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

(21) **PI0706527-2 A2**

BRPI0706527A2

(22) Data de Depósito: 09/01/2007
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/39
A61K 9/107

(54) Título: **EMULSÃO EM ÓLEO NA ÁGUA TERMORREVERSÍVEL**

(30) Prioridade Unionista: 13/01/2006 FR 06 00309

(73) Titular(es): Sanofi Pasteur

(72) Inventor(es): Jean Haensler, Marie-Françoise Klucker, Pascal Chaux, Patricia Probeck-Quellec

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

(86) Pedido Internacional: PCT FR2007000030 de 09/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/080308de 19/07/2007

(57) Resumo: EMULSÃO EM ÓLEO NA ÁGUA TERMORREVERSÍVEL. A presente invenção refere-se a uma emulsão em óleo na água, termorreversível, compreendendo: um agonista do TLR4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado, escaleno, um tensoativo não-jônico pertencendo ao grupo químico dos polioxietileno alquil éter, um tensoativo hidrófilo, um solvente aquoso, e que manifesta propriedades imunoestimulantes.

PI0706527-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"EMULSÃO EM ÓLEO NA ÁGUA TERMORREVERSÍVEL"**.

A presente invenção refere-se a uma composição imunoestimulante sob a forma de uma emulsão em óleo em água (H/E) termorreversível contendo um agonista do TLR4, denominada TLA4.

TLR4 (receptor "toll-like" tipo 4) é um receptor expresso por células apresentadoras do antígeno do sistema imunitário; ele intervém nos mecanismos de defesa precoce contra as infecções com bactérias gram-. O lipopolissacarídeo das bactérias gram- (LPS) é o ligante natural do TLR4; ele ativa o receptor, o que acarreta uma cascata de acontecimentos bioquímicos, em particular a ativação do fator de transcrição Nf-Kappa B, e a produção de citoquinas pró-inflamatórias. O monofosforil lipídeo A proveniente da hidrólise do LPS é também um ligante do TLR4 com a vantagem de ser menos tóxico que o LPS.

WO20004/060396 descreve formulações sob a forma de emulsões H/E contendo um adjuvante fosfolipídico. As emulsões que têm uma tamanho submicrônico são obtidas por meio de um homogeneizador de alta pressão (microfluidizante). O processo de fabricação utiliza altas energias mecânicas, a fim de obter forças de cisalhamento suficientemente importantes para reduzir o tamanho das gotas de óleo. Segundo esse ensinamento, a emulsão obtida contém gotículas cujo tamanho é de aproximadamente 500 nm.

É desejável poder dispor de uma formulação alternativa àquela proposta nesse pedido de patente, e sobretudo que possa ser obtida por um processo mais simples (não-necessitando de uma tecnologia de cisalhamento particular), de baixa energia sendo reprodutível, confiável e utilizável em larga escala; além disso, a formulação adjuvante deve poder melhorar a eficácia das vacinas, aumentando a resposta imune a um antígeno, não apresentando sinal de toxicidade que prejudicaria sua administração com toda a segurança.

Para isso, a invenção tem por objeto:

uma emulsão em óleo na água (H/E) compreendendo:

I) um agonista do TLR4, denominado TLA4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado;

II) escaleno;

III) um solvente aquoso;

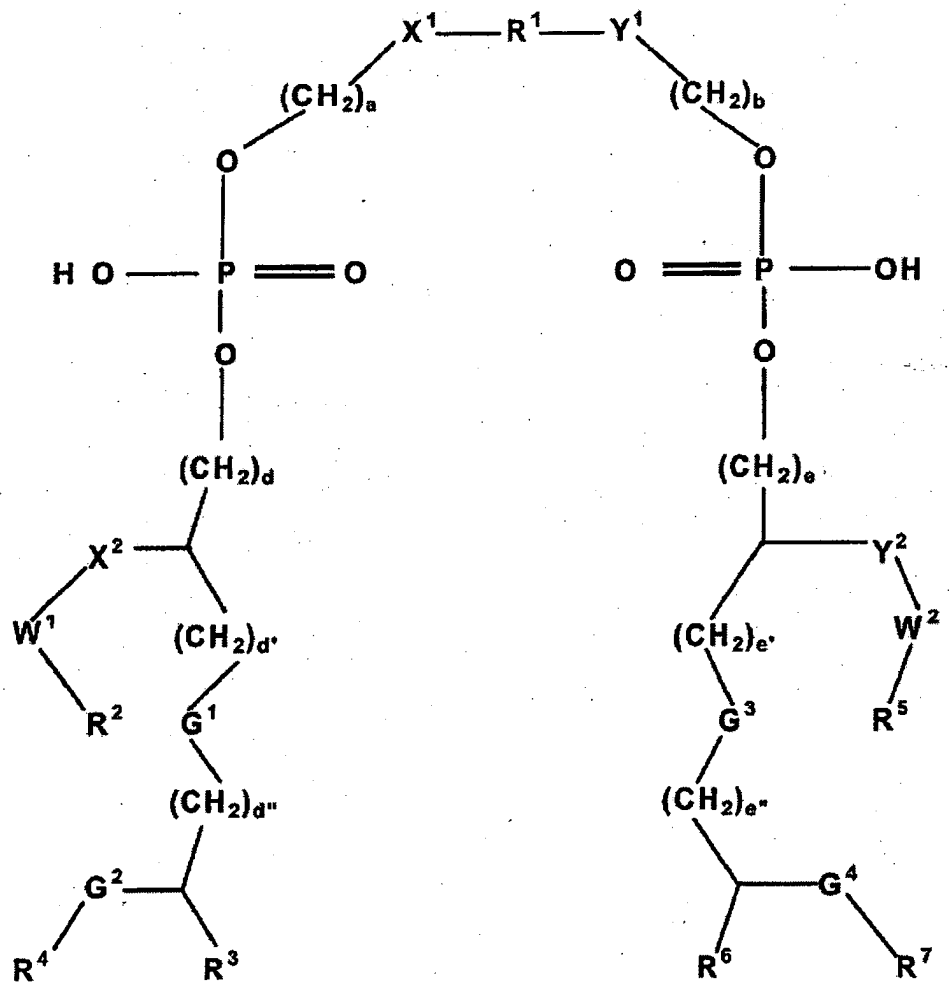
IV) um tensoativo hidrófilo não-iônico que é um polióxi etileno alquil éter;

V) um tensoativo hidrófobo não-iônico e que é termorreversível.

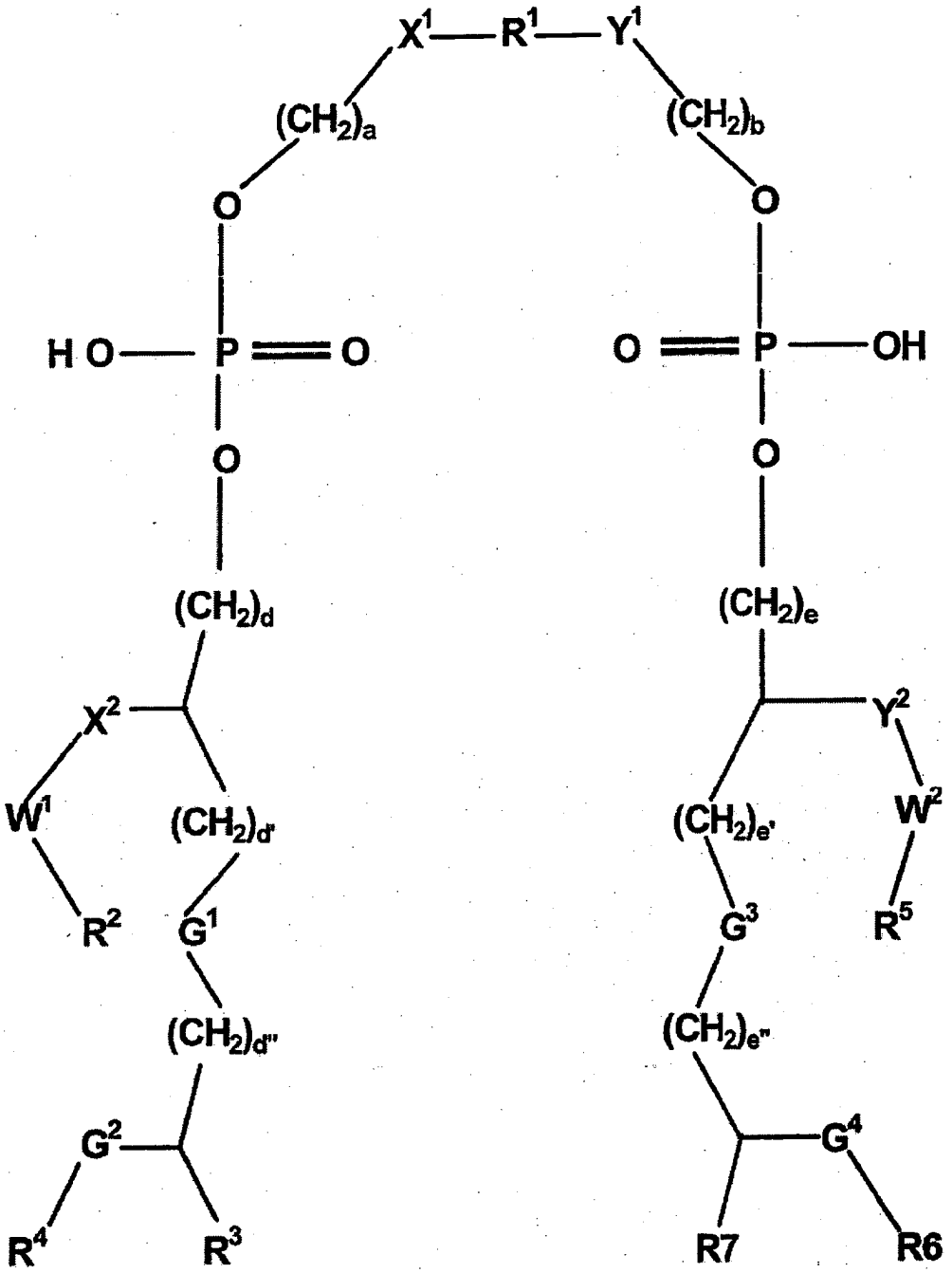
O agonista do TLR4 contido na emulsão, de acordo com a invenção, não é o lipídeo A, ou um derivado do lipídeo A ou uma molécula que mimetiza a estrutura do lipídeo A.

Tipicamente TLA 4 é um composto químico de fórmula I, II, II ou IV:

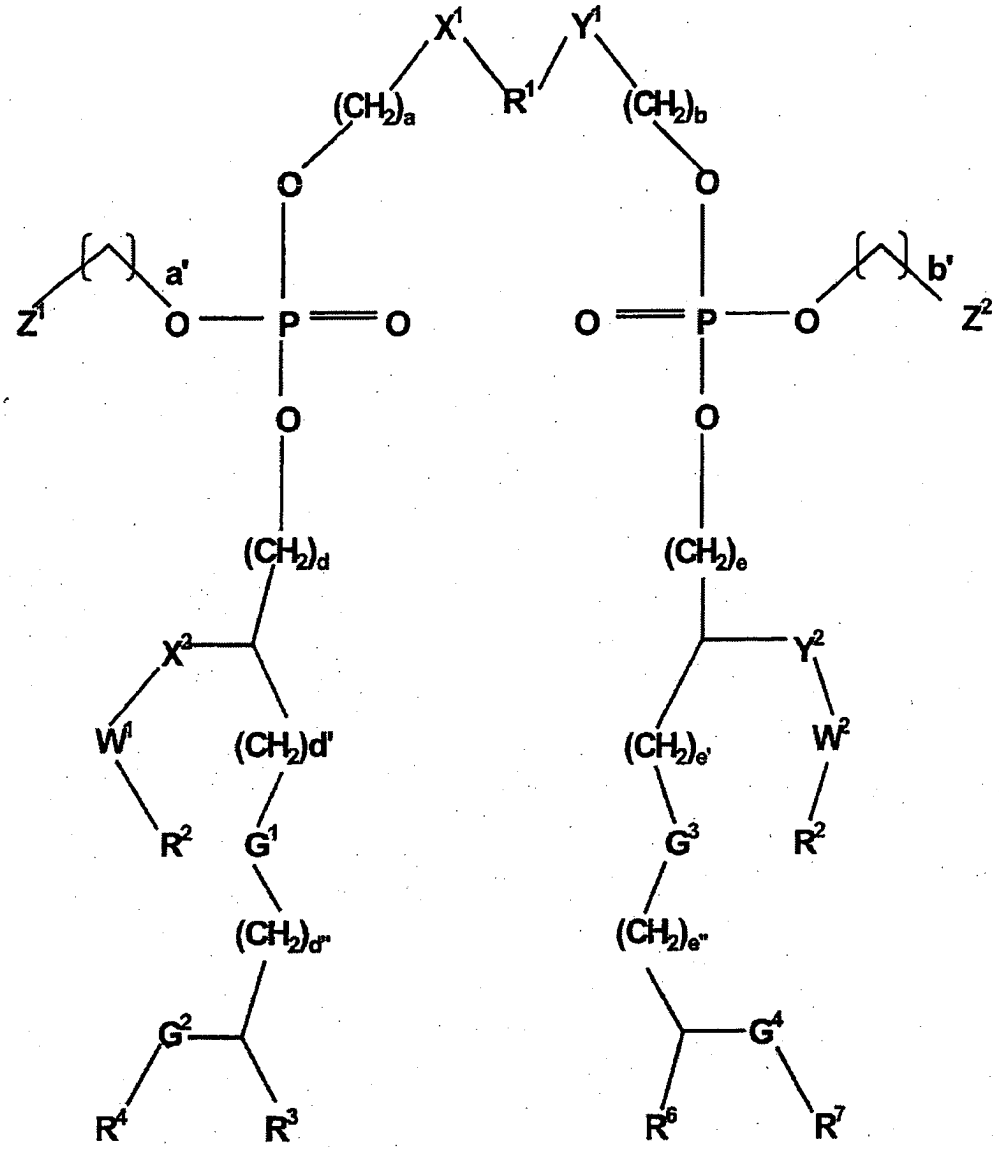
Composto de fórmula I



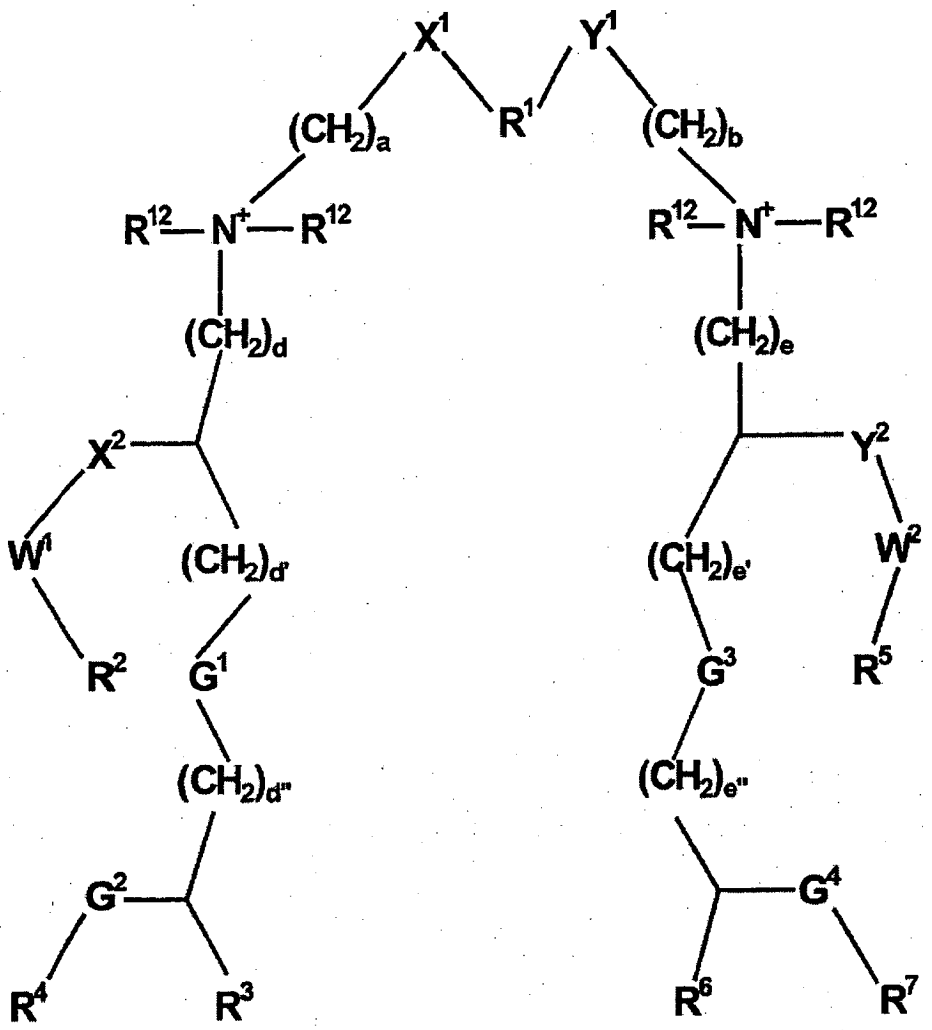
Composto de fórmula II



composto de fórmula III



Composto de fórmula IV



na qual para cada uma das fórmulas I, II, III, ou IV, R^1 é selecionado do grupo que consiste em:

a) C(O);

b) C(O)-alquila em C_1-C_{14}-C(O), no qual esse alquila em C_1-C_{14} é facultativamente substituído por um hidróxi, um alcóxi em C_1-C_5, um alquileno dióxi em C_1-C_5, um (alquil em C_1-C_5) amino ou um (alquila em C_1-C_5)arila, no qual essa parte arila desse (alquila em C_1-C_5)arila é facultativamente substituída por um alcóxi em C_1-C_5, um (alquila em C_1-C_5)amino, um (alcóxi em C_1-C_5)amino, um (alquila em C_1-C_5) amino alcóxi em C_1-C_5, -O-(alquila em C_1-C_5) amino alcóxi em C_1-C_5, -O-(alquila em C_1-C_5) amino-C(O)-alquila em C_1-C_5-C(O)OH, ou -O-(alquila em C_1-C_5) amino-C(O)- alquila em C_1-C_5-C(O)- alquila em C_1-C_5;

c) uma alquila com cadeia linear ou ramificada C_2-C_{15} facultati-

vamente substituída por um hidróxi ou um alcóxi; e

d) -C(O)-arileno em C_6-C_{12}-C(O)- no qual esse arileno é facultativamente substituído por um hidróxi, um halogênio, um nitro ou um amino;

a e b são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

d, d', d", e, e' e e" são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

X^1, X^2, Y^1 e Y^2 são independentemente selecionados em um grupo que consiste em nada, um oxigênio, NH e N(C(O)alquila em C_1-C_4), e N(alquila em C_1-C_4):

W^1 e W^2 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma carbonila, um metileno, uma sulfona e um sulfóxido;

R^2 e R^5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em:

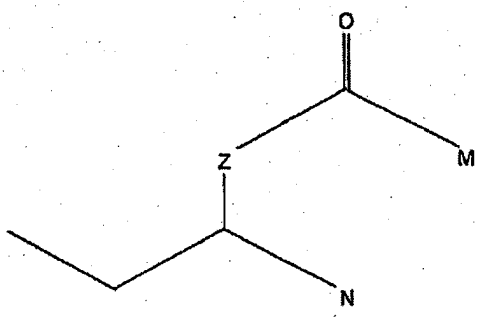
a) uma alquila com cadeia, linear ou ramificada, em C_2-C_{20} que é facultativamente substituída por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

b) uma alcenila ou uma dialcenila com cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20} que é facultativamente substituída por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

c) um alcóxi com cadeia linear ou ramificado em C_2-C_{20} que é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

d) NH-alquila com cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, no qual esse grupamento alquila é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi; e

e)



na qual Z é selecionado do grupo que consiste em O e NH, e M e N são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila, uma alcenila, um alcóxi, um acilóxi, alquilamino e um acilamino de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20};

R^3 e R^6 são independentemente selecionados do grupo que

consiste em uma alquila e uma alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20} facultativamente substituída por um oxo ou um flúor;

R^4 e R^7 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma C(O)-alquila ou alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, uma alquila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, um alcóxi de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, e uma alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}; no qual esses grupamentos alquila, alcenila, ou um alcóxi podem ser independentemente e facultativamente substituídos por um hidróxi, um flúor ou alcóxi em C_1-C_5;

G_1, G_2, G_3 e G_4 são independentemente selecionados do grupo que consiste em um oxigênio, um metileno, um amino, um tiol, -C(O)NH-, -NHC(O)-, e -N(C(O)alquila em C_1-C_4)-;

ou G^2R^4 ou G^4R^7 podem juntos ser um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila;

e no qual para a fórmula III:

a' e b' são independentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, de forma preferida 2;

Z^1 é selecionado do grupo que consiste em $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$, $-OP(O)(OR^8)(OH)$ no qual R^8 é uma cadeia alquila em C_1-C_4, $-OS(O)_2OH$, $-S(O)_2OH$, $-CO_2H$, $-OB(OH)_2$, -OH, $-CH_3$, $-NH_2$ e $-NR^9{}_3$ o R^9 é uma alquila em C_1-C_4;

Z^2 é selecionado do grupo que consiste em $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$, $-OP(O)(OR^{10})(OH)$ ou R^{10} é uma cadeia em C_1-C_4, $-OS(O)_2OH$, $-S(O)_2OH$, $-CO_2H$, $-OB(OH)_2$, -OH, $-CH_3$, $-NH_2$ e NR^{11} é uma cadeia alquila em C_1-C_4;

e no qual para a fórmula IV:

R12 é H ou uma cadeia alquila em C_1-C_4;

ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto de fórmula I, II, III ou IV.

A emulsão, de acordo com a invenção é termorreversível, o que significa que ela passa do estado de emulsão H/E ao estado de emulsão E/H, quando aquecida a uma temperatura pelo menos igual a uma "tempera-

tura dita de inversão de fase". Na escala microscópica, a temperatura de inversão de fase traduz a passagem de uma curvatura orientada para a fase oleosa a uma curvatura orientada para a fase aquosa, essa transição implicando necessariamente à passagem por uma fase de curvatura média nula (o sistema sendo então assemelhado, seja a uma fase lamelar, seja a uma microemulsão).

A emulsão, de acordo com a invenção, pode ser obtida por um processo de inversão de fase por variação de temperatura, o que oferece uma vantagem muito grande de um ponto de vista industrial, pois é facilmente controlável e adaptado a volumes de produção consideráveis. Esse processo apresenta as garantias de segurança e de rentabilidade necessárias à indústria farmacêutica. Além disso, graças a esse processo, é possível obter uma emulsão monodispersa, cujo tamanho das gotas é pequeno, o que torna a emulsão facilmente filtrável por meio de filtros esterilizantes, cujo limite de corte é de 200 nm.

Vantajosamente, pelo menos 90% da população volúmica das gotículas de óleo da emulsão, de acordo com a invenção, têm um tamanho $\leq$ 200 nm. Em geral, pelo menos 50% da população volúmica das gotículas de óleo dessas emulsões têm um tamanho $\leq$ 110 nm. Segundo uma característica particular, pelo menos 90% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho $\leq$ 180 nm e pelo menos 50% da população volúmica das gotículas têm um tamanho $\leq$ 110 nm.

Geralmente, a emulsão termorreversível, de acordo com a invenção é homogênea. Para uma emulsão homogênea, entende-se uma emulsão cuja representação gráfica da distribuição de tamanho (granulograma) das gotículas de óleo é unimodal. Tipicamente, essa representação gráfica é de tipo "gaussiano".

A medida do tamanho das gotículas pode ser feita por diferentes meios e notadamente por granulômetros de difração LASER, tais como os aparelhos Beckamn Coulter da faixa LS (notadamente o LS230) ou aparelhos Malvern da faixa Mastersizer (notadamente o Mastersizer 2000). O princípio de medida desses aparelhos é baseado na análise da intensidade da

luz propagada pelas partículas em função do ângulo (detectores de maiores, médios e pequenos ângulos), quando a amostra é iluminada por um feixe laser. Essa análise é feita por meio de modelos matemáticos escolhidos segundo o tamanho e a natureza do material utilizado. No caso da medida do tamanho de partículas submicrônicas, é preciso aplicar um modelo óptico particular (teoria de Mie), considerando-se os índices de refração da fase oleosa (no caso 1,495 para o escaleno) e da fase aquosa (por exemplo é de 1,332 para a água); é preciso também ser capaz de detectar as fracas intensidade emitidas pelas partículas muito finas, o que necessita de uma otimização da análise com:

- uma célula suplementar de detecção para a medida nos ângulos maiores da difusão diferencial das intensidades polarizadas (sistema PIDS em Coulter que permite uma medida a partir de 40 nm);

- um sistema de detecção combinando 2 comprimentos de onda, luz azul e vermelha em Malvern. A fonte de luz azul de menor comprimento de onda, associada a detectores de difusão nos ângulos largos e em retrodifusão reforça os desempenhos da análise da faixa submicrônica.

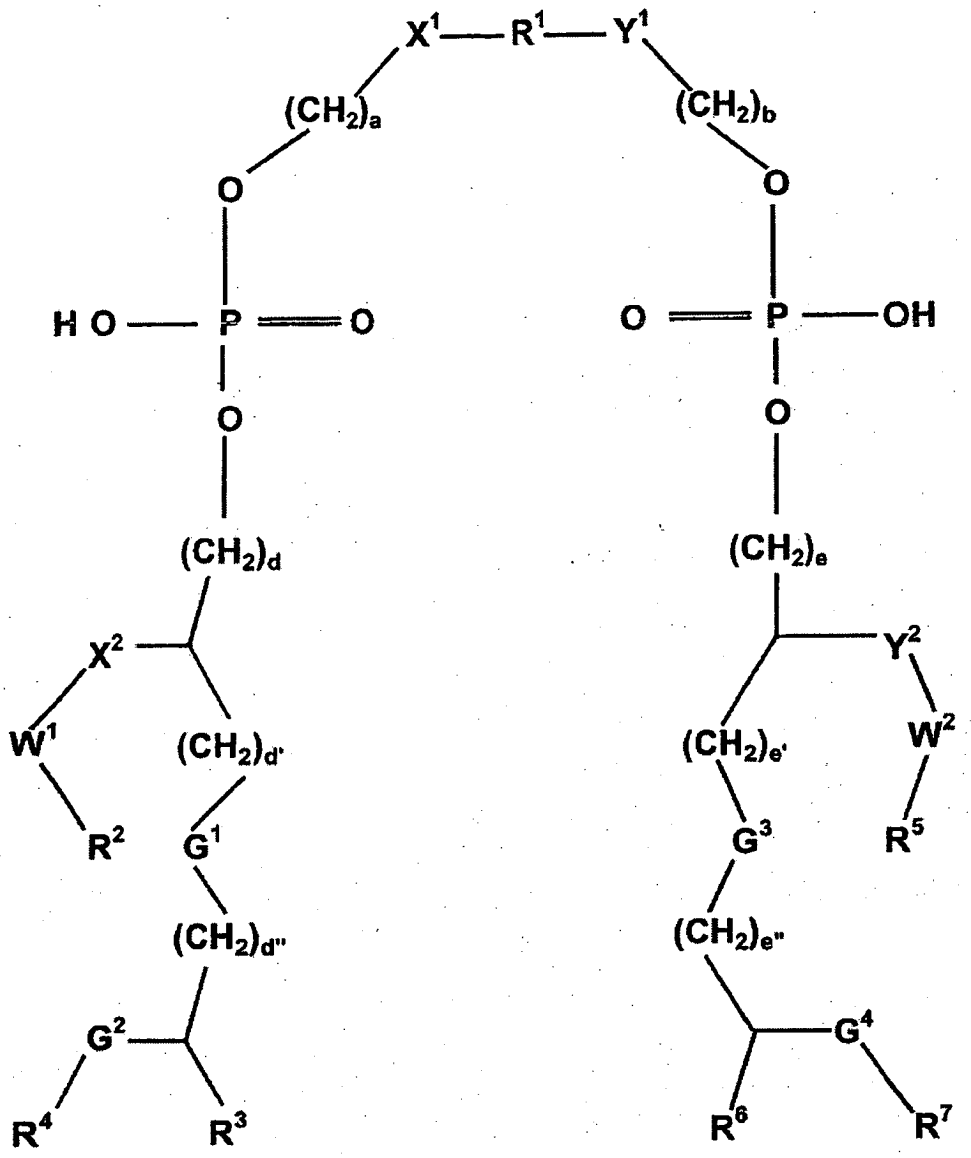
Segundo os aparelhos utilizados, as medidas podem variar ligeiramente em função dos componentes do aparelho e programas de tratamento de dados utilizados.

A temperatura de inversão de fase de uma emulsão e varia em função da natureza de seus componentes e de suas concentrações relativas. Vantajosamente, a composição da emulsão, de acordo com a invenção, é escolhida de modo que a inversão de fase ocorre a uma temperatura entre 45°C e 80°C, de forma preferida entre 50 e 65°C. Essa faixa de temperatura é vantajosa, pois a emulsão não corre o risco de mudar de estado, caso seja armazenada a uma temperatura relativamente elevada (≈ 37°C). Além disso, conforme no processo de preparo da emulsão termorreversível, o aquecimento dos componentes não excede 80°C, isto contribui para a manutenção da integridade estrutural dos componentes e, em particular, TLA4. Quando a temperatura de inversão de fase da emulsão é elevada, notadamente quando ela é superior ou próxima de 80°C, pode-se utilmente baixá-la, acrescen-

tando à composição da emulsão um alditol que é habilmente escolhido dentre o sorbitol, o manitol;, o glicerol, o xilitol ou o eritritol. Quando o alditol é utilizado em uma faixa de concentração que vai de 0,1 a 10% (p/p), de preferência em uma faixa de concentração que vai de 1 a 10% (p/p) e, em particular, em uma faixa de concentração que vai de 2 a 7% (p/p), chega-se a reduzir a temperatura de inversão de fase da emulsão de aproximadamente 10°C. Pode-se também baixar a temperatura de inversão de fase da emulsão, substituindo-se a fase aquosa constituída unicamente de água por uma fase aquosa salina tamponada. Habitualmente, se utiliza um tampão TRIS, um tampão fosfato como o PBS, o tampão Dulbecco PBS sem Ca^{2+} nem Mg^{2+} ou um tampão citrato.

Os compostos químicos da fórmula I, II, III, ou IV são obtidos por via de síntese, segundo os processos descritos notadamente em US 2003/0153532 ou em US 2005/0164988.

Em particular, o TLA4, de acordo com a invenção, é um composto químico de fórmula I.



ou um sal farmaceuticamente aceitável desse composto.

Preferencialmente,

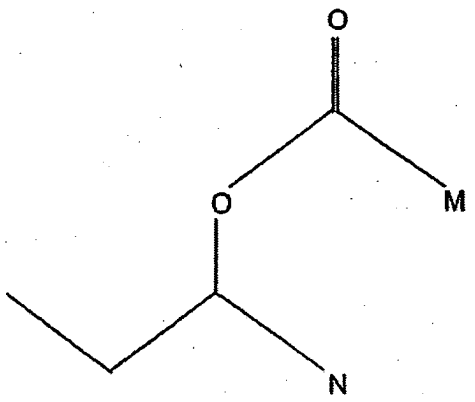
R1 é C(O) ou C(O)-$(CH2)_n$-C(O), n sendo 1, 2, 3 ou 4

a, b, d, d', d", e, e" são independentemente 1 ou 2,

X1, X2, Y1 e Y2 são NH,

W1 e W2 são C(O),

R2 e R5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila de cadeia linear em C10-C15 facultativamente substituído por um oxo, um NH-alquila de cadeia linear em C10-C15 e,



na qual M e N são independentemente uma alquila ou uma alcenila de cadeia linear em C2-C20,

R3 e R6 são cadeias alquilas lineares em C5-C10,

R4 e R7 são selecionados do grupo que consiste em um hidrogênio, C(O)-alquila de cadeia linear em C8-C12 e C(O)alcenila de cadeia linear em C8-C12,

G1 e G3 são um oxigênio ou -NH(CO)-

G2 e G4 são um oxigênio;

TLR4 exerce uma atividade imunoestimulante *in vitro* e/ou *in vivo*. A atividade imunoestimulante *in vitro* é avaliada notadamente:

1) medindo-se o aumento da produção de TNF α pelas células do sangue humano total ou

2) medindo-se o aumento da produção da fosfatase alcalina por uma linhagem THP-1 transfectada pelo gene da fosfatase alcalina soba dependência do promotor do TNFα ou

3) medindo-se o aumento da produção de citoquinas, tais como IL-10 e o interferon γ por esplenócitos murinos, ou

4) medindo-se o aumento da produção do TNF α pela linhagem macrofágica murina RAW264 ou,

5) medindo-se o aumento da produção de IL-6 pelo astrocitoma humano U373 ou

6) medindo-se o aumento da ativação/ a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos sobre a base da expressão dos marcadores de ativação, tais como CD25, CD80/CD83 por citometria de fluxo.

Todos esses testes de medida são bem-conhecidos por alguém versado na técnica e são notadamente descritos no exemplo 7 de US 2003/0153532 ou no Journal of Biological Chemistry, (2001), volume 276/3, página 1873-1880.

A atividade imunoestimulante *in vivo* se traduz por um aumento da resposta humoral e/ou da resposta celular específica. Para avaliar a resposta humoral , mede-se a produção de anticorpos específicos dirigidos contra um antígeno. A título de exemplo, pode-se fazer referência aos testes que são descritos no exemplo 8 de US 2003/0153532 para avaliar essa resposta. Quando a produção de anticorpos específicos (quer seja sob a forma de imunoglobulinas totais ou de um isótopo particular) observada na seqüência da injeção de um antígeno associado ao TLA4 é superior àquela que se observa consecutivamente à administração da mesma quantidade de antígeno sozinha, TLA4 é considerado como exercendo uma atividade imunoestimulante in vivo. Pode-se também avaliar a atividade imunoestimulante do TLA4, utilizando testes de medida da resposta celular específica que são bem-conhecidos por alguém versado na técnica, como, por exemplo, medindo-se a atividade dos linfócitos T citotóxicos (CTL) ou a linfoproliferação.

Preferencialmente, TLR4 é escolhido no grupo constituído pelos compostos químicos identificados e descritos em US 2003/0153532 sob as denominações ER803022, ER803058, ER803732, ER803789, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804764, ER111232, ER112022, ER112048, ER112065, ER112066, ER113651, ER118989, ER119327, ER119328.

Os compostos podem estar sob a forma de diastereo isômeros ou sob uma forma racêmica (mistura de diastereo isômeros), quando a estrutura química comporta vários carbonos assimétricos. Por exemplo, ER804057 e ER804053 que têm 4 carbonos assimétricos são diastereo isômeros de ER112066 que é a forma racêmica. ER804057 está em uma configuração isomérica de tipo (R, R, R, R), enquanto que ER804053 está em uma configuração de tipo (R, S, S, R). Da mesma forma, ER804058 que está em uma configuração do tipo (R, R, R, R) e ER804059 está em uma configu-

ração isomérica de tipo (R,S,S,R) são diastereo isômeros de ER113651 que é a forma racêmica. ER803022 que está em uma configuração de tipo (R, R, R, R), ER803732 que está em uma configuração (R, S, S, R) e ER803789 que está em uma configuração (R, R, S, R) são também diastereo isômeros de uma mesma molécula química. Utiliza-se, de forma preferida, os diastereo isômeros que têm uma configuração de tipo R, R, R, R geralmente mais ativos que as outras formas. Dentre estes, ER804057 é particularmente preferido. Trata-se do ácido dodecanóico (*1R,6R,22R,27R*)- 1,27-di-heptil -9,19-diidróxi- 9,19-dióxido -14-oxo- 6,22-bis[(1,3-dioxo tetradecil) amino] -4,8,10,18,20,24 -hexaoxa- 13,15- diaza-9,19- difosfa- heptacosano-1,27 -diil éster; ele está sob a forma de ácido livre ou sob a forma de sal. O peso molecular da forma ácida livre é de 1579, aquele do sal dissódico é de 1624. A fórmula bruta do sal dissódico é C83H158N4Na2O19P2.

No plano estrutural, o agonista do TLR4 segundo o objeto da invenção é uma molécula anfífilo. As moléculas anfífilas têm um comportamento ao mesmo tempo hidrófilo e hidrófobo e têm tendência a se precipitar no decorrer do tempo. Elas se dissolvem com freqüência incompletamente nos solventes orgânicos ou aquosos e estão com freqüência na origem de soluções instáveis ou dificilmente reprodutíveis. Existe uma necessidade de melhorar a formulação dessas moléculas. A emulsão tal como descrita na invenção responde a essa necessidade fornecendo emulsões que são estáveis no decorre do tempo. Uma emulsão, de acordo com a invenção, que é conservada durante 6 meses a +4°C conserva as características que tinha inicialmente: a distribuição de tamanho das gotículas de óleo não varia de uma forma sensível; o aspecto leitoso, fluido e homogêneo da emulsão é conservado; e de forma notória, a integridade estrutural do TLA4 não é alterada conforme mostra o exemplo II. Constatou-se mesmo que uma emulsão, de acordo com a invenção, podia ser armazenada a uma temperatura de -2°C durante pelo menos 48 horas, sem observar de variação notória no nível da distribuição de tamanho das gotículas de óleo. Por outro lado, a emulsão, de acordo com a invenção, diminui o poder pirógeno de certos agonistas do TLR4.

A proporção entre a quantidade de TLA4 e a quantidade total de tensoativos hidrófilo e hidrófobo da emulsão está habitualmente entre 0,01 x 10^{-2} e 5 x 10^{-2}, mais particularmente entre 0,1 x 10^{-2} e 2 x 10^{-2}. Nessa faixa de proporção, a quantidade de TLA4 é suficientemente pequena para não exercer influência sobre o poder emulsionante dos tensoativos, mas é em quantidade suficiente para exercer uma atividade imunoestimulante *in vitro e/ou in vivo*.

O tensoativo hidrófilo, de acordo com a invenção, tem uma HLB (balanço hidrófilo/lipófilo) $\geq$ 10 e pertence ao grupo químico dos polioxietileno alquil éteres (PAE), ainda denominados éteres polioxietilenados de álcoois graxos. Esses tensoativos não-iônicos são obtidos por condensação química entre um álcool graxo e o óxido de etileno. Eles têm uma fórmula química geral do tipo R-(O-CH_2 CH_2)$_n$ -OH na qual o radical R designa habitualmente um resto alquil saturado ou insaturado e n designa o número de unidades de óxido de etileno. Segundo o objeto da invenção, R contém entre 1 e 50 átomos de carbono, de forma preferida entre 4 e 20 átomos de carbono e de forma particularmente preferida entre 10 e 20 átomos de carbono. N é $\geq$ 2, geralmente compreendido entre 4 e 50. A emulsão, de acordo com a invenção, compreende habitualmente um único PAE hidrófilo. Uma mistura de vários PAE convém também à medida que o HLB global é $\geq$ 10.

Os éteres polióxi etilenados de álcoois graxos que são convenientes ao objeto da invenção podem estar sob uma forma líquida ou sólida à temperatura ambiente. Dentre os compostos sólidos, preferem-se aqueles que se dissolvem diretamente na fase aquosa ou que não necessitam de aquecimento importante.

À medida que o número de unidades de óxidos de etilenos seja suficiente, os éteres polióxi etilenados de álcoois láurico, mirístico, cetílico, oléico e/ou esteárico são particularmente apropriados ao objeto da invenção. Pode-se notadamente encontrá-los na faixa dos produtos conhecidos sob as denominações comerciais de Brij®, Eunulgin® ou Simulsol®.

Uma emulsão particularmente preferida, de acordo com a invenção, contém como tensoativo hidrófilo não-iônico um polioxietileno alquil éter

escolhido no grupo constituído pelo polióxi etileno (12) cetoestearil éter (ceteareth-12) (comercializado sob a denominação de Eumulgin® B1), do polioxietileno (20) cetostearil éter (ceteareth-20) (Eumulgin® B2), do poioxietileno (21) estearil éter (steareth-21) (Eumulgin® S21), do polioxietileno (20) cetil éter (ceteth-20) (Simulsol® 58 ou Brij® 58), do polioxietileno (10) cetil éter (ceteth-10) (Brij®56), do polioxietileno (10) estearil éter (steareth-10) (Brij® 76), do polioxietileno (20) estearil éter (steareth-20) (Brij®78), do polioxietileno (10) oleil éter (oleth-10) (Brij®96 ou Brij®97, do polioxietileno (20) oleil éter (oleth-20) (Brij®98 ou Brij®99). O número aposto a cada nome químico corresponde ao número de unidades de óxido de etileno na fórmula química.

Um composto particularmente adaptado e preferido em razão de sua origem semissintética e Eumulgin®B1 (ceteareth-12) fornecido pela sociedade COGNIS.

A emulsão, de acordo com a invenção, contém tab um tensoativo hidrófobo não-iônico, do qual HLB é $\leq$ 6. A emulsão compreende habitualmente um único tensoativo hidrófobo não-iônico. Uma mistura de vários tensoativos hidrófobos não-iônicos convém também à medida que HLB global é $\leq$ 6. Tipicamente, trata-se de um éster hidrófobo do sorbitano ou de um éster hidrófobo do manídeo. Os ésteres de sorbitano são habitualmente obtidos por reação de esterificação entre um ácido graxo e o sorbitol, o monoanidro de sorbitol, ou o dianidro de sorbitol. Os ésteres de manídeo são habitualmente obtidos por reação de esterificação entre um ácido graxos e o monoanidro ou o dianidro de manitol. De forma preferida, trata-se do manídeo monooleato (comercializado pela sociedade SIGMA, ou fornecido pela sociedade SEPPIC sob a denominação de Montanide 80®) ou do sorbitano monooleato comercializado sob a denominado de Spam®80, de Dehymuls SMO®(COGNIS) ou de montane 80®(SEPPIC)).

Graças à seleção desses tensoativos particulares dentre todos os tensoativos propostos na técnica anterior para preparar emulsões, foi então descoberto que se podia muito vantajosamente produzir uma emulsão H/E adjuvante , aplicando-se um processo de inversão de fase fácil de utilizar.

Quando as concentrações respectivas em tensoativos hidrófilo e hidrófobo são tais que HLB da mistura (HLB_m) se situa entre 8,5 e 10, e mais particularmente entre 8,6 e 9,6, as emulsões, de acordo com a invenção, são geralmente homogêneas e freqüentemente pelo menos 90% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho < 0,2 µm. Essas emulsões são, por outro lado, particularmente estáveis. As quantidades de tensoativos hidrófilo e hidrófobo na emulsão de escaleno são acrescentadas , de preferência, para que HLB_m se situe entre 8,6 e 9,6. Para determinar as concentrações respectivas em tensoativos hidrófilo e hidrófobo na composição da emulsão se utiliza a seguinte fórmula:

$$HLB_m = HLB_e \times HLB_{pae} \times (1-M)$$

na qual,

HLB_m corresponde à HLB da mistura que é, de preferência, entre 8,5 e 10, e mais particularmente entre 8,6 e 9,6

HLB_e corresponde à HLB do tensoativo hidrófobo

M corresponde a percentagem em massa do tensoativo hidrófobo na mistura constituída pelo tensoativo hidrófobo e do PAE.

HLB_{pae} corresponde a HLB do PAE.

O escaleno que representa a fase oleosa da emulsão tem por fórmula química bruta $C_{30}H_{50}$ e compreende 6 duplas ligações. Esse óleo é metabolizável e apresenta as qualidades requeridas para ser utilizada em um produto farmacêutico injetável. Ela provém do fígado de origem animal, mas pode ser extraída também do óleo de oliva (origem vegetal). Foram também obtidos bons resultados, utilizando-se o escaleno fornecido pela sociedade Fluka que é de origem animal. Geralmente, a quantidade de escaleno representa entre 5 e 45% do peso total da emulsão.

A proporção mássica entre a quantidade de escaleno e a quantidade total de tensoativos na emulsão, de acordo com a invenção, está habitualmente compreendida entre 2,0 e 4,0, de forma preferida entre 2,5 e 3,5.

Uma composição da emulsão, de acordo com a invenção, particularmente preferida compreende:

- escaleno;

- um tampão fosfato ou um tampão citrato como solvente aquoso;

- o composto ER804057 como agonista do TLR4;

- o ceteareth-12 (Eumulgin® B1) como tensoativo hidrófilo;

- monooleato de sorbitano como tensoativo hidrófobo.

A quantidade de escaleno representa entre 5 e 45% do peso total da emulsão. A quantidade do composto ER804057 representa habitualmente entre 0,05% e 2% do peso dos dois tensoativos. De forma preferida, as quantidades de ceteareth-12 e de monooleato de sorbitano são tais que HLB da mistura dos dois tensoativos se situa entre 8,5 e 10 e mais particularmente entre 8,6 e 9,6. A proporção entre a quantidade de escaleno e a quantidade total de ceteareth-12 e de monooleato de sorbitano está compreendida entre 2,0 e 4,0, de forma preferida entre 2,5 e 3,5. Além disso, essa composição pode conter manitol, cuja quantidade representa habitualmente entre 0,1% e 10% do peso total da emulsão.

A fase aquosa da emulsão, de acordo com a invenção, pode conter, além disso, um substrato de liofilização contendo um ou vários crioprotetores. Os crioprotetores são habitualmente escolhidos dentre os açúcares como a sacarose, os poliálcoois como o manitol ou o sorbitol ou os derivados de açúcares, tais como os alquil poliglicosídeos, como o decil-D galactosídeo uronato de sódio ou o dodecil β maltosídeo. Utiliza-se habitualmente um substrato de liofilização que contém em mistura sacarose, manitol e dodecil β maltosídeo. A emulsão, de acordo com a invenção, pode ser então liofilizada e conservada sob a forma de liofilizado. Ela conserva, todavia, todas as suas características, pois uma vez retomada em fase aquosa ela se torna de novo uma emulsão H/E leitosa, estável e fluida, termorreversível com uma distribuição de tamanho de gotículas de óleo similar àquela que pré-existiria antes da liofilização.

A fase aquosa da emulsão, de acordo com a invenção, exerce também o papel de adjuvante da resposta imune a um antígeno. Por antígeno, no sentido da presente invenção, entende-se qualquer antígeno capaz de ser utilizado em uma vacina, quer se trate de um germe pleno, vivo, ate-

nuado ou morto, de um extrato de germe ou de uma forma subunitária. Quando ele está sob uma forma subunitária, a natureza do antígeno pouco importa: pode ser um peptídeo, uma proteína, uma glicoproteína, um polissacarídeo um glicolipídeo, um peptídeo, um ácido nucléico. Dentre os antígenos convenientes ao objeto da invenção, são citados os antígenos bacterianos provenientes de *Clostridium tetani, Clostridium diphiteriae, Bordetella pertussis, Haemophilus influenzae* tipo *b, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Shigella sp., Salmonella tiphi, Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis, Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis* ou *Streptococcus sp*, de antígenos virais provenientes do vírus da hepatite A, B ou C, do vírus da gripe, do vírus sincitial respiratório, dop vírus West Nile, do vírus da raiva, do polivírus, do vírus HIV, do vírus da dengue, da encefalite japonesa, do vírus da febre amarela, do citomegalovírus, ou do vírus da herpes, de antígenos parasitários provenientes notadamente de Plasmodium sp. Ou de antígenos tumorais. Esses antígenos podem ser obtidos aplicando-se processos de recombinação genético ou aplicando processos de extração bem-conhecidos do técnico. A emulsão, de acordo com a invenção, age sobre a imunidade humoral, aumentando a produção de anticorpos específicos e/ou sobre a imunidade celular específica, favorecendo notadamente a proliferação dos linfócitos T, o desenvolvimento de uma resposta citolítica específica (resposta CTL), e/ou a produção de citoquinas, quemoquinas, fatores de crescimento, produzidos pelos linfócitos ativados.

É por isso que a invenção tem também por objeto a utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, para o preparo de uma composição vacinal. A composição vacinal obtida se mostrou mais imunogênica, por exemplo porque a composição induz uma resposta imune específica mais forte, quer ela seja de ordem humoral e/ou de ordem celular, ou porque uma quantidade de antígeno menor é necessária para se obter uma resposta imune de mesma intensidade e de duração comparável. A composição vacinal obtida a partir de uma emulsão, de acordo com a invenção, pode ser administrada por todas as vias habitualmente utilizadas ou preconizadas para as vacinas: via parenteral, via intradérmica, via subcutânea, ou intramus-

cular ou a via mucosal, e se apresentar sob diversas formas notadamente líquida ou liofilizada. Ela pode ser administrada por meio de uma seringa ou por meio de um injetor sem agulha para injeção intramuscular, subcutânea ou intradérmica, ou por meio de um spray nasal.

A composição vacinal está geralmente sob a forma de uma mistura do antígeno com uma emulsão, de acordo com a invenção. Ela pode se apresentar também sob a forma de uma formulação extemporânea. Nesse caso, o antígeno e a emulsão são colocadas em contato exatamente antes ou no momento da administração da composição vacinal. Por exemplo, o antígeno pode ser liofilizado e retomado pela emulsão exatamente antes da administração ou, ao contrário, a emulsão pode estar sob uma forma liofilizada e retomada por uma solução do antígeno. A composição vacinal pode se achar também em um dispositivo particular de injeção como a seringa "by pass", quando não se deseja misturar o antígeno com a emulsão.

Quando a composição vacinal está sob a forma de uma mistura obtida por diluição de uma emulsão, de acordo com a invenção, com uma solução de antígeno, ela está habitualmente sob a forma de uma emulsão H/E, na qual a quantidade de escaleno representa em peso, em geral, entre 0,5 e 5% do peso total da composição vacinal. Ela pode estar também sob a forma de uma emulsão H/E termorreversível, quando a quantidade de escaleno na composição vacinal atinge ou ultrapassa 5% (p/p). Quando a composição vacinal é uma emulsão H/E termorreversível, ela pode estar, em particular, sob uma forma, na qual pelo menos 90% da população volúmica das gotículas de óleo tem um tamanho $\leq$ 0,2 µm.

De uma forma surpreendente, a emulsão, de acordo com a invenção, tem maior capacidade de induzir anticorpos neutralizantes do que uma emulsão H/E da técnica anterior obtida por microfluidização, da qual a composição contém escaleno, polioxetileno sorbitano monooleato (Tweeen® 80) e sorbitano trioleato (Span® 85) (emulsão H/E da técnica anterior).

Os anticorpos neutralizantes são anticorpos funcionais dirigidos contra um germe infeccioso, produzidos por um indivíduo que foi imunizado com um antígeno assemelhado ou derivado desse germe ou que esteve em

contato com esse germe, e que impedem a infecção das células por esse germe. Eles exercem um papel muito importante na prevenção ou no tratamento das infecções causadas por germes intracelulares, em particular os vírus e os parasitas unicelulares notadamente plasmodium sp.. Antígenos provenientes da forma "esporozoite" de plasmodium falciparum (tais como a proteína maior de superfície do esporozoite de Plasmodium falciparum, (tais como a proteína maior de superfície do esporozoite (*circumsporozoite protein*), LSA3, ou o antígeno Pfs 16), assim como antígenos provenientes da forma "merozoite" de Plasmodium falciparum (tais como o antígeno MSP1, MSP2, MSP3, EBA-175, Rhop-1, Rhop-2, Rhop3, RAP-1, RAP-2, RAP-3, Pfl55/RESA ou AMA-1) induzem anticorpos neutralizantes. A utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, para preparar uma composição vacinal contendo um ou vários antígenos oriundos dos esporozoites ou dos merozoites de Plasmodium falciparum é indicada para amplificar a resposta imune neutralizante. Pode-se, em particular, utilizar uma emulsão, de acordo com a invenção, para preparar uma composição vacinal, compreendendo como antígeno vacinal a proteína LSA de Plasmodium falciparum. O gene codificando para essa proteína foi identificado por Gardner et al., (Science (1998), 282, 1126-1132) e se acha sobre o cromossoma 2 de Plasmodium falciparum (cepa 3D7). A seqüência inteira do gene é longa de 12240 pares de bases e codifica para uma proteína de 1558 ácido aminados. As seqüências nucleotídica e protéica são descritas no banco de dados EMBL sob os números de acesso AE001424 e uniprot 096275-PLAF7. Como antígeno vacinal, pode-se utilizar a proteína tal como descrita, peptídeos, ou fragmentos dessa proteína, conforme aqueles descritos em WO 02/38176. Habitualmente, utiliza-se a proteína total (que pode conter uma ou várias mutações pontuais para considerar variações que existem entre as cepas de Plasmodium falciparum) ou um fragmento dessa proteína, cuja seqüência de ácidos aminados tem uma identidade de pelo menos 80% em relação à seqüência completa descrita em uniprot 096275-PLAF7. A eficácia de certas vacinas antivirais é em certos casos avaliada com base na taxa de anticorpos neutralizantes que induzem. É o caso da vacina contra a gripe cuja eficácia está

relacionada à taxa de anticorpos que inibem a hemaglutinação (IHA).

A emulsão, de acordo com a invenção, serve para preparar uma composição vacinal para o tratamento ou a prevenção das doenças infecciosas no homem ou no animal (pássaros, cavalo) ligadas ao vírus da gripe. Segundo a natureza da vacina contra a gripe a composição vacinal pode se apresentar sob diferentes formas:

- quando a vacina gripal contém uma ou várias cepas de vírus totais inativados ou "splittés", ou está sob a forma de uma vacina subunitária contendo a hemaglutinina purificada de uma ou várias cepas virais, ou sob a forma de virossomas (vacina Berna), a composição vacinal, se apresenta habitualmente sob a forma de uma mistura, de uma emulsão H/E ou de uma emulsão H/E termorreversível;

- quando a vacina gripal contém uma ou várias cepas de vírus vivos atenuados, a composição vacinal se acha, de forma preferida, em um dispositivo tipo seringa "by pass", de forma que o vírus vivo não esteja em contato direto com a emulsão. A suspensão viral e a emulsão, de acordo com a invenção, se acha em dois compartimentos separados da seringa.

As vacinas contra a gripe são fabricadas a partir de vírus gripais cultivados sobre ovos ou sobre células, segundo métodos bem-conhecidos do técnico e compreendem todos como componente essencial a hemaglutinina de uma ou várias cepas virais.

A invenção tem, portanto, também por objeto a utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, para o preparo de uma composição vacinal, compreendendo como antígeno vacinal uma ou várias hemaglutininas do vírus gripal. Essa composição vacinal pode ser utilizada para vacinar:

1) populações de indivíduos que são soronegativos face ao vírus gripal: trata-se de indivíduos que jamais estiveram em contato ou sensibilizados com o vírus gripal ou seus componentes imunogênicos, ou de indivíduos que jamais estiveram em contato com uma nova cepa de vírus gripal na origem de pandemia;

2) populações de indivíduos soropositivos face ao vírus gripal: trata-se de indivíduos que estiveram em contato ou sensibilizados com o

vírus gripal ou seus componentes imunogênicos;

3) populações de indivíduos idosos que apresentam freqüência uma alteração da imunidade celular e/ou humoral que se observa notadamente face ao vírus da gripe.

A emulsão, de acordo com a invenção, serve também para preparar uma composição vacinal para o tratamento ou a prevenção das doenças infecciosas de herpes virus (HSV1, HSV2, citomegalovirus (CMV)). Os antígenos do envoltório viral são geralmente utilizados na composição vacinal. Nas infecções com CMV, os anticorpos que são dirigidos contra as proteínas do envoltório viral, principalmente a glicoproteína B (gB) e a glicoproteína H (gH) e que neutralizam a infecção viral, exercem um papel muito importante no desenvolvimento de uma imunidade protetora. A utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, no preparo de uma composição vacinal contendo uma proteína do envoltório do CMV tem por efeito aumentar a produção de anticorpos neutralizantes.

A invenção tem, portanto, por objeto a utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, para o preparo de uma composição vacinal, compreendendo como antígeno vacinal um antígeno do envoltório do CMV. Tipicamente, o antígeno é a glicoproteína gB e/ou a glicoproteína gH. Pode tratar-se também de um peptídeo ou de um polipeptídeo derivado da gB e/ou da gH, compreendendo uma ou vários epitopos neutralizantes.

GB em sua forma nativa (gp130), codificada pelo gene UL 55 do CMV, é uma glicoproteína de 906 ou 907 ácidos aminados, segundo o fato de se tratar da cepa AD169 ou da cepa Towne. As seqüências protéicas dessas duas cepas são descritas em US 2002/0102562 (figura 2). A forma nativa da gB contém uma seqüência sinal, seguida de um domínio extracelular contendo um local de clivagem endoproteolítica entre os resíduos Arginina 460 e Serina 461, de um domínio transmembranário e de um domínio intracelular. Foram descritos vários domínios antigênicos, induzindo anticorpos neutralizantes. Trata-se notadamente do domínio que se situa entre os resíduos ácidos aminados 461 e 680 da gp 130, esse domínio subdividindo-se em dois domínios descontínuos, o domínio compreendido entre os resí-

duos 461 e 619 e o domínio compreendido entre os resíduos 620 e 680 (US 5.547.834). Trata-se também do domínio AD-1 localizado entre os resíduos de ácidos aminados 552 e 635 ou do domínio AD-2 localizado entre os resíduos de ácidos aminados 50 e 77 (Journal of General Virology (1999), 80, 2183-2191; Journal of Virology (2005), 79, 4066-4079). Por conseguinte, um polipeptídeo que compreende em sua seqüência de ácidos aminados uma seqüência homóloga a um dos domínios citados convém ao objeto da invenção. Tipicamente, o polipeptídeo compreende em sua seqüência de ácidos aminados uma seqüência homóloga àquela que se situa entre os resíduos 461 e 680 da gp130 ou mais especificamente àquela que se situa entre os resíduos 552 e 635. Por seqüência homóloga, entende-se qualquer seqüência de ácidos aminados, cuja identidade é de pelo menos 80% com a seqüência de ácidos aminados do domínio antigênico considerado situado sobre a gp 130 da cepa Towne ou AD169 (descritas em US 2002/0102562). Tipicamente, a homologia de(SEQ ID Nº é baseada em uma identidade de pelo menos 90%, e de forma ainda mais particular a homologia de seqüência é baseada em uma identidade de seqüência de 100%.

Dentre os peptídeos ou polipetídeos derivados de gB convenientes ao objeto da invenção, cita-se notadamente a gp 55, tal como descrita em US 5.547.834. Ela é oriunda da clivagem da gB no nível do local de clivagem endoproteolítica; sua seqüência de ácidos aminados corresponde àquela que se situa entre os resíduos serina 461 e a extremidade C-terminal. Podem-se também utilizar formas truncadas da gp55, tal como uma gp55 desprovida total ou parcialmente da seqüência transmembranária e total ou parcialmente do domínio C-terminal intracelular (por exemplo um peptídeo que tem uma seqüência homóloga à seqüência de ácidos aminados da gp130 compreendida entre os resíduos 461 e 646) ou uma gp 55 desprovida total ou parcialmente do domínio C-terminal intracelular (por exemplo um peptídeo que tem uma seqüência homóloga de ácidos aminados da gp130 compreendida entre os resíduos 461 e 680) que são descritas em US 5.547.834. Pode-se também utilizar uma forma mutada da gB que porta uma ou vários mutações no nível do local de clivagem endoproteolítica , de modo

que este é tornado inoperante. A(s) mutação (ões) é (são) localizada(s) entre os resíduos 457 e 460 da seqüência da gp 130 e mais particularmente se situa(m) no nível da arginina 460 e/ou a lisina 459 e/ou a arginina 457. Um antígeno de envoltório do CMV conveniente particularmente ao objeto da invenção é uma forma truncada da gB desprovida total ou parcialmente do domínio C-terminal e/ou desprovida total ou parcialmente da seqüência transmembranária e cujo local de clivagem é inoperante. Uma forma truncada da gB particularmente preferida corresponde àquela que é descrita em US 6.100.064, nomeado gBdTM; ela porta três mutações no nível do local de clivagem e uma deleção no nível da região transmembranária entre os resíduos de ácidos aminados Valina 677 e Arginina 752, de modo que o domínio extracelular é diretamente ligado ao domínio citoplásmico.

A proteína gB ou os polipeptídeos derivados desta são obtidos por meio de processos de recombinação genética e purificados segundo métodos bem-conhecidos do técnico. Podem ser notadamente aplicados os processos descritos em US 6.100.064 e em US 2002/0102562 incorporados por referência. Para aumentar sua imunigenicidade, podem-se secundariamente conjugá-los a uma proteína portadora ou fundi-los com outras proteínas, notadamente proteínas que formam partículas como antígeno de superfície da hepatite B (HbS). A proteína gB ou os peptídeos derivados desta podem também ser expressos por vírus recombinantes, notadamente por adenovírus recombinantes ou poxvírus recombinantes. Para o preparo desses vetores recombinantes que expressam a gB ou peptídeos derivados, aplicam-se os métodos que são descritos notadamente em US 6.162.620, US 5.866.383, US 5.552.143, US 6.183.750, US 5.338.683, WO 9215672 ou em WO 9639491. A gB pode também ser apresentada por uma cepa de CMV que foi atenuada por passagens sucessivas sobre culturas celulares, notadamente acepa Towne que foi testada para fins vacinais.

A proteína gH é codificada pelo gene UL 675 do CMV. É uma glicoproteína de 742 ou 743 ácidos aminados segundo o fato de se tratar da cepa Towne ou da cepa AD169. As seqüências são descritas em US 5.474.914 (figura 1) e em US 6.610.295 (figura 5(a)). A seqüência protéica

da gH deduzida de sua seqüência nucleotídica contém um peptídeo sinal seguido de um domínio extracelular que não possui local de clivagem endoproteolítica, de um domínio transmembranário e de um domínio citoplásmico C-terminal. Os epitopos neutralizantes se situam no domínio extracelular, principalmente na parte N-terminal desse domínio, mais especificamente entre os resíduos de ácidos aminados 15 e 142 da seqüência protéica da gH nativa e de forma ainda mais específica entre os resíduos de ácidos aminados 33 e 142. Um epitopo maior neutralizante da cepa AD 169 foi identificado e se situa entre os resíduos 33 e 43 da seqüência da gH e tem por seqüência LDPHAFHLLL (Urban M et al.: J. Virol (1992, vol 66/3, p 1303-1311)). Por conseguinte, um polipeptídeo que compreende em sua seqüência ácidos aminados uma seqüência homóloga à seqüência LDPHAFHLLL ou uma seqüência homóloga àquela que se situa entre os resíduos 15 e 142 ou entre os resíduos 33 e 142 da seqüência protéica da gH convém ao objeto da invenção. Por seqüência homóloga, entende-se uma seqüência de ácidos aminados, cuja identidade é de pelo menos 80% com a seqüência de ácidos aminados que se situa seja entre os resíduos 15 e 142, seja entre os resíduos 33 e 142 da seqüência protéica da gH da cepa AD 169, ou com a seqüência LDPHAFHLLL. Mais particularmente, a homologia de seqüência é baseada em uma identidade de pelo menos 90%, e de forma ainda mais particular a homologia de seqüência é baseada em uma identidade de seqüência de 100%.

Com peptídeos ou polipeptídeos derivados da gH conveniente ao objeto da invenção, cita-se a gH desprovida total ou parcialmente de sua região transmembranária e/ou desprovida total ou parcialmente de sua região citoplásmica. Tipicamente, isto corresponde a uma proteína gH que é deletada de pelo menos 5 resíduo, de forma preferida de pelo menos 10 resíduos C-terminais e de forma ainda mais preferida entre 20 e 34 resíduos da extremidade C-terminal da seqüência ácidos aminados.

A proteína gH, os polipeptídeos ou os peptídeos derivados desta são obtidos por meio de processos de recombinação genética e purificados segundo métodos bem-conhecidos do técnico, notadamente aqueles descri-

tos em US 5 474 914 ou US 5 314 800 incorporados por referência. Para aumentar sua imunogenicidade, pode-se secundariamente conjugá-los a uma proteína portadora. Eles podem ser também produzidos sob a forma de proteína de fusão conforme descrito em J. Virol (1992, vol 66/3, p 1303-1311). A proteína gH, os polipeptídeos ou os peptídeos derivados desta podem também ser expressos por vírus recombinantes, notadamente por adenovírus recombinantes ou poxivírus recombinantes. Para o preparo desses vetores recombinantes que expressam a gH ou formas derivadas, aplicam-se os métodos que são descritos notadamente em US 6 161 620, US 5 866 383, US 5 552 143, ou WO 9639491. A proteína gH pode ser também apresentada por uma cepa de CMV que foi atenuada por passagens sucessivas sobre culturas celulares, notadamente a cepa Towne que foi testada para fins vacinais.

Pode-se também utilizar como antígeno vacinal uma proteína resultante da fusão entre a glicoproteína gB ou a glicoproteína gH (ou uma forma truncada destas) e uma proteína de membrana de HSV1 ou de HSV2 (ou uma forma truncada destas). A título de exemplo citam-se as proteínas de fusão descritas em EP 0759995, em particular gB 685* e gB 685** que resultam da fusão entre uma parte da glicoproteína gB do CMV e uma parte da glicoproteína gD de HSV.

Segundo a natureza do antígeno do CMV, a composição vacinal pode apresentar sob diferentes formas:

- quando o antígeno é uma proteína ou um peptídeo, a composição vacinal pode estar sob a forma de uma mistura, de uma emulsão H/E ou de uma emulsão H/E termorreversível. Ela pode também estar sob a forma de um preparo extemporâneo que se realiza exatamente antes da administração. A composição vacinal pode também se achar no interior de um dispositivo, tal como uma seringa "bypass" que separa fisicamente o antígeno da emulsão;

- quando o antígeno do CMV está sob a forma de um vírus recombinante expressando a gB, a gH ou um peptídeo derivado da gB ou da gH, ou quando está sob a forma de uma cepa atenuada de um CMV, o antí-

geno e a emulsão, de acordo com a invenção, não estão habitualmente diretamente em contato na composição vacinal. O antígeno e a emulsão podem se achar no interior de um dispositivo que os separa fisicamente, tal como uma seringa "bypass", mais são administrados no mesmo momento sobre o mesmo local de administração.

A emulsão, de acordo com a invenção, orienta também a resposta celular T CD4+ específica para um perfil de tipo Th1, favorecendo as citoquinas de tipo Th1 (IL2, IFN-γ, ...) e/ou diminuindo a produção de citoquinas de tipo Th2 (IL4, IL5, IL10,...) em resposta a um antígeno apresentado em um contexto MHC classe II. Esse efeito é avaliado, medindo-se a taxa de IFN-γ e de IL5 produtos após reestímulo *in vitro* com um antígeno similar àquele que serviu para a imunização in vivo e determinando a proporção IFN-γ/IL5. Quanto mais elevada for a proporção, mais a resposta CD4+ será de tipo Th1. Pode-se também avaliar indiretamente o perfil da resposta celular T CD4+, medindo-se a proporção entre a taxa de Ig2a específicos/IgG1 específicos obtida após imunização dos ratos com uma composição vacinal, de acordo com a invenção.

A emulsão, de acordo com a invenção, pode portanto ser utilizada para corrigir um desequilíbrio da resposta celular T CD4+ que se observa em certas populações de indivíduos que apresentam um déficit imunitário ou uma alteração do sistema imunitário. Trata-se notadamente das pessoas idosas que apresentam um déficit em produção de IFN-γ e/ou em IL2 consecutivamente a um estímulo *in vitro* com um antígeno proveniente de germes intracelulares, notadamente com um antígeno da gripe (Ouyang et al (Mechanims of ageing and development), 2000, vol 121, 131-137).

A invenção tem, portanto, por objeto a utilização de uma emulsão, de acordo com a invenção, para o preparo de uma composição vacinal, destinada a uma população de indivíduos que apresentam um desequilíbrio no nível da resposta celular T CD4+.

A invenção tem também por objeto um processo de preparo de uma emulsão H/E, de acordo com a invenção, compreendendo uma etapa na qual uma emulsão inversa E/H é obtida por elevação de temperatura e

uma etapa na qual a emulsão inversa E/H é transformada em emulsão H/E por diminuição da temperatura. Essa transformação ocorre, quando a emulsão E/H obtida é baixada a uma temperatura inferior à temperatura de inversão de fase dessa emulsão.

De acordo com um modo de realização do processo, a emulsão E/H é obtida, misturando-se em uma primeira etapa uma fase aquosa que compreende um solvente aquoso, um polioxietileno alquil éter e um agonista do TLR4 com uma fase oleosa compreendendo o escaleno e um tenso ativo hidrófobo não-iônico para se obter uma emulsão H/E e aquecendo-se em uma segunda etapa a emulsão H/E a uma temperatura que é pelo menos a temperatura de inversão de fase da emulsão.

Incorpora-se a fase aquosa, compreendendo a solução aquosa (habitualmente uma solução tamponada), o agonista do TLR4 (se não estiver na fase oleosa), e o tendo ativo hidrófilo não-iônico, na fase oleosa compreendendo o escaleno e o tenso ativo não-iônico hidrófobo ou o contrário: incorpora-se a fase oleosa na fase aquosa. Essa incorporação é feita sob agitação mecânica. Obtém-se uma emulsão H/E grosseira, não calibrada e instável (pré-emulsão). Aquece-se essa pré-emulsão sob agitação mecânica até obtenção de uma inversão de fase, isto é, a obtenção de uma emulsão E/H. A transição ou inversão de fase pode ser seguida por conductimetria. A temperatura à qual ocorre a mudança de curvatura que traduz a passagem de um tipo de emulsão para um outro é a temperatura de inversão de fase. Na realidade, essa temperatura é antes de tudo um intervalo de temperatura que um valor pontual muito preciso; com efeito, pode-se considerar que essa temperatura é capaz de uma variação de um ou dois graus, isto a fim de que a totalidade da emulsão sofra o fenômeno de inversão de fase. Quando a emulsão sob a forma de uma emulsão E/H, observa-se uma queda brutal da condutividade. Pára-se o aquecimento e resfria-se a mistura. O resfriamento pode ser efetuado de forma passiva, deixando simplesmente a temperatura voltar espontaneamente à temperatura ambiente ou de maneira mais ativa, efetuando-se, por exemplo, uma imersão da emulsão em um banho de gelo. Quando da descida em temperatura, a emulsão E/H vai de novo se inverter

à temperatura de inversão de fase para dar de novo uma emulsão H/E. A emulsão pode ser armazenada no estado, esperando ser diluída por uma solução que compreende o antígeno vacinal. Ela é termorreversível, o que significa que, se ela for levada de novo a uma temperatura pelo menos igual à temperatura de inversão de fase, ela vai se tornar de novo uma emulsão E/H. A temperatura de inversão de fase está habitualmente entre 45 e 80°C, e de forma típica entre 50 e 65°C. Submetem-se assim os componentes da emulsão, notadamente o agonista do TLR4 a um aquecimento moderado, o que evita uma evaporação da fase aquosa ou uma degradação química dos compostos.

De acordo com um outro modo de realização, a emulsão E/H é obtida, aquecendo-se separadamente uma fase aquosa que compreende um solvente aquoso, um polioxietileno alquil éter e um agonista do TLR4 e uma fase oleosa, compreendendo escaleno e um tensoativo hidrófobo não-iônico a uma temperatura que é pelo menos igual à temperatura de inversão de fase da emulsão, depois misturando-se a fase aquosa com a fase oleosa, mantendo a temperatura da mistura a uma temperatura que é pelo menos igual à temperatura de inversão de fase.

Nesse caso, aquecem-se separadamente as fases aquosas e oleosas a uma temperatura ligeiramente superior à temperatura de inversão de fase, antes de misturá-las para dar uma emulsão inversa E/H que será em seguida resfriada até obtenção da emulsão submicrônica H/E. Essas operações podem ser realizadas em reservatórios separados para um preparo em lotes.

Também é possível utilizar um processo de fabricação em linha. O processo consiste em misturar a quente as duas fases aquosas e oleosas preparadas separadamente, através de um misturador estático termostatado, seguido de um resfriamento em linha, através de um trocador térmico refrigerado conectado na saída do misturador estático, depois da recuperação final da emulsão, de acordo com a invenção, em um recipiente apropriado (frasco ou reator). Utilizou-se com sucesso um misturador estático constituído de uma sucessão de elementos de mistura compostos de lâminas cru-

zadas e inclinadas em relação ao eixo do tubo no qual são introduzidos. A energia necessária à mistura é fornecida pelas bombas que veiculam os fluídos, e a mistura é realizada sem peça móvel, através dos elementos de mistura pela separação, pelo deslocamento e a reunião sucessiva dos constituintes da mistura.

O processo de fabricação em linha é aplicado, da seguinte maneira: preparam-se separadamente, conforme anteriormente a fase aquosa e a fase oleosa em dois frascos ou reatores. As duas fases são aquecidas sob agitação a uma temperatura ligeiramente superior à temperatura de inversão de fase. As duas fases são então introduzidas em um misturador estático termostatado por meio de duas bombas, cujas vazões são reguladas de maneira a se obter a composição da emulsão, de acordo com a invenção. A emulsão inversa E/H é obtida durante a passagem das duas fases no misturador estático. A emulsão inversa é em seguida resfriada por passagem em linha através de um trocador térmico refrigerado conectado na saída do misturador estático. A emulsão E/H vai então se inverter através do trocador térmico refrigerado para dar lugar a uma emulsão H/E, que será recepcionada em um frasco ou reator e cujas características são idênticas àquelas da emulsão obtida por um processo em lotes.

Existem alternativas nos modos de realização do processo que acabam de ser descritos; quando o agonista do TLR4 tem um comportamento mais hidrófobo que hidrófilo, introduz-se-o na fase oleosa mais do que na fase aquosa. O agonista do TLR4 pode também ser introduzido, uma vez que a mistura da fase oleosa e a fase aquosa foi feita, ou quando a emulsão foi aquecida e ela se acha sob uma forma de emulsão E/H. A fase aquosa pode conter, além disso, um alditol. Enfim, no processo de preparo a emulsão segundo a invenção pode compreender vários ciclos de termo-inversão sucessivos.

A invenção tem também por objeto um processo de preparo de uma composição vacinal, no qual se mistura pelo menos um antígeno vacinal com uma emulsão H/E, contendo um agonista do TLR4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado, caracterizado pelo fato de a emul-

são H/E contendo o agonista do TLR4 ter sido preparada segundo um processo de inversão de fase, compreendendo uma etapa na qual se obtém uma emulsão sob a forma de emulsão inversa E/H por aumento da temperatura, e uma etapa na qual se transforma a emulsão E/H em emulsão H/E por redução da temperatura.

Um modo de realização simples consiste em misturar uma solução aquosa de um antígeno vacinal em uma emulsão termorreversível H/E obtida segundo um dos modos de realização que acabam de ser descritos. A composição vacinal obtida está sob a forma de uma emulsão H/E ou sob a forma de uma emulsão H/E termorreversível quando a quantidade de escaleno representa em peso pelo menos 5% do peso total da composição vacinal. De forma alternativa, pode-se misturar o antígeno à fase aquosa ou à fase oleosa, antes de preparar a emulsão.

Essa forma de proceder implica certamente que se trata de antígenos compatíveis com o processo de termo-inversão. As soluções de antígenos podem, além disso, conter sais minerais e um ou vários tampões, assim como qualquer outro composto habitualmente utilizado nas vacinas, tais como os estabilizantes, conservantes, ou eventualmente também outros adjuvantes. A título indicativo, a concentração em antígeno nas soluções aquosas está geralmente compreendida entre 1 µg/ml e 1 mg/ml.

O processo, de acordo com a invenção, pode também incluir uma etapa de liofilização. Prepara-se inicialmente uma emulsão concentrada líquida conforme se acabou de descrever, mas escolhendo-se, de preferência, como solução aquosa de água mais do que uma solução tamponada. Dilui-se em seguida essa emulsão em um substrato de liofilização, compreendendo um alditol, um açúcar e um alquil poli glicosídeo. Um substrato de liofilização habitualmente empregado compreende manitol, sacarose e dodecilmaltosídeo. A emulsão diluída é então repartida em amostras (por exemplo 0,5 ml) e submetida a um ciclo de liofilização que pode ser efetuado da seguinte maneira:

- carregamento das amostras +4°C;
- aproximadamente 2 horas de congelamento à temperatura

convencional de -45°C;

- 14 a 19 horas de dessicação primária a uma temperatura convencional de 0°C;

- 3 horas e 30 minutos de dessicação secundária à uma temperatura convencional de +25°C.

O liofilizado obtido é geralmente conservado a uma temperatura próxima de +4°C, antes de ser misturado a um ou vários antígenos vacinais. Uma composição vacinal, de acordo com a invenção pode ser assim preparada, retomando-se a emulsão liofilizada por meio de uma solução aquosa de antígenos, depois conservada no estado (isto é, no estado líquido) ou ser submetida a um novo ciclo de liofilização a fim de ser conservada sob a forma de liofilizado, caso a natureza dos antígenos o permita, de maneira alternativa é possível diluir diretamente a emulsão concentrada com uma solução aquosa compreendendo ao mesmo tempo os antígenos vacinais, assim como alditol, o açúcar e o alquil poliglicosídeo, e submeter em seguida a composição obtida à liofilização. Essa forma de proceder implica certamente que se trata de antígenos compatíveis com processo de liofilização.

Os exemplos que se seguem ilustram, de forma não limitativa diferentes modos de realização da invenção.

EXEMPLO I: Preparo de uma emulsão H/E termorreversível concentrada a 32,4% de escaleno (p/p).

Preparou-se uma solução de manitol a 18% em tampão fosfato (p/p) sob agitação mecânica a 40°C. A 0,454 g dessa solução, foram acrescentados 0,093 g de Eumulgin® B1 que se homogeneizou sob agitação mecânica a 40°C durante 5 minutos.

Preparou-se uma suspensão mãe a 1000 µg/ml do composto químico ER804057 em um tampão TRIS 50mM. São acrescentados 390 µl da suspensão mãe de ER804057 à mistura Eumulgin® B1 /manitol.

Em um outro recipiente foram misturados 0,073 g de Dehymuls®SMO e 0,484 g de escaleno que se homogeneizou por agitação mecânica durante 5 minutos a 30°C.

Incorporou-se em seguida sob agitação a aproximadamente

30°C o conteúdo da fase aquosa contendo ER804057 à fase oleosa contendo a mistura Dehymuls®SMO/escaleno.

Aqueceu-se a emulsão bruta obtida, sob agitação mecânica, até que a temperatura atingisse 60°C. Essa temperatura corresponde à temperatura de inversão de fase dessa composição. A emulsão está então sob uma forma de emulsão inversa (emulsão E/H).

Cessou-se em seguida o aquecimento, mas se manteve a agitação até que a temperatura voltasse à temperatura ambiente do laboratório (≈ 20°C). A emulsão se torna sob a forma de uma emulsão H/E.

Obteve-se assim uma emulsão H/E termorreversível, homogênea da qual mais de 90% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho ≤ 200nm e cuja composição em percentagem mássica é a seguinte:

32% de escaleno

6,2% de ceteareth-12 (Emulgin B1)

4,9% de monooleato de sorbitano (deshymuls SMO)

5,5% de manitol

0,026% de ER804057

A quantidade de escaleno nessa emulsão adjuvante representa portanto 32,4% do peso total da emulsão.

Em uma outra variante, realizou-se em um bécher, uma mistura contendo 50,5 g de um tampão fosfato, 6 g de manitol, 6,18 g de Eumulgin® B1 e 0,026 g de ER804057. Essa mistura foi mantida sob agitação a aproximadamente 40°C. Em um outro recipiente, preparou-se a fase oleosa, misturando-se sob agitação magnética 32,5 g de escaleno com 4,8 g de deshymuls SMO até a dissolução completa do SMO. Quando as fases homogêneas tiverem sido obtidas, a incorporação da fase aquosa à fase oleosa, as etapas de elevação em temperatura seguidas da etapa de decida em temperatura foram realizadas conforme anteriormente. Obteve-se uma emulsão H/E termorreversível, homogênea da qual mais de 90% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho ≤ 200 nm e cuja composição em percentagem mássica é a seguinte:

32% de escaleno

6,2% de ceteareth-12 (Emulgin B1)

4,8% de monooleato de sorbitano (deshymuls SMO)

6% de manitol

0,026% de ER804057

50,5% de PBS

Em uma outra variante do processo, utilizou-se, no lugar do tampão PBS, um tampão citrato pH 6,04 preparado, misturando-se 0,83mM de ácido cítrico monohidratado com 9,14 mM de citrato de sódio.

Essa emulsão concentrada em escaleno foi utilizada como emulsão-mãe, a partir da qual foram derivadas emulsões H/E diluídas termorreversíveis por diluição em um tampão fosfato, em um tampão Tris ou em um tampão citrato, já que foram esterilizadas por filtragem (vide exemplo II). Essas emulsões H/E diluídas termorreversíveis foram em seguida misturadas com um ou vários antígenos vacinais (vide exemplos III, IV e V).

EXEMPLO II: Estudo da estabilidade de uma emulsão H/E termorreversível diluída a 5% do escaleno (p/p)

Diluiu-se a emulsão concentrada do exemplo I em um tampão fosfato 9,6 mM (pH = 7,4) para se obter uma emulsão diluída, cuja quantidade de escaleno representa 5% do peso total da emulsão. A composição da emulsão diluída, denominada PIT-ER804057 a 5%, era a seguinte:

Escaleno: 50 mg/ml

Ceteareth-12 (Emulgin B1): 9,5 mg/ml

Monooleato de sorbitano (deshymuls SMO): 7,4 mg/ml

Manitol: 9 mg/ml

ER804057: 40 µg/ml

Avaliou-se a estabilidade dessa emulsão termorreversível, após uma conservação de 6 meses a uma temperatura de +4°C, controlando-se o teor em ER804057 na emulsão e a distribuição de tamanho da emulsão. Para dosar ER804057, procedeu-se a uma extração seletiva de ER804057 da emulsão seguida de uma análise por cromatografia líquida auto desempenho (HPLC) acoplada a um detector com barra de diodos (detecção UV). Deter-

minou-se o teor em ER804057 da emulsão a controlar de uma faixa de aferição, contendo entre 5 e 25 µg/ml de ER804057. Para prevenir as variações dos rendimentos de extração, introduziu-se em cada amostra a dosar (aí compreendido nas amostras da faixa de aferição) uma quantidade constante de um padrão interno, cuja estrutura química é muito próxima daquela ER804057. Trata-se da molécula química denominada ER803022.

A faixa de aferição foi realizada a partir de uma emulsão termorreversível que tem a mesma composição e preparada da mesma forma que a emulsão PIT-ER804057 a 5% (cf exemplo II) com exceção do fato que não continha ER804057 (emulsão PIT a 5%), à qual se acrescentou uma quantidade variável ER804057 retirada de uma solução estoque de ER804057 a 0,1 mg/ml de uma mistura contendo 2 volumes de clorofórmio para um volume de metanol (mistura CM 2:1), uma quantidade fixa de um padrão interno (10 µg), retirada de uma solução estoque de um padrão interno a 0,1 mg/ml de uma mistura CM 2:1, que se diluiu convenientemente na água para preparo injetável (EPPI).

A amostra de PIT-ER804057 a 5% a dosar foi preparada, retirando-se uma alíquota da emulsão PIT-ER804057 a 5% a qual se acrescentaram 10 µg de padrão interno e que se diluiu no EPPI.

A extração de ER804057 a partir das amostras da faixa de aferição ou das amostras de PIT-ER804057 a 5% foi realizada da seguinte forma: solubilizou-se a amostra por CM 2:1. O sistema bifásico obtido é composto de uma fase clorofórmica, contendo majoritariamente ER804057 e de uma fase aquosa contendo os outros compostos da emulsão. Recuperou-se a fase clorofórmica que se evaporou a quente sob uma corrente de nitrogênio. O extrato seco obtido foi retomado e solubilizado de novo na mistura CM 2:1. Depositou-se a mistura sobre um cartucho trocador de ânions previamente equilibrado na mistura CM 2:1. Ele reteve seletivamente o ER804057 e o padrão interno que foram carregados negativamente, enquanto que os outros componentes da emulsão, não carregados, foram eliminados. Purificou-se ER804057 e o padrão interno por meio de uma mistura contendo 2 volumes de clorofórmio, 3 volumes de metanol, para um volume NaCl a 1M.

O purificado foi em seguida secado a quente sob uma corrente de nitrogênio. Realizou-se em fim uma última extração em água e CM 2:1 para eliminar os sais residuais e recuperar ER804057, assim como o padrão interno na fase clorofórmica que foi finalmente evaporada a quente sob uma corrente de nitrogênio. O extrato seco oriundo de cada mostra foi conservado a -20°C, antes de ser analisado por HPLC.

O extrato seco de cada amostra foi retomado por 50 µl de CM 4:1, depois diluído em ½ no metanol, depois em 1/10 na mistura acetonitrila 30% - EPPI. Foram injetados 20 µl da diluição em um aparelho de cromatografia líquida (HPLC Merck Hitachi, Lachrom série 7000), compreendendo uma coluna Waters Xterra® RP8 previamente equilibrada em uma fase móvel constituída de uma mistura a 80% da fase A (água PPI/etanol 50/50 contendo 2% de H_3PO_4) e 20% da fase B (etanol contendo 2% de H_3PO_4). Purificou-se ER804057 e o padrão interno com o auxílio de um gradiente de etanol a 2% de de H_3PO_4. Na saída de HPLC, o purificado chegou ao nível do detector com barra de diodo e as moléculas foram detectadas no comprimento de onda de 215 nm. No cromatograma obtido, as superfícies dos 2 picos (análise e referente) foram integradas e correlacionadas: para corrigir as variações ligadas ao preparo da amostra, a curva de aferição foi estabelecida entre a proporção das superfícies dos picos correspondentes ao par ER804057 (molécula quantificada) e ER803022 (padrão interno) e a proporção das concentrações correspondentes a ER804057 e ER803022 (padrão interno). Uma vez a curva estabelecida, determinou-se a quantidade de ER804057 presente na emulsão PIT-ER804057 a 5% por medida da proporção das superfícies dos picos ER804057/padrão interno e comparação com a curva de aferição.

	1 mês a +4°C	3 meses a +4°C	6 meses a +4°C
ER 804057 (concentração teórica 40 µg/ml)	38 µg/ml	37 µg/ml	42 µg/ml

Os resultados mencionados na tabela acima mostram que ER804057 conserva sua integridade estrutural e que sua concentração na

emulsão PIT-ER804057 a 5% não variou sensivelmente, após ter sido conservada a emulsão durante 6 meses a +4°C.

As análises de distribuição de tamanho foram realizadas após diluição da emulsão a 1/100 com o Mastersizer 2000, utilizando-se os seguintes parâmetros: IR partícula = 1.495; IR meio = 1.332; o valor de absorção = 0; limite de obscuridade baia = 4%; limite de obscuridade alta = 7%; modelo de análise "general purpose". Para cada análise de distribuição de tamanho, foram avaliados os seguintes parâmetros: d10, d50 e d90 que representam respectivamente os valores dos diâmetros médios de partícula abaixo dos quais se acham respectivamente 10%, 50%, e 90% da população volúmica das gotículas de óleo.

	T = 0	T = 3 meses	T = 6 meses
d 10	71 nm	70 nm	70 nm
d 50	103 nm	100 nm	101 nm
d 90	155 nm	152 nm	153 nm

Esses resultados mostram que a distribuição de tamanho da emulsão é estável a +4°C em um período de tempo de pelo menos 6 meses.

Exemplo III: Composição vacinal contra as infecções de citomegalovírus preparada a partir de uma emulsão H/E, de acordo com a invenção.

Foram preparadas composição vacinais, compreendendo a título de antígeno vacinal uma proteína recombinante que deriva da glicoproteína gB do CMV. Essa proteína recombinante foi produzida por uma linhagem CHO recombinante transfectada por um plasmídeo denominado p-PRgB27clv4 que contém um gene modificado da gB. Para facilitar a produção dessa proteína recombinante pela linhagem CHO o gene da gB cuja seqüência é descrita em US 5 834 307 foi modificada previamente, suprimindo-se a parte do gene que codifica para a região transmembranária da proteína gB correspondente à seqüência de ácidos aminados compreendida entre a Valina 677 e a Arginina 752 e introduzindo 3 mutações pontuais no nível do local de clivagem. A proteína produzida pela linhagem CHO, denominada gBdTM corresponde a uma proteína gB truncada desprovida de local de clivagem e de região transmembranária.

A construção do plasmídeo pPRgB27clv4 e da produção da proteína gB truncada (gBdTM) pela linhagem CHO recombinante são descritas em US 6.100.064. A proteína gBdTM produzida no meio de cultura é em seguida purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se o anticorpo monoclonal 15D8 descrito por Rasmussen L et al. (J. Virol. (1985) 55: 274-280). A proteína purificada foi armazenada sob a forma de uma solução estoque a 0,975 mg/ml de gBdTM em tampão fosfato.

Foram preparadas composições imunoestimulantes de gBdTM formuladas com diferentes composições de emulsões H/E ou com uma suspensão de hidróxido de alumínio.

A composição nº 1 continha 2 µg de gBdTM em tampão citrato com pH 6 sob 50 µl (grupo gB).

A composição nº 2 continha 2 µg de gBdTM, 1,075 mg de escaleno 0,133 mg de Trioleato de sorbitano (Montane®VG 85) e 0,125 mg de Tween®80 em tampão citrato com pH 6 sob 50 µl (grupo gB + emulsão H/E). Essa composição foi obtida, misturando-se volume a volume uma solução de gB com uma emulsão H/E da técnica anterior que se obteve por microfluidização.

A composição nº 3 continha 2 µg de gBdTM e 60 µg de hidróxido de alumínio em tampão fosfato sob 50 µl (grupo gB + AL).

A composição nº 4 continha 2 µg de gB, 1,25 mg de escaleno, 0,187 mg de Dehymuls®SMO, 0,237 mg de Eumulgin®B1 e 0,225 mg de manitol em tampão PBS com pH 7,4 sob 50 µl. Essa composição foi obtida, misturando-se volume a volume uma solução de gB com uma emulsão H/E termorreversível a 5% de escaleno (grupo gB + PIT). A emulsão H/E termorreversível servindo ao preparo dessa composição foi obtida por diluição de uma emulsão H/E termorreversível concentrada a 32,4% de escaleno (p/p) que foi preparada, utilizando-se o mesmo processo que aquele do exemplo 1 com exceção do fato de a fase aquosa não conter ER804057.

A composição nº 5 continha 2 µg de gBdTM, 1 µg de ER804057, em um tampão citrato pH 6 sob 50 µl (grupo gB + ER804057).

A composição nº 6 continha 2 µg de gBdTM, 1,25 mg de escale-

no, 0,145 mg de Montane®VG 85, 0,147 mg de Tween®80, 1 µg de ER804057 em tampão citrato com pH 6 sob 50 µl (grupo gB + emulsão H/E + ER804057). Essa composição foi obtida, misturando-se volume a volume uma solução de gB com uma emulsão H/E da técnica anterior obtida por microfluidização à qual se acrescentou ER804057.

A composição nº 7 continha 2 µg de gBdTM, 1 µg de ER804057, 60 µg de hidróxido de alumínio em um tampão fosfato sob 50 µl (grupo gB + Al + ER804057).

A composição nº 8 continha 2 µg de gB, 1,25 mg de escaleno, 0,189 mg de DeHymuls®SMO, 0,240 mg de Eumulgin®B1 e 0,211 mg de manitol e 1 µg de ER804057 em tampão PBS com pH 7,4 sob 50 µl. Essa composição foi obtida, misturando-se volume a volume uma solução de gB com uma emulsão H/E termorreversível PIT-ER804057 a 5% de escaleno obtida por diluição da emulsão-mãe do exemplo 1 (grupo gB + PIT/ER804057).

Foram imunizados oito grupos de 10 ratos não co-sangüíneos OF1 fêmeas com oito semanas de idade, por via subcutânea, nos dias D0 e D21, com as composições indicadas acima (cada grupo de rato recebeu duas injeções da mesma composição).

Foram retiradas no D20 e D34 no sinus retroorbital amostras sangüíneas que foram utilizadas para determinar as concentrações em anticorpos em IgG1 e IgG2a específicos de gBdTM. Essas dosagens foram realizadas por ELISA sensibilizando durante uma noite a +4°C os poços de microplacas de 96 poços Dynex com 100 ng (100 µl) de gBdTM em solução de tampão carbonato 0,05 M com pH 9,6.

Para a determinação dos anticorpos neutralizantes, utilizou-se o protocolo descrito por GoncZol E. et al. em J. Virological Methods, 14: 37-41 (1986).

Foram utilizadas células MRC5 cultivadas em um meio MEM contendo 10% de soro de bezerro fetal, entre as passagens 28 a 38, para as análises de microneutralização. A cepa CMV Towne (Wistar Institute, Philadelphie, US) purificada e propagada sobre células MRC5, tendo um título de

aproximadamente 2 x 10^6 PFU/ml, serviu de cepa de infecção. Utilizou-se também uma fonte de complemento obtido a partir dos soros de ratos do Institut Virion Ltd (Suisse). Uma mistura de soros humanos tendo um título em 1:128 foi utilizado como controle positivo, e foi incluído em cada teste de microneutralização.

Foram inativados os soros a serem testados por aquecimento a 56°C durante 30 minutos. Foram acrescentados, a uma alíquota de 15 µl de cada soro inativado, 105 µl de meio de cultura (MEM + 10% de soro de bezerro fetal) em placas de cultura de 96 poços com fundo chato (diluição a 1/8). Depois foram feitas diluições sucessivas de razão 2. Os soros de controle foram testados da mesma forma. 60 µl de suspensão de vírus contendo 3000 PFU e 5 µl de complemento de rato foram acrescentados em cada poço. Após uma incubação de uma hora a 37°C sob CO_2, foram acrescentadas 3-4 x 10^4 células MRC5 em um volume de 150 µl de meio de cultura em cada um dos poços. As microculturas foram cultivadas durante 4 dias. A atividade citopática do vírus era de 100% no poço que não continha soros. Ao contrário, observou-se uma inibição da atividade citopática do vírus nos poços que continham soros neutralizantes. O título em anticorpos neutralizantes de um soro corresponde ao contrário de sua diluição que inibe em mais de 90% a atividade citopática do vírus.

Os resultados que foram obtidos para cada grupo de ratos foram representados nas tabelas a seguir:

Grupo de Ratos	IgG1 no D20	IgG2a no D20	IgG1 no D34	IgG2a no D34	Razão no D34 IgG1/Ig G2a
Grupo gB	2,47*	2,09	3,80	2,94	137
Grupo gB+emulsão H/E	4,06	2,98	5,49	4,18	143
Grupo gB+AL	3,06	1,85	4,90	3,33	357
Grupo gB+PIT	4,61	3,91	5,61	4,85	14
Grupo gB+ER804057	3,09	3,12	4,43	4,16	6
Grupo gB+PIT/ER804057	4,78	4,58	5,83	5,74	3

* título médio das diluições de soros (expressas em Log10)

Esses resultados mostram que a emulsão PIT/ER804057 tem um poder imunoestimulante mais importante do que os outros adjuvantes, já que as taxas de IgG1 e de IgG2a específicas obtidas no grupo de ratos "gB + PIT-ER804057" são significativamente mais elevadas do que aquelas obtidas nos grupos de ratos "gB + AL" ou "gB + emulsão H/E". O poder imunoestimulante da emulsão, de acordo com a invenção, não é devido unicamente à emulsão termorreversível (emulsão PIT) ou ao agonista do TLA4, mas à combinação dos dois produtos. As taxas de IgG1 e IgG2a específicas observadas nos grupos "gB + PIT" e "gB + ER804057" são com efeito significativamente menores que aquelas que são observadas no grupo "gB + PIT-ER804057".

Tabela recaptulativa da produção de anticorpos neutralizantes.

Grupo de Ratos	Título médio em anticorpos neutralizantes
Grupo gB	16**
Grupo gB+emulsão H/E	32
Grupo gB+AL	32
Grupo gB+PIT	48
Grupo gB+ER804057	16
Grupo gB+emulsãoH/E+ER804057	32
Grupo gB+AL+ER804057	32
Grupo gB+PIT/ER804057	128

**: inverso da média das diluições de soro, inibindo a mais de 90% o efeito citopático do vírus.

Esses resultados mostram que a composição imunoestimulante resultante da mistura de um antígeno de envoltório do CMV com uma emulsão H/E termorreversível contendo um agonista do TLR4 tal como descrita na invenção é aquela que induz a mais forte taxa de anticorpos neutralizantes no rato. A emulsão PIT/ER804057 tem maior capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizante que as outras composições adjuvantes testadas. A emulsão PIT/ER804057 se mostra de melhor desempenho (por

sua capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes) do que uma emulsão H/E da técnica anterior à base de escaleno, contendo os mesmos componentes que a emulsão MF59, considerada até o presente como o adjuvante de referência para a adjuvantação das proteínas do CMV. Constata-se também que o acréscimo de um agonista do TLR4 à emulsão H/E da técnica anterior não aumenta o desempenho dessa emulsão (o título em anticorpos neutralizantes permanece o mesmo), enquanto que o desempenho de uma emulsão termorreversível (PIT) se eleva, quando contém um agonista do TLR4 (o título em anticorpos neutralizantes aumenta).

EXEMPLO IV: Composição vacinal contra a gripe preparada a partir de uma emulsão H/E, de acordo com a invenção.

Foram preparadas composições imunoestimulantes a partir de uma composição vacinal antigripal compreendendo as 3 cepas vacinais da campanha 2004 (a cepa A/New Caledonia (H1N1), a cepa A/Wyoming (H3N2), e a cepa B/Jiangsu que se formula com diferentes composições de emulsões H/E ou com uma suspensão de hidróxido de alumínio.

A composição nº 1 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais em tampão PBS sob 30 µl. (grupo 0,3 µg HA).

A composição nº 2 continha 6,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais em tampão PBS sob 30 µl. (grupo 6,3 µg HA).

A composição nº 3 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais 0,65 mg de escaleno, 0,075 mg de trioleato de sorbitano (Span®85) e 0,075 mg de Tween®80 em tampão PBS sob 30 µl. (grupo 0,3 µg HA + emulsão H/E). Essa composição foi obtida, misturando-se a composição vacinal antigripal com uma emulsão H/E da técnica anterior obtida por microfluidização.

A composição nº 4 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais 0,75 mg de escaleno, 0,11 mg de Dehymuls®SMO, 0,143 mg de Eumulgin®B1 e 0,138 mg de manitol e 0,6 µg de ER804057 em tampão com pH 7,4 sob 30 µl (grupo 0,3 µg HA + PIT/ER804057). Essa composição foi obtida, misturando-se a composição vacinal antigripal com uma emulsão termoinversível, tal como descrita no

exemplo I e que se diluiu previamente em tampão PBS.

Foram imunizados 4 grupos de 8 ratos BALB/c fêmeas, com 8 semanas de idade, nos quais foi administrada no D0, por via intradérmica (face interna da orelha) uma dose de 30 µl de uma das composições imunoestimulantes indicadas acima.

Foram retiradas no D21 no sinus retroorbital amostras sangüíneas utilizadas para determinar as taxas de anticorpos neutralizantes específicos de cada cepa viral (anticorpos inibindo a hemaglutinação (IHA)) obtidas em cada grupo de ratos imunizados. O princípio dessa dosagem é baseado na capacidade dos vírus gripais de aglutinarem os glóbulos vermelhos, enquanto que um soro que contém anticorpos neutralizantes dirigidos especificamente contra a HA do vírus inibe a atividade "hemaglutinante" do vírus. Foram eliminados, em uma primeira etapa, os inibidores não específicos contidos nos soros, tratando-os com uma enzima RDE (Receptor Destroying enzyme) fornecida por sigma, depois colocando-os em contato com uma solução de glóbulos vermelhos de frango a 10%. Obteve-se um resíduo livre de inibidores não específicos e correspondia a um soro diluído em 1/10. Foram feitas em seguida diluições sucessivas de razão dois do resíduo em tampão fosfato, depois foram depositados 50 µl de cada uma das diluições nos poços de uma microplaca em V. Foram acrescentados em cada poço 50 µl de uma suspensão viral proveniente de um líquido alantóico clarificado e titulando 4 unidades hemaglutinantes (4HAU). Deixou-se incubar durante uma hora à temperatura de laboratório, antes de serem acrescentados 50 µl de uma solução de glóbulos vermelhos de frango ou de perua em cada um dos poços. Deixou-se repousar durante uma hora a +4°C, antes de efetuar a leitura do teste. A presença de uma inibição de hemaglutinação se traduzia pela presença de um ponto vermelho no fundo do micropoço, enquanto que a presença de uma hemaglutinação se traduzia pela presença de um halo rosado no micropoço. O título em anticorpos IHA está representado pelo inverso da última diluição na qual não se observou hemaglutinação no micropoço.

Os resultados que foram obtidos estão agrupados na tabela a-

baixo:

Grupo de ratos	IHA contra A /Nova caledonia (H1N1)	IHA contra A/Wyoming (H3N2)	IHA contra B/Jiangsu
0,3 µg HÁ	26***	174	8
6,3 µg HÁ	247	907	73
0,3 µg HÁ+emulsão H/E	135	987	57
0,3 µg HÁ+PIT+ER804057	290	1522	98

***média dos títulos IHA obtidos sobre os 8 soros de cada grupo de ratos.

Esses resultados mostram que a composição vacinal obtida, misturando-se uma vacina antigripal com uma emulsão H/E termorreversível contendo um agonista do TLR4 é aquela que induz a mais forte taxa de anticorpos neutralizantes no rato, independentemente da cepa vacinal testada comparativamente nas outras composições vacinais. A emulsão PIT/ER804057 se mostrou mesmo ligeiramente de melhor desempenho (por sua capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes) do que uma emulsão H/E da técnica anterior, cuja composição é similar a MF59. O interesse por essa emulsão reside também no fato de se poder reduzir muito as quantidades de antígeno já que os resultados obtidos com uma dose de 0,3 µg de hemaglutinina misturada com uma emulsão PIT/ER804057 são melhores do que aquelas obtidas com uma dose de 20 vezes mais forte de hemaglutinina.

Em um outro teste, seguiu-se a evolução da taxa dos anticorpos que inibem a hemaglutinação no decorrer do tempo em grupos de ratos imunizados com diferentes composições imunoestimulantes preparadas a partir da mesma vacina da campanha 2004.

A composição nº 1 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais em tampão PBS sob 30 µl. (grupo 0,3 µg HA).

A composição nº 2 continha 6,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais em tampão PBS sob 30 µl. (grupo 6,3 µg HA).

A composição nº 3 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de

cada uma das cepas virais 0,6 mg de ER804057 em tampão aquoso sob 30 µl. (grupo 0,3 µg HA + ER804057).

A composição nº 4 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais 0,30 mg de escaleno, 0,044 mg de Dehymuls®SMO, 0,057 mg de Eumulgin®B1, 0,055 mg de manitol em tampão PBS com pH 7,4 sob 30 µl (grupo 0,3 µg HA + PIT a 1%).

A composição nº 5 continha 0,3 µg de hemaglutinina (HA) de cada uma das cepas virais 0,30 mg de escaleno, 0,044 mg de Dehymuls®SMO, 0,057 mg de Eumulgin®B1, 0,055 mg de manitol e 0,6 µg de ER804057 em tampão PBS com pH 7,4 sob 30 µl (grupo 0,3 µg HA + PIT a 1%/ER804057).

Foram imunizados 5 grupos de 5 ratos BALB/c fêmeas, com 8 semanas de idade, nos quais foi administrada no D0, por via intradérmica (face interna da orelha) uma dose de 30 µl de uma das composições imunoestimulantes indicadas acima.

Foram retiradas no sinus retroorbital amostras sangüíneas no D23, D51 e D79 que foram utilizadas para determinar as taxas de anticorpos neutralizantes específicas da cepa H1N1 (anticorpos inibindo a hemaglutinação (IHA)) obtidas em cada grupo de ratos imunizados. Os resultados que foram obtidos foram agrupados na tabela abaixo:

Grupo de ratos	D23	D51	D79
Grupo 0,3 µgHA	35***	53	80
Grupo 6,3 µgHA	235	243	279
Grupo 0,3 µgHA+ER804057	65	211	243
Grupo 0,3 µgHA+PIT com 1%	226	557	735
Grupo 0,3 µgHA+PIT COM 1%ER804057	226	970	844

*** média dos títulos IHA obtidos sobre os 5 soros de cada grupo de ratos.

O desempenho da emulsão PIT-ER804057 por sua capacidade de produzir anticorpos que inibem a hemaglutinação do vírus gripal (anticorpos protetores) é o resultado da ação combinada da emulsão e do agonista do TLR4; os desempenhos da emulsão PIT sozinha ou de ER804057 sozi-

nha são menores.

Exemplo V: Composição da vacina contra a gripe preparada a partir de uma emulsão, de acordo com a invenção, testada em uma população de ratos jovens ou com idades já sensibilizados ao vírus da gripe.

Testou-se a eficácia da emulsão da invenção no caso de uma vacina contra a gripe que seria administrada em pessoas já sensibilizadas no vírus da gripe, seja por que essas pessoas estiveram em contato com o vírus gripal, seja por que foram vacinadas com uma vacina antigripal.

Para fazer esse tipo de avaliação, pode-se, a partir de Potter et al (Vaccine, 2003, 21: 940-945), utilizar como modelo animal não inocente face à gripe dos ratos previamente imunizados por via intramuscular (IM) com uma vacina trivalente.

5 grupos de 10 ratos C57B1/6 de 8-10 semanas receberam por via IM uma dose de uma vacina trivalente de 1,5 µg de HA de cada uma das cepas A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/New York/55/04 (H3N2) e B/Malaysia/2506/04.

No 28º dia, com exceção de um grupo (grupo PBS) que recebeu uma injeção de um tampão PBS, todos os outros grupos de ratos receberam por via intradérmica, sob um volume de 30 µl, diferentes composições vacinais contendo uma vacina trivalente diferente daquele que serviu à primeira imunização (A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wellington/01/04 (H3N2) e B/Jiangsu/10/03).

Um grupo recebeu uma composição contendo 0,3 µg de HA de cada uma das cepas em tampão PBS (grupo 0,3 µg HA).

Um outro grupo recebeu uma composição contendo 6,3 µg de HÁ de cada uma das cepas em tampão PBS (grupo 6,3 µgHA).

Um outro grupo recebeu uma composição contendo 0,3 µg de HA de cada uma das cepas em tampão PBS em uma emulsão H/E a 1% de escaleno contendo 0,3 mg de escaleno, 0,044 mg de Dehymuls®SMO, 0,057 mg de Eumulgin®B1 e 0,055 mg de manitol em tampão PBS. Essa composição que continham 1% de escaleno foi preparada, misturando-se a vacina antigripal com uma emulsão H/E obtida por diluição de uma solução mãe

termorreversível concentrada preparada segundo o mesmo processo que aquele descrito no exemplo 1 com exceção do fato de a fase aquosa não conter ER804057 (grupo 0,3 µg HA + PIT 1%).

Enfim, o último grupo recebeu uma composição contendo 0,3 µg de HA de cada uma das cepas em tampão PBS em uma emulsão H/E a 1% de escaleno contendo 0,3 mg de escaleno, 0,044 mg de Dehymuls®SMO, 0,057 mg de Eumulgin® B1 e 0,055 mg de manitol em tampão PBS e 0,6 µg de ER804057. Essa composição que continha 1% de escaleno e 0,6 µg de ER804057 foi preparada, misturando-se a vacina antigripal com uma emulsão H/E obtida por diluição de uma solução mãe termorreversível concentrada preparada segundo mesmo processo que aquele descrito no exemplo 1 (grupo 0,3 µg HA + PIT 1%/ER804057).

No D50, os ratos foram mortos para recolher uma amostra sangüínea e realizar uma retirada de rato.

Sobre cada retirada de sangue, realizou-se uma dosagem de IHA face às cepas A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wellington/01/04 (H3N2) e B/Jiangsu/10/03. Os resultados que foram obtidos que foram obtidos são agrupados na tabela abaixo:

Grupo de Ratos	IHA contra A/New Caledonia (H1N2)	IHA contra A/Wellington (H3N2)	IHA contra B/Jiangsu
Grupo PBS	52*	48	13
Grupo 0,3 µgHA	95	226	57
Grupo 6,3 µgHA	100	640	226
Grupo 0,3 µgHA+PIT 1	431	640	290
Grupo 0,3 µgHA+PIT 1%%ER804057	698	2348	640

* representa o valor médio dos títulos IHA obtidos sobre os 10 soros de cada grupo de ratos.

Esses resultados mostram que a taxa de IHA média no grupo de ratos imunizados com a composição vacinal "HA + PIT 1%ER804057" ligeiramente dosada em escaleno (1%) e em agonista do TLR4 (ela contém 0,6

µg de ER804057), é significativamente mais elevada que os títulos obtidos após imunização dos ratos com a vacina antigripal não adjuvada com dose equivalente em HA (grupo 0,3 µg HA) ou com dose 20 vezes mais forte HA (grupo 6,3 µg HA). Esses resultados mostram o interesse da emulsão PIT 1% ER804057, mesmo no meio de uma população sensibilizada pelo vírus da gripe, já que se pode reduzir de um fator 20 a quantidade de antígeno gripal de cada cepa, obtendo taxas de anticorpos protetores mais importante face às três cepas de vírus.

Sobre cada retirada de baço, analisou-se a resposta imune celular específica, aplicando-se a técnica ELISPOT e a técnica CBA (Cytometric Bead Array) para a dosagem do interferon γ e do IL5 produzidos pelos esplenócitos após estímulo específico.

No que se refere a técnica ELISPOT, foram depositados 2×10^5 esplenócitos sob 200 µl de um meio de cultura (RPMI 1640, 10% de soro de bezerro fetal, glutamina 2mM, β mercaptoetanol 50mM) nos poços de micro placas de nitrocelulose previamente sensibilizadas com um anticorpo de rato anti INFγ de rato (Pharmingen ref: 551216) ou com um anticorpo de rato anti IL5 de rato (Pharmingen ref: 554393). Os esplenócitos foram incubados durante uma noite a 37°C em presença de IL-2 murino (Bohringer) (10U/ml) e de diferentes antígenos gripais a uma concentração de 1 µg/mg. Para a análise da resposta celular CD8+, utilizou-se um peptídeo NP da gripe (TYQRTRALV) reconhecido no contexto H-2kd. Para a análise da resposta celular CD4+ o antígeno gripal foi representado pela vacina trivalente inativado e esplitado contendo as cepas A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wellington/01/04 (H3N2) e B/Jiangsu/10/03. As microplacas foram em seguida lavadas e os esplenócitos que foram secretados do IFNγ ou do IL5 foram detectados por meio de um anticorpo de rato biotinilado anti INFγ de rato (Pharmingen ref: 554410) ou de um anticorpo de rato biotinilado anti IL5 de rato referência (Pharmingen ref: 554393) e por meio da estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology-ref 7100-05). Após revelação com o auxílio do 3 Amino-9 etil-carbazol, os spots correspondentes aos esplenócitos que secretam o INFγ ou o IL5 foram contabilizados por meio de

uma leitora ELISPOT automática. Os resultados foram expressos em número de células que secretam o INFγ ou o IL5 para 10^6 esplenócitos. O limite positivo de detecção é de 20 spots para 10^6 esplenócitos.

No que se refere à técnica CBA, depositaram no poço de microplacas de cultura 4 x 10^5 esplenócitos sob 200 µl de um meio de cultura (RPMI 1640, 10% de soro de bezerro fetal, glutamina 2mM, β Mercaptoetanol 50mM). Os esplenócitos foram incubados durante 5 dias a 37°C em presença da vacina trivalente (a 1 µg/ml) ou na ausência estimulante para avaliar a produção não específica de citoquina (testemunha meio). O conteúdo de INFγ ou IL5 do que flutua de cultura foi em seguida dosado por citometria de fluxo, utilizando o Kit CBA mouse Th1/Th2 (Becton Dickinson - ref: 551287). O limite positivo de detecção era de 2,5 pg/ml para o INFγ e de 5 pg/ml para o IL5. Para cada retirada de baço, a concentração específica em INFγ ou em IL5 foi calculada, subtraindo do resultado a taxa de INFγ ou de IL5 que é produzido de forma não específica.

Os resultados das análises da resposta celular estão agrupados na tabela abaixo:

Grupo de ratos	Número de esplenócitos, secretando o IFNγ	Número esplenócitos secretando IL5	Taxa de IFNγ no que flutua de cultura	Taxa de IL5 no que flutua de cultura	Razão IFNγ/IL5
PBS	19*	23*	148**	355**	2,1***
0,3 µgHA	17	66	295	400	1,3
6,3 µgHA	30	13	780	523	
0,3 µgHA+PIT 1%	31	74	691	1301	0,6
0,3 µgHA+PIT 1%ER804057	66	22	1499	640	4,1

* representa o valor médio de esplenócitos, secretando IL5 ou IFNγ por 10^6 esplenócitos após estímulo com a vacina trivalente. O valor médio é calculado com base nos resultados ELISPOT obtidos sobre as 10 retiradas de baço/grupo de ratos.

** representa a taxa média (pg/ml) em IL5 ou em IFNγ calculada com base nos resultados obtidos sobre as 10 retiradas de baço/grupo de

ratos aplicando-se a técnica CBA.

*** a proporção representa a média aritmética das proporções IFNγ/IL5 em cada grupo. Determinou-se a proporção IFNγ/IL5 para cada retirada com a base nos valores das concentrações específicas em IFNγ e em IL5, obtidas segundo o método CBA, após colocação em cultura dos esplenócitos, depois se calculou a média aritmética das 10 proporções obtidas para cada grupo de ratos.

Esses resultados mostram que a emulsão PIT 1%/ER804057 orienta muito a resposta celular CD4+ para a produção de IFNγ consecutivamente a um novo estímulo específico das células com a vacina da gripe. É no grupo de ratos que recebeu essa emulsão que se observa a resposta Th1 a mais pronunciada (proporção IFNγ/IL5 a mais elevada). A resposta Th1 é com efeito mais forte do que aquela que é observada no gruo de ratos que recebeu uma vacina gripal 20 vezes mais dosada (grupo 6,3 µg). Essa emulsão é, portanto, recomendada nas populações de indivíduos que têm uma resposta Th1 deficitária consecutivamente a uma vacinação antigripal, notadamente nas pessoas idosas.

Reproduziu-se o mesmo protocolo experimental, utilizando-se ratos C57B16 machos, com 17 meses de idade, depois se mediram as taxas de IHA dirigidos contra A/Wellington (H3N2). Os resultados que foram obtidos estão agrupados na tabela abaixo:

Grupo de ratos	IHA contra A/Wellington (H3N2)
Grupo 6,3 µg HÁ	104*
Grupo 0,3 µg HÁ + PIT 1%	247
Grupo 0,3 µg HA+PIT 1%ER 804057	476

* representa o valor médio dos títulos IHA obtidos sobre os 10 soros de cada grupo de ratos.

Esses resultados mostram o interesse por uma composição vacinal que foi obtida, misturando-se uma vacina antigripal e uma emulsão H/E ligeiramente dosada com escaleno (1%) e com agonista do TLR4 (ER804057 a 0,6 µg) para vacinar uma população de indivíduos idosos já

sensibilizados com o vírus da gripe, já que se pode reduzir de um fator 20 a quantidade de antígeno gripal da cada cepa, tendo taxas de anticorpos protetores mais importantes face às três cepas de vírus.

REIVINDICAÇÕES

1. Emulsão em óleo em água (H/E) compreendendo:

I) um agonista do TLR4, denominado TLA4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado;

II) escaleno;

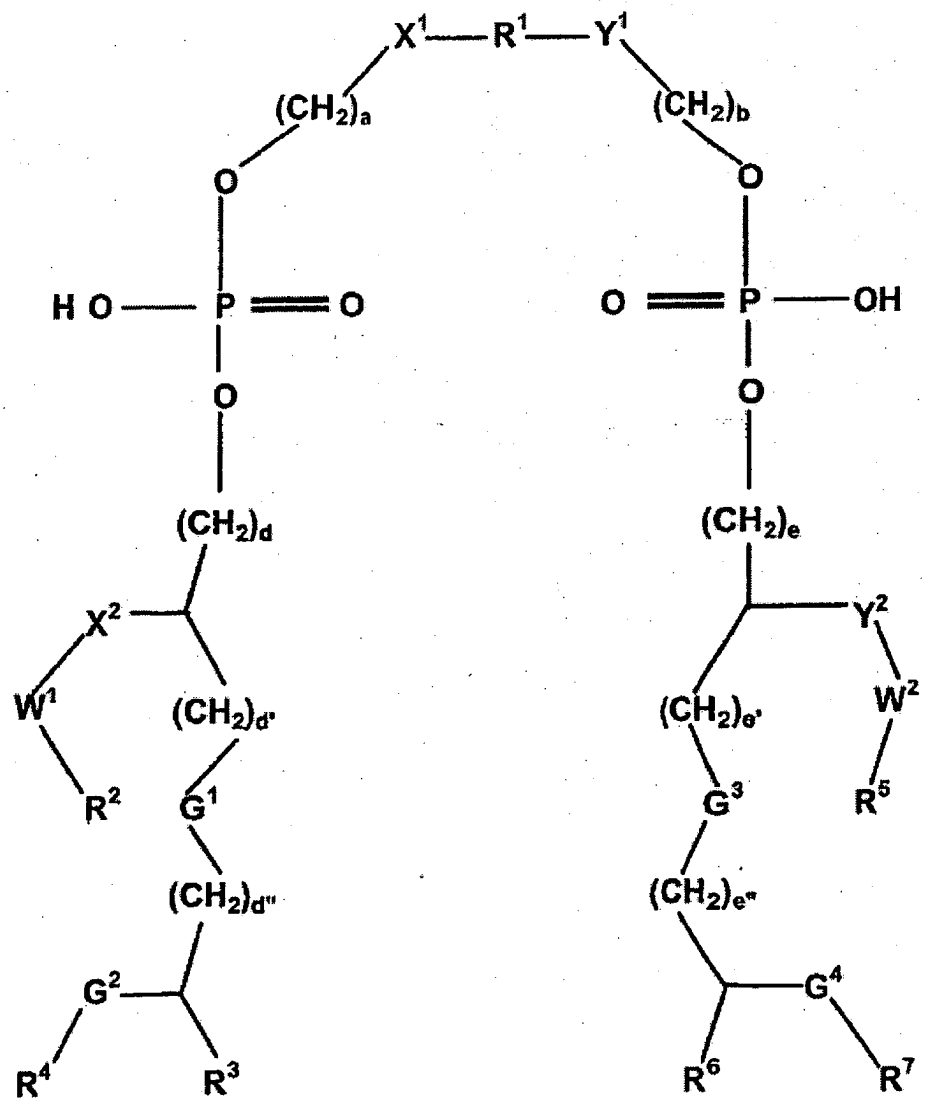
III) um solvente aquoso;

IV) um tensoativo hidrófilo não-iônico que é um polioxietileno alquil éter;

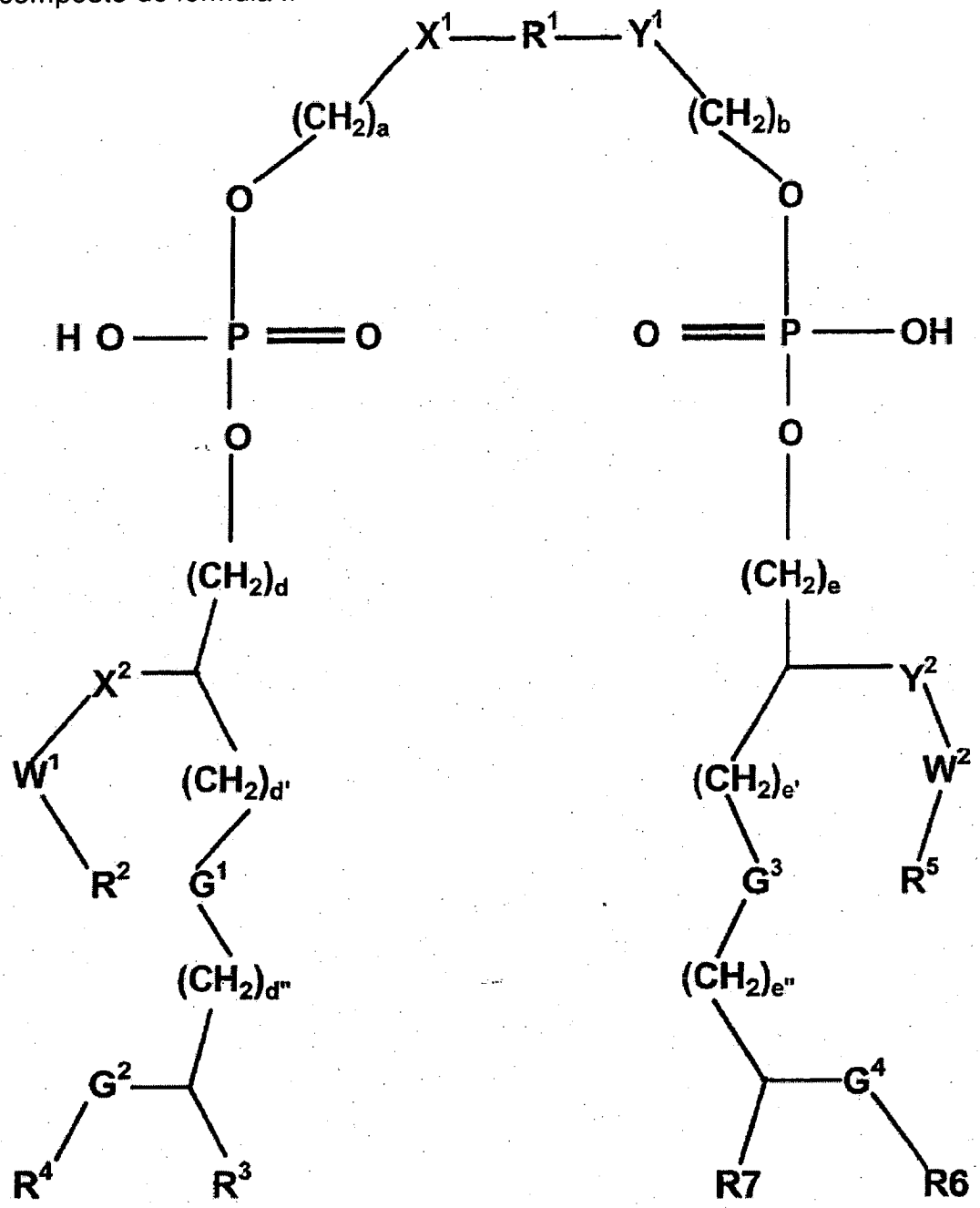
V) um tensoativo hidrófobo não-iônico e que é termorreversível.

2. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, na qual TLA4 é um composto químico de fórmula, I, II, III ou IV:

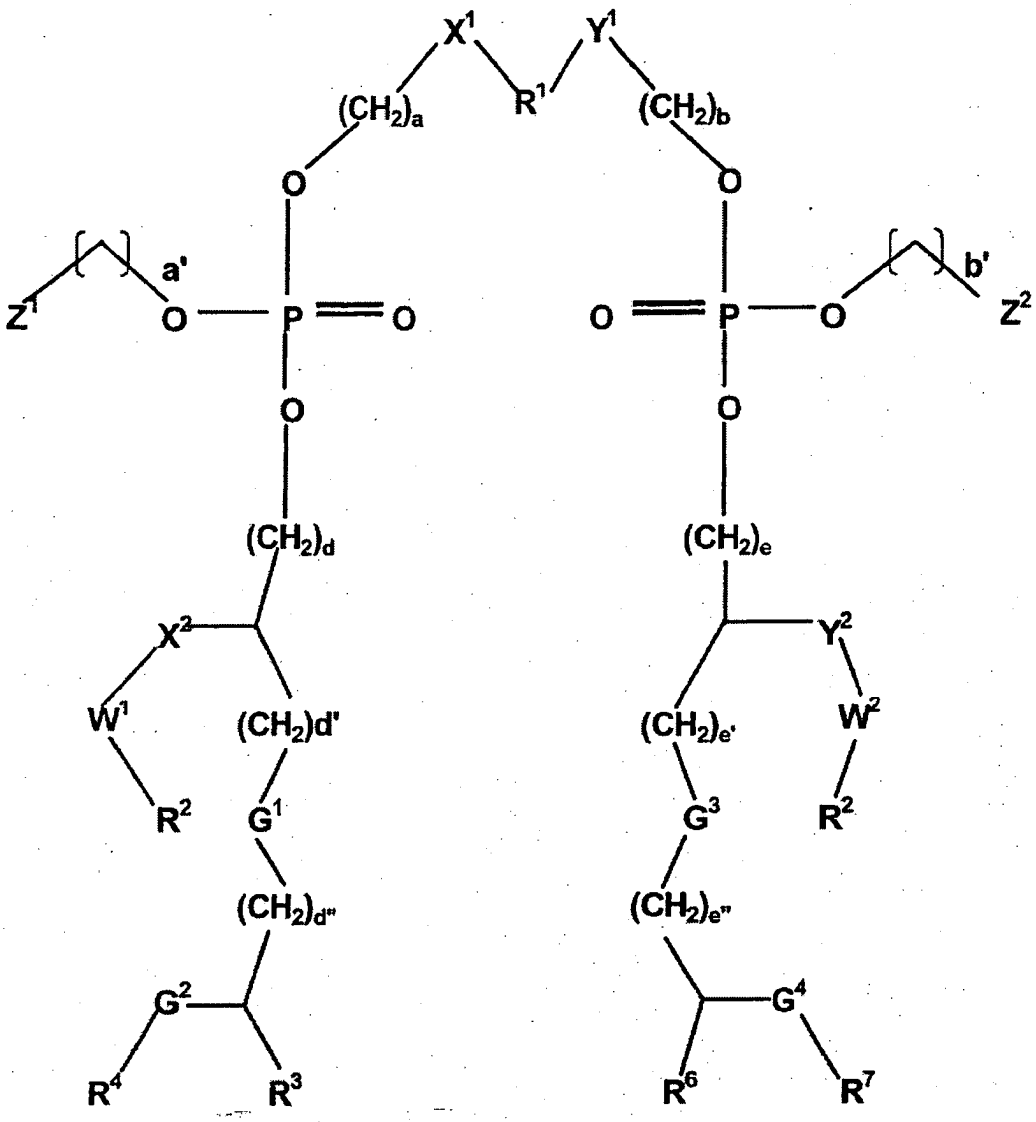
composto de fórmula I



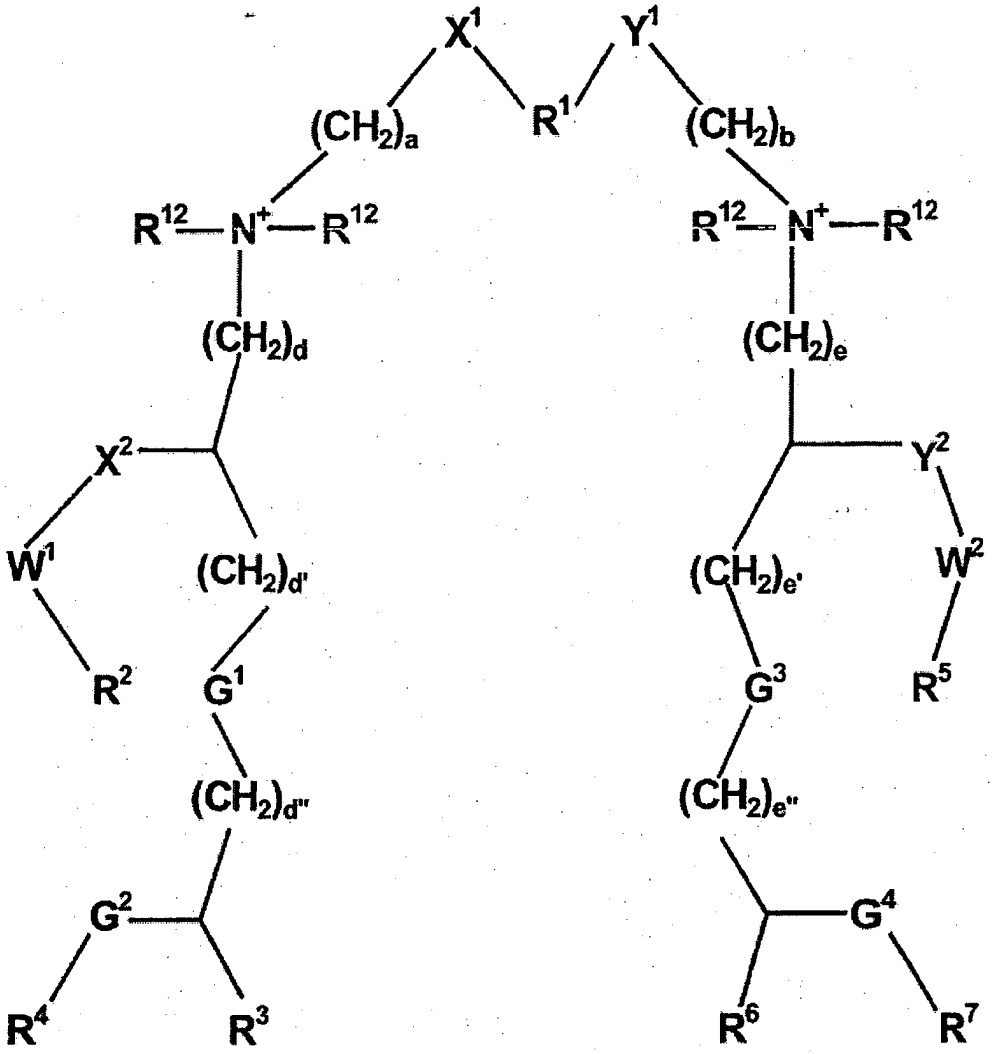
composto de fórmula II



composto de fórmula III



composto de fórmula IV



na qual para cada uma das fórmulas I, II, III, ou IV, R^1 é selecionado do grupo que consiste em:

a) C(O);

b) C(O)-alquila em C_1-C_{14}-C(O), no qual essa alquila em C_1-C_{14} é facultativamente substituída por um hidróxi, um alcóxi em C_1-C_5, um alquileno dióxi em C_1-C_5, um (alquil em C_1-C_5) amino ou um (alquila em C_1-C_5)arila, no qual essa parte arila desse (alquila em C_1-C_5)arila é facultativamente substituída por um alcóxi em C_1-C_5, um (alquila em C_1-C_5)amino, um (alcóxi em C_1-C_5)amino, um (alquila em C_1-C_5) amino alcóxi em C_1-C_5, -O-(alquila em C_1-C_5) amino alcóxi em C_1-C_5, -O-(alquila em C_1-C_5) amino-C(O)-alquila em C_1-C_5-C(O)OH, ou -O-(alquila em C_1-C_5) amino-C(O)- alquila em C_1-C_5-C(O)- alquila em C_1-C_5;

c) uma alquila com cadeia linear ou ramificada C_2-C_{15} facultati-

vamente substituída por um hidróxi ou um alcóxi; e

d) -C(O)-arileno em C_6-C_{12}-C(O)- no qual esse arileno é facultativamente substituído por um hidróxi, um halogênio, um nitro ou um amino;

a e b são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

d, d', d", e, e' e e" são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

X^1, X^2, Y^1 e Y^2 são independentemente selecionados em um grupo que consiste em nada, um oxigênio, NH e N(C(O)alquila em C_1-C_4), e N(alquila em C_1-C_4):

W^1 e W^2 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma carbonila, um metileno, uma sulfona e um sulfóxido;

R^2 e R^5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em:

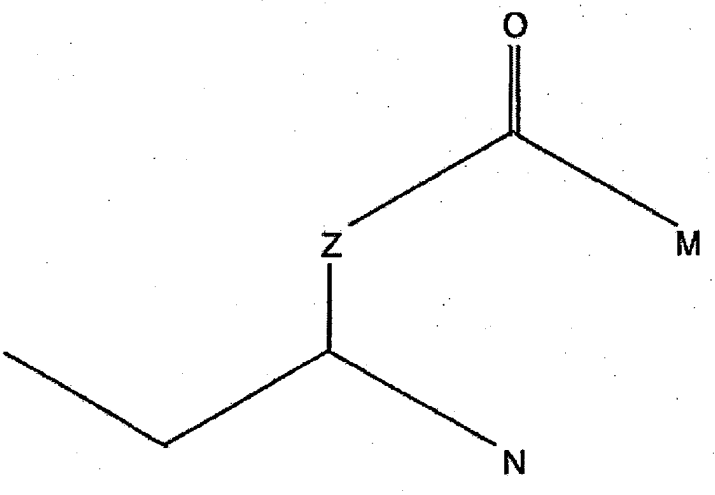
a) uma alquila com cadeia, linear ou ramificada, em C_2-C_{20} que é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

b) uma alcenila ou uma dialcenila com cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20} que é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

c) um alcóxi com cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20} que é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi;

d) NH-alquila com cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, no qual esse grupamento alquila é facultativamente substituído por um oxo, um hidróxi, ou um alcóxi; e

e)



na qual Z é selecionado do grupo que consiste em O e NH, e M e N são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila, uma alcenila, um alcóxi, um aciloxi, alquilamino e um acilamino de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20};

R^3 e R^6 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila e uma alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20} facultativamente substituído por um oxo ou um flúor;

R^4 e R^7 são independentemente selecionados do grupo que consiste em um C(O)-alquila ou alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, uma alquila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, um alcóxi de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}, e uma alcenila de cadeia linear ou ramificada em C_2-C_{20}; no qual esses grupamentos alquila, alcenila, ou um alcóxi podem ser independentemente e facultativamente substituídos por um hidróxi, um flúor ou alcóxi em C_1-C_5;

G_1, G_2, G_3 e G_4 são independentemente selecionados do grupo que consiste em um oxigênio, um metileno, um amino, um tiol, -C(O)NH-, -NHC(O)-, e -N(C(O)alquila em C_1-C_4)-;

ou G^2R^4 ou G^4R^7 podem junto ser um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila;

e no qual para a fórmula III:

a' e b' são independentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, de forma preferida 2;

Z^1 é selecionado do grupo que consiste em $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$, $-OP(O)(OR^8)(OH)$ no qual R^8 é uma cadeia alquila em C_1-C_4, $-OS(O)_2OH$, $-S(O)_2OH$, $-CO_2H$, $-OB(OH)_2$, -OH, $-CH_3$, $-NH_2$ e $-NR^9{}_3$ o R^9 é uma alquila em C_1-C_4;

Z^2 é selecionado do grupo que consiste em $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$, $-OP(O)(OR^{10})(OH)$ ou R^{10} é uma cadeia em C_1-C_4, $-OS(O)_2OH$, $-S(O)_2OH$, $-CO_2H$, $-OB(OH)_2$, -OH, $-CH_3$, $-NH_2$ e NR^{11} é uma cadeia alquila em C_1-C_4;

e no qual para a fórmula IV:

R12 é H ou uma cadeia alquila em C_1-C_4;

Ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto de fórmula

químico I, II, III, ou IV;

3. Emulsão, de acordo com a reivindicação 1, na qual pelo menos 90% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho ≤ 200nm.

4. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, na qual pelo menos 50% da população volúmica das gotículas de óleo têm um tamanho ≤ 110 nm.

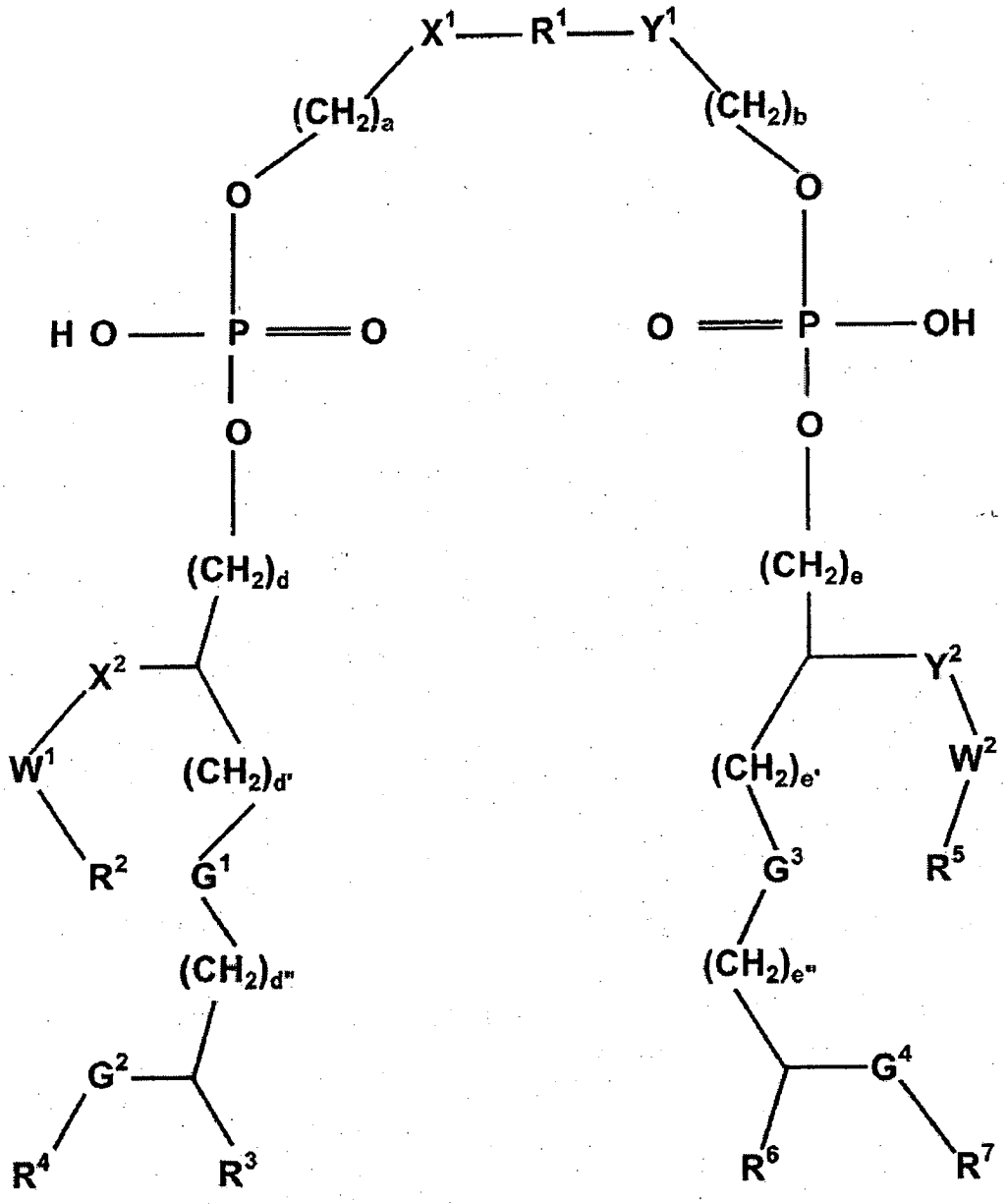
5. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, na qual a inversão de fase a uma temperatura compreendida entre 45°C e 80°C, de forma preferida entre 50°C e 65°C.

6. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, compreendendo além disso pelo menos um alditol.

7. Emulsão, de acordo com a reivindicação 6, na qual o alditol é o sorbitol, o manitol, o glicerol, o xilitol ou o eritritol.

8. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, na qual a fase aquosa é uma solução salina tamponada.

9. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, na qual o agonista do TLR4 é um composto químico de fórmula I:



ou um sal farmaceuticamente aceitável desse composto.

10. Emulsão, de acordo com a reivindicação 9, na qual:

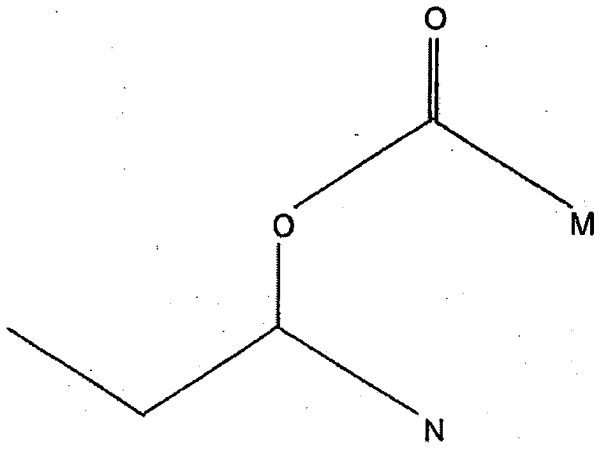
R1 é C(O) ou C(O)-$(CH2)_n$-C(O), n sendo 1, 2, 3 ou 4

a, b, d, d', d", e, e" são independentemente 1 ou 2,

X1, X2, Y1 e Y2 são NH,

W1 e W2 são C(O),

R2 e R5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila de cadeia linear em C10-C15 facultativamente substituída por um oxo, um NH-alquila de cadeia linear em C10-C15 e,



na qual M e N são independentemente uma alquila ou uma alcenila de cadeia linear em C2-C20,

R3 e R6 são cadeias alquilas lineares em C5-C10,

R4 e R7 são selecionados do grupo que consiste em um hidrogênio, C(O)-alquila de cadeia linear em C8-C12 e C(O)alcenila de cadeia linear em C8-C12,

G1 e G3 são um oxigênio ou -NH(CO)-

G2 e G4 são um oxigênio.

11. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 9 ou 10, na qual o composto químico é escolhido no grupo constituído por ER803022, ER803058, ER803732, ER803789, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804764, ER111232, ER112022, ER112048, ER112065, ER112066, ER113651, ER118989, ER119327, ER119328.

12. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 11, na qual a proporção entre a quantidade de agonista do TLA4 e a quantidade total de surfactante hidrófilo e hidrófobo não-iônicos está entre 0,01 x 10^{-2} e 5 x 10^{-2}, de preferência entre 0,1 x 10^{-2} e 2 x 10^{-2}.

13. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, na qual o polioxietileno alquil éter é escolhido no grupo constituído por polioxietileno (12) cetostearil éter (ceteareth-12) do polioxietileno (20) cetostearil éter (ceteareth-20), do poioxietileno (21) estearil éter (steareth-21), do polioxietileno (20) cetil éter (ceteth-20), do polioxietileno (10) cetil éter (ceteth-10), do polioxietileno (10) estearil éter (steareth-10), do polioxietileno (20) estearil éter (steareth-20), do polioxietileno (10) oleil éter (oleth-10), do polioxietileno

(20) oleil éter (oleth-20).

14. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, na qual o tensoativo hidrófobo é um éster do sorbitano ou um éster do manídeo.

15. Emulsão, de acordo com a reivindicação 14, na qual o tensoativo hidrófobo é o manídeo monooleato.

16. Emulsão, de acordo com a reivindicação 14, na qual o tensoativo hidrófobo é o sorbitano monooleato.

17. Uma emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 16, na qual as quantidades de tensoativos hidrófilo e hidrófobo são tais que HLB global dos tensoativos está entre 8,5 e 10.

18. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 17, na qual a quantidade de escaleno representa entre 5% e 45% do peso total da emulsão.

19. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 18, na qual a proporção entre a quantidade de escaleno e a quantidade de tensoativos está entre 2,0 e 4,0, de preferência entre 2,5 e 3,5.

20. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 19, na qual o agonista do TLR4 é o composto químico ER804057, o tensoativo hidrófilo não-iônico é o polioxietileno (12) cetoestearil éter (ceteareth-12), o tensoativo hidrófobo não-iônico é o sorbitano monooleato e solvente aquoso um tampão fosfato ou um tampão citrato.

21. Emulsão, de acordo com a reivindicação 20, na qual:

a) a quantidade de escaleno representa entre 5 e 45% do peso total da emulsão (peso/peso),

b) a proporção entre a quantidade de escaleno e a quantidade total de polioxietileno (12) cetoestearil éter (ceteareth-12) e de sorbitano monooleato está entre 2,0 e 4,0,

c) as quantidades de ceteareth-12 e de sorbitano monooleato são tais que HLB se situa entre 8,5 e 10; e

d) a proporção entre a quantidade de ER804057 e a quantidade total de polioxietileno (12) cetoestearil éter (ceteareth-12) e de sorbitano monooleato está entre $0,01 \times 10^{-2}$ e 2×10^{-2}.

22. Emulsão, de acordo com a reivindicação 21, compreendendo, além disso, manitol, cuja quantidade representa 0,1 e 10% do peso total da emulsão.

23. Emulsão, de acordo com uma das reivindicações 1 a 22, compreendendo, além disso, um substrato de liofilização.

24. Emulsão, de acordo com a reivindicação 23, na qual o substrato de liofilização é uma solução aquosa de sacarose, de manitol e de dodecil maltosídeo.

25. Utilização de uma emulsão, como definida em uma das reivindicações 1 a 24, para o preparo de uma composição vacinal.

26. Utilização de uma emulsão, como definida em uma das reivindicações 1 a 24, para o preparo de uma composição vacinal, compreendendo como antígeno vacinal pelo menos uma hemaglutinina do vírus gripal.

27. Utilização de uma emulsão, como definida em uma das reivindicações 1 a 24, para o preparo de uma composição vacinal, compreendendo como antígeno vacinal um antígeno de envoltório do citomegalovirus (CMV)).

28. Utilização de uma emulsão, como definida na reivindicação 27, na qual o antígeno de envoltório do CMV é a proteína gB do CMV ou um derivado desta que compreende pelo menos um epitopo neutralizante.

29. Utilização de uma emulsão, como definida na reivindicação 28, na qual o antígeno de envoltório do CMV é a proteína gB deletada do domínio transmembranário e cujo local de clivagem é inoperante.

30. Processo de preparo de uma emulsão H/E, como definida em uma das reivindicações 1 a 24, compreendendo uma etapa na qual uma emulsão inversa E/H é obtida por elevação de temperatura e uma etapa na qual a emulsão inversa E/H é transformada em emulsão H/E por diminuição da temperatura.

31. Processo, como definida na reivindicação 30, no qual a emulsão E/H é obtida, misturando-se em uma primeira etapa uma fase aquosa que compreende um solvente aquoso, um polioxietileno alquil éter e um agonista do TLR4 com uma fase oleosa compreendendo o escaleno e um

tensoativo hidrófobo não-iônico para se obter uma emulsão H/E e aquecendo-se em uma segunda etapa a emulsão H/E a uma temperatura que é pelo menos a temperatura de inversão de fase da emulsão.

32. Processo, de acordo com a reivindicação 30, no qual a emulsão E/H é obtida, aquecendo-se separadamente uma fase aquosa que compreende um solvente aquoso, um polioxietileno alquil éter e um agonista do TLR4 e uma fase oleosa, compreendendo escaleno e um tensoativo hidrófobo não-iônico a uma temperatura que é pelo menos igual à temperatura de inversão de fase da emulsão, depois misturando-se a fase aquosa com a fase oleosa, mantendo a temperatura da mistura a uma temperatura que é pelo menos igual à temperatura de inversão de fase.

33. Processo, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, no qual o agonista do TLR4 está na fase oleosa ao invés de estar na fase aquosa.

34. Processo, de acordo com uma das reivindicações 31 a 33, no qual a fase aquosa compreende também um alditol.

35. Processo, de acordo com uma das reivindicações 31 a 34, no qual a uma temperatura de inversão de fase está compreendida entre 45°C e 80°C, de forma preferida entre 50 e 65°C.

36. Processo de preparo de uma composição vacinal, no qual se mistura pelo menos um antígeno vacinal com uma emulsão H/E, contendo um agonista do TLR4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado, caracterizado pelo fato de a emulsão H/E contendo o agonista do TLR4 ser preparada segundo um processo de inversão de fase, compreendendo uma etapa na qual se obtém uma emulsão sf de emulsão inversa E/H por aumento da temperatura e uma etapa em que se transforma a emulsão E/H em H/E por diminuição da temperatura.

37. Processo, de acordo com a reivindicação 36, no qual a emulsão H/E compreende:

a) um agonista do TLR4, tal como definido na reivindicação 2;

b) do escaleno;

c) um solvente aquoso;

d) um tensoativo hidrófilo não-iônico que é polioxietileno alquil

éter; e

e) um tensoativo hidrófobo não-iônico.

38. Processo, de acordo com uma das reivindicações 30 a 37, compreendendo, além disso, uma etapa de liofilização.

PI0706527-2

RESUMO

Patente da Invenção: "**EMULSÃO EM ÓLEO NA ÁGUA TERMORREVERSÍVEL**".

A presente invenção refere-se a uma emulsão em óleo na água, termorreversível, compreendendo: um agonista do TLR4, cuja estrutura química não comporta núcleo açucarado, escaleno, um tensoativo não-iônico pertencendo ao grupo químico dos polioxietileno alquil éter, um tensoativo hidrófilo, um solvente aquoso, e que manifesta propriedades imunoestimulantes.