar ao FCA em sua composição exceto pela ausência de componentes micobacterianos. O IFA atua através da formulação de depósito no local da injeção e da liberação lenta do antígeno com estímulo de células produtoras de anticorpos. Muitos dos efeitos adversos dos adjuvantes, completo e incompleto, de Freund são creditados ao óleo mineral. Isto se deve ao fato do óleo mineral não ser biodegradável, podendo assim formar lesões ulcerativas no local da injeção.

[013] Outra abordagem para melhorar o CFA foi baseada na noção de que a substituição do óleo mineral por um óleo biocompatível ajudaria a eliminar as reações associadas com o CFA no local da injeção. Acreditava-se que a emulsão devia ser de óleo-em-água ao invés de água-em-óleo, porque a última produz um depósito de longa duração no local da injeção.

[014] Hilleman e outros descreveram um adjuvante com base em óleo "Adjuvante 65", que consiste em 86% de óleo de amendoim, 10% de Arlacel A. como emulsificante e 4% de monoestearato de alumínio com estabilizante (Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182).

[015] Hilleman e Beale, em New Approaches to Vaccine Development de 1983 (Eds. Bell, R. e Torrigiani, G.), Schwabe, Basel descreveram que em humanos, o Adjuvante 65 era seguro e potente, mas exibia menos característica adjuvante que o IFA. Todavia, o uso do Adjuvante foi descontinuado por causa da capacidade de reação para o ser humano em certos lotes de vacina e da redução na característica adjuvante quando um emulsificante purificado ou sintético era utilizado no lugar de Arlacel A.

[016] Fukumi (1967) utilizou óleo vegetal (gergelim) com a vacina da gripe e encontrou menor capacidade imunogênica que a vacina com óleo mineral, experiência semelhante de um grupo com o óleo de amendoim (Pollock, T. M.-Relato não publicado, 1967, à Medical Research Council's Committee on

Influenza and Other Respiratory Virus Vaccines).

[017] Os adjuvantes em emulsões óleo-em-água vêm adquirindo cada vez mais espaço na busca de vacinas seguras, eficientes e eficazes para humanos e animais.

[018] O PI 0509606-5 descreve emulsões de óleo-em-água utilizadas como adjuvantes para vacinas cuja finalidade é aumentar a imunogenicidade de antígenos. Os adjuvantes emulsificantes utilizados são detergentes não iônicos e iônicos. O documento descreve ainda composições para vacinas contendo um antígeno combinado com tais emulsões intrínseca ou extrinsecamente. São também descritos processos de preparação das emulsões e vacinas utilizando um equipamento denominado microfluizador o qual trabalha com pressões de até 20.00 psi a fim de obter um tamanho ideal de micela que é altamente importante no processo descrito.

[019] O PI 0517124-5 relata uma composição farmacêutica em forma de isotrópico oleoso (mistura ternária óleo/tensoativo/fase aquosa) que pode ser utilizada como vacina. Os óleos utilizados são de origem mineral, animal, sintético e vegetal, sendo que os óleos vegetais não são adjuvantes, pois contêm substâncias anti-inflamatórias. Além disso, o principal óleo utilizado na formulação é o esqualeno. O documento relata também o processo de preparação da referida composição vacinal.

[020] O documento US 5,814,321 também descreve emulsões como adjuvante de vacinas. Em todas as formulações exemplificadas usa-se o esqualeno como óleo de preferência.

[021] O documento US 5,961,970 se refere a uma composição adjuvante de vacina obtida de micelas emulsificadas na razão submicrométrica, ou seja, entre 1,0 a 0,1 micrometros, as quais utilizam colesterol e fosfolipídeos para estabilizar as micelas.

[022] O documento US 6,299,884 se refere a uma composição adjuvante, compreendendo um óleo metabolizável e um agente emulsificante, onde o óleo e o detergente estão presentes na forma de emulsão óleo em água

tendo gotículas de óleo substancialmente menores que 1 micron de diâmetro. O óleo utilizado é o esqualeno associado a um potente imunopotencializador que no caso é o muramil-di-peptídeo isolado do *Micobacterium* sp.

[023] A publicação internacional WO 2005/072679 diz respeito a formulações oleosas utilizando óleo de jojoba. Ditas formulações podem ser usadas na indústria farmacêutica como formulações de vacina preventiva ou terapêutica.

[024] A publicação internacional WO 2011/067224 refere-se a uma vacina aviária, a New Castle, usando adjuvante oleoso, que no caso é o esqualeno.

[025] O documento JP 20010151699 faz referência a um adjuvante oleoso para vacinas para animais, podendo o adjuvante oleoso ser à base de óleo animal ou óleo vegetal tal como: óleo de abacate, óleo de oliva, óleo de sésamo, óleo de farelo de arroz, óleo de gérmen de milho, óleo de gérmen de trigo, óleo de cártamo, óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola, óleo de palma, óleo de coco, óleo de nozes de macadâmia, óleo de *Oenotherae biennis*, e óleo de jojoba e consistindo de uma emulsão do tipo água em óleo contendo éster de ácido graxo de açúcar ou álcool de açúcar, e não contendo um emulsificante que tenha estrutura de polioxialquilenos na molécula.

[026] Despontando como um dos maiores e mais bem sucedidos exportadores mundiais do setor de carnes, o Brasil enfrenta diversas limitações referentes à sanidade dos animais, doenças infecciosas, rastreabilidade. Neste contexto e devido às exigências por parte dos países importadores, fez-se necessária a melhoria na qualidade dos insumos envolvidos na produção das vacinas a fim de diminuir as reações inflamatórias oriundas da vacinação em bovinos que são causas frequentes de preocupação entre os criadores e empresários que atuam no segmento de carnes e derivados, em decorrência das significativas perdas econômicas devido à presença de extensos abscessos na musculatura.

[027] Portanto, a presente invenção busca testar diversos óleos de

origem vegetal em distintas características a fim de substituir a maioria dos óleos minerais utilizados na produção de vacinas uma vez que estes possuem um tempo residual ao organismo extremamente elevado, além de diversos indícios de toxicidade e de origem de reações autoimunológicas. Já os óleos vegetais não apresentam este problema.

Sumário da invenção

[028] A presente invenção tem como principal objetivo descrever composições adjuvantes, entre óleos vegetais puros ou blends, na forma de emulsões simples ou múltiplas, a serem utilizadas no preparo de vacinas para potencialização da resposta imunológica humoral e celular a partir de antígenos vacinais empregados em qualquer espécie animal. A emulsão obtida consiste de uma parte oleosa que varia de 45% a 85% e de outra aquosa que varia de 15% a 55%, sendo a composição da parte oleosa (COT) constituída de 70 a 97% de óleos vegetais e de 3% a 30% de surfactantes.

Breve descrição das figuras

[029] A Figura 1 demonstra o comparativo da evolução linear da concentração de anticorpos Anti-BSA em camundongos das diversas composições adjuvantes de óleos vegetais e uma emulsão de óleo mineral comercial.

Descrição detalhada da invenção

[030] Os óleos, entre comerciais e amazônicos, foram obtidos de diferentes empresas fornecedoras. Os óleos comerciais foram adquiridos sem a adição de antioxidantes para diminuir uma possível interferência nos testes imunológicos. Os óleos amazônicos foram fornecidos em seu estado bruto (pós-extração e sem qualquer tipo de beneficiamento, apenas filtração de partículas grosseiras). Todos os óleos aqui designados sem caracterização de refinado se referem a óleos em estado de extração bruto (nas suas diversas formas), sem adição de conservantes ou antioxidantes. Os óleos brutos e/ou virgens são os mais indicados para a elaboração das composições adjuvantes objetos desta patente.

[031] Óleos refinados e semirrefinados podem ser utilizados para elaboração das composições adjuvantes em até 50% do total de óleos utilizados, contudo, preferencialmente, não devem ter sofrido adição de antioxidantes. Ainda assim, a composição deverá sofrer adição de alfa-tocoferol para manter a ação adjuvante inesperada identificada nos óleos vegetais. O alfa-tocoferol possui fraca ação antioxidante quando comparada às outras moléculas de tocoferóis e tocotrienóis (outras moléculas de vitamina E), e é adicionado para recobrar uma característica importante dos óleos brutos nas composições adjuvantes.

[032] Os óleos vegetais foram testados quanto a sua resistência ao calor, esterilidade, toxicidade, densidade e viscosidade. Dos óleos testados e aprovados, foram obtidas emulsões estáveis de diversos óleos, de suas misturas e distintas combinações de surfactantes.

Sistema EHL - Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

[033] O sistema de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), introduzido por GRIFFIN, em 1949, é um sistema de escala numérica adimensional de valores entre 1 a 20, utilizado para descrever a natureza do agente tensoativo. Quanto maior o número EHL, maior a hidrofolia da molécula. O EHL de um emulsificante está sempre relacionado com a sua solubilidade. Quanto maior o número EHL, maior a solubilidade na água. Substâncias a serem emulsificadas podem ser caracterizadas por um valor de EHL Requerido (EHL req.). Tal valor indica aproximadamente onde a substância é mais provável de formar emulsão estável (determinado pela experiência).

[034] Cada óleo ou mistura de óleos a ser emulsificado possui um valor de EHL requerido. No entanto, o valor varia de acordo com cada lote de extração de óleo e beneficiamento posterior, mantendo, contudo, uma pequena faixa de valores que podem ser focados para resultados esperados satisfatórios. Cada óleo foi testado em diferentes EHLs até a definição dos valores de EHL ótimos de cada amostra, conforme exemplos mostrados na tabela 1.

Óleos vegetais	EHL req.	EHL req. ótimo	Dias estáveis a
----------------	----------	----------------	-----------------

			25°C
Maracujá	9,0 – 13,5	12,86	13
Girassol	5,0 – 7,5	6,90	10
Soja	5,5 – 7,5	7,00	7
Canola	5,5 – 8,0	7,30	11
Arroz	6,0 – 8,0	7,40	10
Milho	8,5 – 10,5	9,86	7
Buriti	7,0 – 10,0	8,37	7

[035] Procedimento para a preparação de emulsões

1) Deve-se misturar o óleo com o surfactante, medidos pela massa (peso), nas proporções próprias de cada óleo ou mistura de óleos, como de 9:1 a 60°C com auxílio de agitador magnético. Em seguida, deixa-se a mistura resfriar a temperatura ambiente. Atingida esta temperatura, pode-se adicionar o alfa-tocoferol correspondente à vacina prevista, se for necessário.

2) Para a parte aquosa pode ser utilizado tampão fosfato salina (PBS) na temperatura de 2 a 8°C (ou outra solução aquosa adequada ao antígeno e à vacina). Se a natureza da solução com o antígeno for hidrofóbica, esta solução pode ser adicionada logo antes do início da adição da parte aquosa sendo que sua quantidade percentual na formulação total ainda será considerada como parte aquosa. Na maior parte das vezes, o antígeno é diluído na porção aquosa. O antígeno pode ser composto por proteínas, proteínas recombinantes, oligossacarídeos, polissacarídeos conjugados ou não, moléculas de ADN ou ARN, toxinas, anatoxinas, vírus, bactérias, leveduras e fungos recombinantes ou não, bem como qualquer produto metabólito utilizado pra imunização. A partir de dados da literatura e dos testes com cada óleo, calculou-se o percentual aproximado da quantidade de tampão necessária para a formação da emulsão estável.

3) A mistura oleosa (óleo+surfactante) deve ser resfriada até aproximadamente 15°C em sistema com água e gelo. Em seguida, a mistura oleosa deve ser posta em agitação de 11.000 rpm em um misturador.

Adicionando-se lentamente a parte aquosa com o antígeno, sem interromper a agitação e aumentando-a paulatinamente até 20.000 rpm.

4) Em 20.000 rpm, faz-se a uniformização lenta da mistura, observando a temperatura cerca de 2 ou 3 minutos, com o auxílio de um termômetro para a temperatura não ultrapassar o limite de integridade e viabilidade do antígeno, e interromper o misturador.

- Terminada a mistura, a emulsão final deve ser deixada resfriada (2 a 8°C) enquanto são feitos os testes de verificação da formação da emulsão.

Testes das emulsões

[036] Nas misturas que aparentemente formaram emulsões, onde não havia imediata separação de fases (oleosa + aquosa), foi verificado ao microscópio a formação de partículas de emulsão e o tipo de emulsão (água-em-óleo ou óleo-em-água ou múltiplas), colocando-se uma gota de corante na mistura depositada sobre a lâmina do microscópio e sobrepondo uma lamínula. Num microscópio ótico de inversão, é avaliada a formação das partículas, velocidade de dispersão da gota sob a lamínula, estabilidade e tamanho das partículas (dados empíricos de referência, depois confirmados em fotomicroscopia). Para certificação do tamanho médio das partículas e classificação das emulsões em nanoemulsões (tamanho médio das partículas entre 10-1000 nm), microemulsões (1-200 µm) ou uma macroemulsão (0,2-50 mm), pode ser utilizada a fotomicroscopia computadorizada, espectrometria de espalhamento, entre outras técnicas. As melhores composições adjuvantes foram as que obtiveram tamanho médio de partículas que as caracterizavam como nanoemulsões e microemulsões.

Teste de toxicidade em animais

[037] Dos óleos que apresentaram emulsão estável por no mínimo 7 dias em temperatura ambiente (25°C), somente o óleo de Maracujá bruto apresentou qualquer toxicidade com DL50% calculada em 32%. Isto quer dizer que no grupo de animais que foi inoculado com o óleo de Maracujá bruto, diluído a 32% em Nujol, ocorreu mortalidade de 50%. Já as amostras de óleo de Maracujá refinado

não apresentaram mortalidade ou qualquer toxicidade *in vivo*, no teste com camundongos.

[038] Os óleos de Soja, Girassol, Canola, Arroz, Milho e Buriti, entre outros, não apresentaram qualquer toxicidade *in vivo* e foram utilizados para elaboração de emulsões com antígeno para o teste de antigenicidade.

Teste de antigenicidade em animais

[039] Os testes de antigenicidade se referem às emulsões vacinais dos óleos comerciais. O gráfico da figura 1 mostra os resultados. Foi feita coleta de sangue dos animais com 21, 28 e 35 dias da vacinação com as composições adjuvantes dos óleos de girassol (▲), canola (×), arroz (✱) e milho (●).

[040] Uma substância tem efeito adjuvante quando, adicionada ao antígeno, potencializa a resposta imunológica do organismo a este antígeno de forma que esta resposta é quantitativa e qualitativamente maior que a resposta causada somente pelo antígeno. Pelo gráfico da figura 1 é possível evidenciar que todos os óleos vegetais tiveram efeito adjuvante quando comparados aos resultados do grupo PBS+BSA (◆) em que somente o antígeno (BSA – Albumina Sérica Bovina) foi utilizado. Isto significa que os adjuvantes compostos de óleos vegetais possuem potencial adjuvante importante a ser considerado na composição de vacinas contra doenças de baixa antigenicidade. O grupo ISA+BSA (■), composto por emulsão de óleo mineral comercial (ISA-50® - SEPPIC), serve como parâmetro de comparação com a resposta das composições de óleos vegetais puros, que o superam quando se considera a baixa ou muito baixa ocorrência de reações vacinais que geram. Os adjuvantes compostos por blends, além de exibirem o mesmo comportamento de provocar baixa ou muito baixa ocorrência de reações vacinais, ainda apresentam respostas imunológicas semelhantes ao adjuvante comercial citado.

[041] Em vista dos testes realizados chegou-se às composições adjuvantes entre óleos, de origem vegetal, puros e blends, para utilização em vacinas veterinárias. Tais composições vacinais são emulsões simples ou múltiplas, obtidas pelo método, padrão e conhecido, descrito acima.

[042] A referida emulsão consiste de uma parte oleosa que varia de 45% a 85% e de outra aquosa que varia de 15% a 55%.

[043] A composição da parte oleosa (composição oleosa total - COT) compreende de 70 a 97% de óleos vegetais, preferencialmente em estado bruto ou virgem. Finalizando a constituição da COT, esta poderá ter de 3% a 30% de surfactantes e emulsificantes, sendo que são utilizadas pelo menos duas substâncias. Os surfactantes são pesados e misturados em proporções de modo a alcançar o EHL requerido dos óleos.

[044] Os óleos utilizados são selecionados dentre os óleos de amêndoas, de arroz, de canola, de semente de algodão, de gergelim, de germe de trigo, de girassol, de cártamo, de milho, de semente de uva, de semente de romã, de semente de maracujá, de soja, de macadâmia, de copaíba, de buriti, de babaçu, de cupuaçu, de urucum, de macaúba, de patauá, de pracaxi, de tucumã, de bacuri, de muru-muru e de ucuúba. Por questões relacionadas à disponibilidade dos óleos na forma sem refino, é possível substituir parte da proporção de óleos brutos por óleos refinados de mesma origem vegetal que os primeiros (em até 50%), ou utilizar na composição oleosa frações de diferentes óleos vegetais refinados, desde que do volume total de óleos vegetais utilizados, aqueles refinados alcancem uma proporção máxima de 50%. Isto significa que os óleos vegetais refinados ou semirrefinados podem constituir de 35 a 48,5% da COT. Esta substituição tem pequena influência na formação da emulsão estável e respectiva proporção de parte aquosa e de parte oleosa. Já o efeito na resposta imunológica à vacina (menor com a proporção de óleos refinados) pode ser compensada com a adição criteriosa de 0,5-500mg de alfa-tocoferol/100g de COT. Os critérios de adição se referem à natureza e origem do óleo (tipo de vegetal), tipo de vacina (especificidade do antígeno), tipo de espécie animal receptora da vacina: todos, critérios inovadores que, com surpresa, foram deparados na pesquisa de desenvolvimento das composições adjuvantes.

[045] Os surfactantes utilizados são surfactantes não iônicos de origem vegetal (total ou parcial), sendo selecionados dentre os ésteres de sorbitol

(sorbitan) e derivados (monolaurato, monopalmitato, monoestearato, mono-oleato, tristearato, trioleato e etc.); ésteres de sorbitol etoxilados (sorbitan) e derivados (monolaurato de polioxietileno, monopalmitato de polioxietileno, monoestearato de polioxietileno, mono-oleato de polioxietileno, tristearato de polioxietileno, trioleato de polioxietileno e etc.); ésteres de manitol e derivados; ésteres de ácido oleico e derivados; ésteres de glicerol e derivados; ésteres de ácido esteárico e derivados; surfactantes poloxâmeros e poloxaminas, bem como outros surfactantes e emulsificantes (monoestearato de polietilenoglicol, diestearato de polietilenoglicol, monoesterato de glicerila, monoglicerídeos de soja, monoglicerídeos de palma, monoglicerídeos de cupuaçu e monoglicerídeos de origem vegetal).

[046] Opcionalmente, a emulsão ainda pode conter de 10-5000µg de saponina por dose de vacina, segundo espécie animal e antígeno utilizado. As saponinas utilizadas são extraídas da árvore *Quillaja saponaria*, preferencialmente Quil A e seus derivados QS-7, QS-17, QS-18, QS-21 (em especial as frações ultrapurificadas).

[047] Exemplos de composições adjuvantes são apresentados a seguir. Entretanto, eles não devem ser entendidos como limitante da invenção, sendo possível realizar alterações nas composições sem que o escopo da mesma seja modificado, uma vez que, dada a variação natural das amostras oleosas vegetais, a tecnologia de elaboração destas composições de adjuvantes, implica na inovação de equilibrar criteriosamente a formulação de cada COT almejada para a vacina a ser elaborada segundo o antígeno e a espécie animal que receberá a vacina. O equilíbrio da formulação da COT, e consequente resultado da emulsão vacinal final, é realizado com os critérios inesperados encontrados nos testes de elaboração dos adjuvantes e nos testes de viabilidade imunológica e industrial das diferentes vacinas. Os critérios estão intimamente relacionados com a descoberta das interações entre os componentes da COT, sejam elas entre as diferentes amostras de óleos originados de um mesmo vegetal (óleos puros), entre as distintas concentrações de diferentes óleos vegetais e amostras

(no caso dos blends), sejam entre os óleos e blends com os surfactantes específicos para cada mistura.

Exemplos

[048] Conforme citado anteriormente, é da natureza dos óleos vegetais uma variação em sua composição, dependente dos cultivares das plantas que dão origem aos grãos oleaginosos, tipo de solo onde foram plantadas, época do ano da colheita, bem como do estágio de maturação do grão no momento da colheita e no momento do processamento para produção do óleo.

[049] Ainda assim, existe uma faixa de composição centesimal e de composição de ácidos graxos e colesterol de cada óleo que permite sólida referência quanto à identidade e qualidade dos óleos.

[050] Nos exemplos abaixo, é demonstrado como a formulação do adjuvante se ajusta a esta variação natural da composição dos óleos, tendo em vista a melhor resposta imunológica e a mais estável aplicação industrial. A referência de cada amostra se dá pelo EHL req., particular a cada óleo e amostra. Todos os percentuais dos óleos e surfactantes se referem à composição oleosa total (COT)

1) Emulsão com um único óleo vegetal.

Exemplo 1 – óleo de soja bruto – amostra de EHL req. 7

[051] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 78% e uma parte aquosa de 22%.

[052] A composição da parte oleosa (COT) é constituída de 82% de óleo de soja bruto (EHL req. 7) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 13,95% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 4,05% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9).

Exemplo 2 – óleo de soja bruto – amostra de EHL req. 6.7

[053] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 78% e uma parte aquosa de 22%.

[054] A composição da parte oleosa (COT) é constituída de 82% de óleo de soja bruto (EHL req. 6,7) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a

mistura de surfactantes composta de 14,49% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 3,51% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9).

Exemplo 3 – óleo de soja (amostra mesclada com parte de óleo bruto e parte refinado) – amostra de EHL req. 6,7

[055] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 78% e uma parte aquosa de 22%.

[056] A composição da parte oleosa (COT) é constituída de 82% de óleo de soja (sendo 50% de óleo de soja bruto e 32% de óleo de soja refinado - EHL req. final 6,7) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 14,49% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 3,51% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9). Para esta composição adjuvante, a cada 100g de COT adiciona-se 150mg de alfa-tocoferol, previamente à mistura com parte aquosa.

Exemplo 4 – óleo de soja (amostra mesclada com parte de óleo bruto e parte refinado) – amostra de EHL req. 6,7

[057] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 78% e uma parte aquosa de 22%.

[058] A composição da parte oleosa (COT) é constituída de 82% de óleo de soja (sendo 50% de óleo de soja bruto e 32% de óleo de soja refinado - EHL req. final 6,7) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 14,49% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 3,51% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9). Para esta composição adjuvante, a cada 100g de COT adiciona-se 50mg de alfa-tocoferol, previamente à mistura com parte aquosa. À parte aquosa adiciona-se em passo anterior à elaboração da emulsão de 10-50µg de saponina por dose de vacina (equivalente a 'por animal') planejada, com variação seguindo critérios aplicados segundo espécie animal e antígeno utilizado.

2) Emulsão com misturas de óleos vegetais:

Exemplo 5 – óleo de soja bruto – 41% - amostra de EHL req. 7, e óleo de milho bruto – 41% - amostra de EHL req. 10 (EHL Req. final da mistura de

óleos = 8,5)

[059] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[060] A composição da parte oleosa (COT) compreende 41% de óleo de soja bruto (EHL req. 7), 41% de óleo de milho bruto (EHL req. 10) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 11,25% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 6,75% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9).

Exemplo 6 – óleo de soja bruto – 41% - amostra de EHL req. 6,7, e óleo de milho bruto – 41% - amostra de EHL req. 9,6 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,15)

[061] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[062] A composição da parte oleosa (COT) compreende 41% de óleo de soja bruto (EHL req. 6,7), 41% de óleo de milho bruto (EHL req. 9,6) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 11,88% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 6,12% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9).

Exemplo 7 – óleo de soja refinado – 41% - amostra de EHL req. 6,7, e óleo de milho bruto – 41% - amostra de EHL req. 9,6 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,15)

[063] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[064] A composição da parte oleosa (COT) compreende 41% de óleo de soja refinado (EHL req. 6,7), 41% de óleo de milho bruto (EHL req. 9,6) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 11,88% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 6,12% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9). Para esta composição adjuvante, a cada 100g de COT adiciona-se 100mg de alfa-tocoferol, previamente à mistura com parte aquosa.

Exemplo 8 – óleo de soja refinado – 41% - amostra de EHL req. 6,7, e óleo de milho bruto – 41% - amostra de EHL req. 9,6 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,15)

[065] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[066] A composição da parte oleosa (COT) compreende 41% de óleo de soja refinado (EHL req. 6,7), 41% de óleo de milho bruto (EHL req. 9,6) e 18% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 11,88% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7) e 6,12% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9). Para esta composição adjuvante, a cada 100g de COT adiciona-se 50mg de alfa-tocoferol, previamente à mistura com parte aquosa. À parte aquosa adiciona-se em passo anterior à elaboração da emulsão de 10-5000µg de saponina por dose de vacina (equivalente a 'por animal') planejada, com variação seguindo critérios aplicados segundo espécie animal e antígeno utilizado.

Exemplo 9 – óleo de soja bruto – 37,8% - amostra de EHL req. 7, óleo de milho bruto – 37,8% - amostra de EHL req. 10, e óleo de buriti bruto – 8,4% - amostra de EHL req. 8 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,45)

[067] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[068] A composição da parte oleosa (COT) compreende 37,8% de óleo de soja bruto (EHL req. 7), 37,8% de óleo de milho bruto (EHL req. 10) e 8,4% de óleo de buriti bruto (EHL req. 8) e 16% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 9,6% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7); 0,96% de monolaurato de sorbitol (EHL 8,6); 4,8% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9); e 0,64% de monolaurato de polioxietileno de sorbitol (EHL 16,7).

Exemplo 10 – óleo de soja bruto – 37,8% - amostra de EHL req. 6,7; óleo de milho bruto – 37,8% - amostra de EHL req. 9,6; e óleo de buriti bruto – 8,4% - amostra de EHL req. 8,3 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,165)

[069] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[070] A composição da parte oleosa (COT) compreende 37,8% de óleo de soja bruto (EHL req. 6,7), 37,8% de óleo de milho bruto (EHL req. 9,6) e 8,4% de óleo de buriti bruto (EHL req. 8,3) e 16% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 10,08% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7); 0,96% de monolaurato de sorbitol (EHL 8,6); 4,32% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9); e 0,64% de monolaurato de polioxietileno de sorbitol (EHL 16,7).

Exemplo 11 – óleo de soja bruto – 37,8% - amostra de EHL req. 6,7; óleo de milho refinado – 37,8% - amostra de EHL req. 9,6; e óleo de buriti bruto – 8,4% - amostra de EHL req. 8,3 (EHL Req. final da mistura de óleos = 8,165)

[071] Neste exemplo, obteve-se uma emulsão final estável com uma parte oleosa de 68% e uma parte aquosa de 32% (com antígeno).

[072] A composição da parte oleosa (COT) compreende 37,8% de óleo de soja bruto (EHL req. 6,7), 37,8% de óleo de milho refinado (EHL req. 9,6) e 8,4% de óleo de buriti bruto (EHL req. 8,3) e 16% de uma mistura de surfactantes; sendo a mistura de surfactantes composta de 10,08% de monoestearato de sorbitol (EHL 4,7); 0,96% de monolaurato de sorbitol (EHL 8,6); 4,32% de monoestearato de polioxietileno de sorbitol (EHL 14,9); e 0,64% de monolaurato de polioxietileno de sorbitol (EHL 16,7). Para esta composição adjuvante, a cada 100g de COT adiciona-se 200mg de alfa-tocoferol, previamente à mistura com parte aquosa.

[073] **Soluções e benefícios que a invenção apresenta:**

- Todos os componentes são de origem vegetal (total ou parcial), portanto, de fontes renováveis e com menor *footprint* ecológico (sustentável). Óleos minerais, provindos de combustíveis fósseis, estão no extremo oposto disto.
- Substâncias biodegradáveis, não-tóxicas, absorvíveis e metabolizáveis nos animais ou pessoas que receberem a vacina (ambiental).

Nos frigoríficos, durante abate de animais de produção, é possível visualizar o óleo mineral proveniente de vacinas escorrer dos tecidos animais. Este óleo não é separado e é descartado como efluente de frigorífico (poluente).

- As composições adjuvantes nas emulsões desenvolvidas pela presente invenção possuem baixa ou muito baixa ocorrência de reações adversas vacinais nos animais, provocando menor desconforto nos mesmos no período pós-vacinação (melhor conforto para o animal). Tal fato gera um ganho econômico considerável em virtude da diminuição da perda de carne, tecido animal e couro. Por ocasião do abate, as reações vacinais dos tecidos adjacentes são descartadas com nenhum ou baixíssimo aproveitamento – subproduto de baixo valor agregado (comumente decorrentes de vacinas que utilizam óleo mineral).

- As composições adjuvantes de óleos vegetais são facilmente metabolizáveis proporcionando maior segurança aos consumidores, diminuindo também o período de carência entre a vacinação e o abate, particularmente importante nas aves (que possuem ciclo de vida curto e necessitam desta maior liberdade para decisões gerenciais e de manejo que implicam em vultosos valores econômicos).

- A indústria produtora de vacinas pode dar uma maior garantia a seus clientes, uma vez que as perdas decorrentes da vacinação serão mínimas, sem diminuir a proteção contra as doenças.

- A indústria produtora de vacinas não precisará construir novas instalações para produção de vacinas com estes adjuvantes. Precisarão apenas adaptar suas instalações e equipamentos já em uso para vacinas com óleos minerais. Óleos vegetais são esterilizáveis e possuidores de grau farmacêutico.

- A tecnologia apresenta rendimento, durabilidade e precisão semelhantes aos produtos comerciais mais utilizados.

- O custo de produção é menor ou semelhante aos óleos minerais, cuja disponibilidade de mercado se encontra em suspenso, dada a baixíssima margem de lucro para seus produtores (indústria petroquímica), que podem

fabricar outros produtos mais rentáveis com os mesmos hidrocarbonetos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composições adjuvantes, na forma de emulsões simples ou múltiplas, para aumentar a resposta imunológica em animais **caracterizadas** pelo fato de:

a referida emulsão consistir de uma parte oleosa contendo de 45% a 85% de óleos vegetais utilizados na sua forma bruta, virgem, semirrefinada ou refinada, e sem adição de conservantes ou antioxidantes e de outra parte aquosa contendo de 15% a 55% de tampão fosfato salina (PBS) ou solução adequada ao antígeno da vacina,

a composição oleosa total (COT) constituir-se de 70 a 97% de óleos vegetais e de 3% a 30% de surfactantes e emulsificantes selecionados entre: monoestearato de sorbitol, monolaurato de sorbitol; monoesterato de polioxietileno de sorbitol e monolaurato de polioxietileno de sorbitol, misturados em proporções de modo a alcançar o EHL requerido dos óleos, sendo utilizadas pelo menos duas substâncias.

2. Composições adjuvantes, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato de os óleos vegetais utilizados serem selecionados dentre os óleos de amêndoas, de arroz, de canola, de semente de algodão, de gergelim, de germe de trigo, de girassol, de cártamo, de milho, de semente de uva, de semente de romã, de semente de maracujá, de soja, de macadâmia, de copaíba, de buriti, de babaçu, de cupuaçu, de urucum, de macaúba, de pataúá, de pracaxi, de tucumã, de bacuri, de muru-muru e de ucuúba.

3. Composições adjuvantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizadas** pelo fato de os óleos vegetais, quando utilizados na sua forma semirrefinada ou refinada, estarem presentes na fração dos óleos vegetais em até 50% de composição oleosa total (COT).

4. Composições adjuvantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizadas** pelo fato de os óleos vegetais, quando utilizados na sua forma semirrefinada ou refinada, estarem presentes na fração dos óleos vegetais de 35 a 48,5% da composição oleosa total (COT).

5. Composições adjuvantes, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1, 2, 3 ou 4, **caracterizadas** por constituírem-se de microemulsões ou nanoemulsões.

6. Composições adjuvantes, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato de compreender ainda de 0,5-500 mg de alfa-tocoferol/100g de COT.

7. Composições adjuvantes, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato de os surfactantes serem surfactantes não iônicos de origem vegetal (total ou parcial).

8. Composições adjuvantes, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato de a emulsão conter ainda de 10-5000 μ g de saponina por dose de vacina.

9. Composições adjuvantes, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizadas** pelo fato de a saponina utilizada ser Quil A e seus derivados QS-7, QS-17, QS-18, QS-21.

10. Uso das composições adjuvantes conforme definidas nas reivindicações de 1 a 9 **caracterizado** por ser no preparo de vacinas para potencialização da resposta imunológica humoral e celular a partir de antígenos vacinais empregados em qualquer espécie animal.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de os antígenos vacinais serem compostos por proteínas, proteínas recombinantes, oligossacarídeos, polissacarídeos conjugados ou não, moléculas de ADN ou ARN, toxinas, anatoxinas, vírus, bactérias, leveduras e fungos recombinantes ou não ou produto metabólito utilizado para imunização.