



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

(11) PI 0818718-5 B1



(22) Data do Depósito: 06/10/2008

(45) Data de Concessão: 27/08/2019

(54) Título: PROCESSO DE PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA COMPREENDENDO ANTÍGENO E ADJUVANTE NA FORMA DE LÁTEX INVERSO DE HOMOPOLÍMERO DO ÁCIDO ACRÍLICO

(51) Int.Cl.: A61K 9/00; A61K 9/127; A61K 47/32; A61K 47/44.

(30) Prioridade Unionista: 24/10/2007 FR 0758542.

(73) Titular(es): SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPPIC.

(72) Inventor(es): LAURENT DUPUIS; JÉRÔME GAUCHERON; OLIVIER BRAUN.

(86) Pedido PCT: PCT FR2008051807 de 06/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/053601 de 30/04/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/04/2010

(57) Resumo: PROCESSO DE PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA COMPREENDENDO PELO MENOS UM ANTÍGENO E PELO MENOS UM ADJUVANTE Processo de preparo de uma vacina, compreendendo uma etapa a) de preparo de uma composição adjuvante por dispersão em uma solução aquosa fisiologicamente aceitável, de pelo menos um látex inverso ou de um pó de polímero resultante da atomização desse látex inverso; uma etapa b) de mistura da composição obtida na etapa a) em um meio antigênico, destinado a formar uma composição de vacina.

**PROCESSO DE PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA
COMPREENDENDO ANTÍGENO E ADJUVANTE NA FORMA DE LÁTEX
INVERSO DE HOMOPOLÍMERO DO ÁCIDO ACRÍLICO**

CAMPO DE APLICAÇÃO

5 A presente invenção se refere a um processo de preparo de uma composição de vacina, compreendendo pelo menos um antígeno, notadamente um antígeno de origem viral, bacteriana ou parasitária e pelo menos um adjuvante.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 O desenvolvimento de vacinas inativadas ou contendo antígenos purificados é cada vez mais importante, pois permite evitar os efeitos secundários indesejáveis no indivíduo tratado. Todavia, a melhoria da qualidade dos antígenos é feita em detrimento de seu caráter imunógeno. É
15 por essa razão que são associados a adjuvantes de imunidade.

Os adjuvantes de imunidade são produtos que aumentam as reações do sistema imunitário, quando são administrados em presença de antígenos de origem viral, bacteriana ou
20 sintética. Eles provocam o aparecimento maciço de macrófagos no local de injeção, depois nos nódulos linfáticos, aumentam a produção de imunoglobulinas específicas, os anticorpos, e estimulam numerosas células implicadas nos mecanismos da defesa imunitária.

25 Esses adjuvantes são de naturezas diversas. Elas podem, por exemplo, consistir em emulsões que se apresentam sob a forma de emulsões água em óleo E/H, ou óleo em água H/E ou água em óleo em água E/H/E ou óleo em água em óleo H/E/H.

30 Os adjuvantes de Freund são muito eficazes; eles

resultam da associação de um óleo mineral e de um éster de manitol contendo ou não uma micobactéria morta. As vacinas fabricadas por mistura em partes iguais de um adjuvante de Freund com um meio antigênico aquoso, permanecem ainda as referências no mundo inteiro para os estudos em laboratório. Eles se apresentam sob a forma de emulsões água no óleo E/H, isto é, de emulsões para as quais a fase contínua é constituída por um óleo ou uma mistura de óleos, e a fase dispersada é uma fase aquosa que pode compreender excipientes solubilizantes como, por exemplo, o glicerol ou o dimetil-sulfóxido. O princípio ativo fica geralmente localizado na fase aquosa que é freqüentemente uma solução salina tamponada. Essa fase está sob a forma de gotas separadas entre elas por uma película oleosa. Essa formulação permite obter respostas biológicas amplificadas e prolongadas no tempo.

Todavia, essas emulsões desse tipo E/H são geralmente muito viscosas e, portanto, dificilmente são injetáveis. Elas necessitam freqüentemente da utilização de seringas com diâmetro de agulha considerável e são a causa de dores, quando da injeção e de traumatismos no nível do local da injeção.

O teor mássico em fase aquosa das emulsões E/H injetáveis se situa em torno de 30 a 40 % para 100 % da massa da emulsão. O teor mássico máximo encontrado é 50 % mássico. Ora, esse limite constitui uma trava notadamente ao desenvolvimento de vacinas polivalentes, aos quais são associados vários antígenos e para os quais seria preferível obter emulsões E/H tendo teores em fase aquosa superiores a 50 % mássico.

Ora, em uma emulsão E/H de baixo teor em fase aquosa, até aproximadamente 20 % mássico, a viscosidade da emulsão é muito próxima da viscosidade do óleo. O aumento da proporção mássica em fase aquosa aumenta sua viscosidade. É assim que uma emulsão a 20 % mássico de água tendo uma viscosidade de 100 mPa.s, medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 2 que gira a uma velocidade de 60 rpm, se transforma em um creme muito dificilmente injetável, quando se aumenta o teor em água até 50 % mássico.

Certos adjuvantes oleosos comerciais que se apresentam sob a forma de emulsões E/H, como o MONTANIDE™ ISA 70 permitem obter emulsões injetáveis E/H, contendo aproximadamente 30 % em peso, de fase aquosa, 70 % em peso de fase oleosa e tendo viscosidades da ordem de 50 a 100 mPa.s, medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 2, girando a uma velocidade de 60 rpm. Outros adjuvantes, como o MONTANIDE™ USA 50V2, permitem obter emulsões injetáveis E/H, contendo aproximadamente 50 % em peso de fase aquosa, 50 % em peso de fase oleosa e tendo viscosidades inferiores a 250 mPa.s medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 2, que gira a uma velocidade de 60 rpm.

O pedido internacional de patente publicado sob o número WO 99/20305 divulga a utilização de tensoativos sobre oleato de manitol com óleos minerais como o MARCOL™ 52 para fazer emulsões, ditas fluidas, de viscosidades da ordem de 500 mPa.s medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 2 girando a uma

velocidade de 60 rpm.

A noção de emulsão fluida depende amplamente do domínio de aplicação. Para as emulsões injetáveis, o limite superior de viscosidade para uma emulsão fluida é definido em relação à viscosidade de uma emulsão de tipo E/H de referência, que contém 50 % mássico de fase aquosa e 50 % mássico de adjuvante incompleto de Freund (IFA); essa viscosidade, medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 3 que gira a uma velocidade de 30 rpm, é da ordem de aproximadamente 2000 mPa.s. Essa emulsão é considerada como muito viscosa.

Uma emulsão de tipo E/H será dita fluida, caso sua viscosidade seja inferior a 4 vezes aquela dessa emulsão de referência, isto é inferior a 500 mPa.s a 25 °C, medida com o auxílio de um viscosímetro BROOKFIELD LVT equipado com um móbile nº 2 e girando a uma velocidade de 30 rpm.

Todavia, as emulsões fluidas são, em geral, menos estáveis do que as emulsões mais viscosas, já que defasagens à temperatura ambiente são observadas alguns dias somente, após seu preparo.

Existem polímeros espessantes de fases aquosas que se apresentam sob a forma de pós, tais como os homopolímeros do ácido acrílico sob suas formas sódicas ou os copolímeros à base de ácido acrílico e de seus ésteres. Citar-se-ão, por exemplo, os polímeros comercializados pela sociedade Noveon com o nome de marca, CARBOPOL™ e PEMULEN™. Eles são descritos notadamente nas patentes americanas US 5.373.044, US 2.798.053 e na patente européia EP 0 301 532. Esses polímeros foram desenvolvidos na origem como espessantes destinados a espessar formulações essencialmente destinadas

a aplicações cosméticas, e que são descritos e utilizados, há muitos anos. Esses polímeros são obtidos a partir de um monômero, tal como, por exemplo, o ácido acrílico, o ácido metacrílico, os ésteres do ácido acrílico ou o ácido metacrílico em solução em uma fase solvente orgânica. No decorrer da reação de polimerização, obtida pelo acréscimo de diferentes catalisadores em condições de temperatura e de pressão específicas, o polímero se insolubiliza da fase solvente inicial para se precipitar no fundo do reator. Esse processo é denominado "polimerização por precipitação".

Os polímeros assim obtidos, cujos graus os mais conhecidos são os CARBOPOL ®, são espessantes muito eficazes muito utilizados em cosmética. Esses polímeros são também utilizados para aplicações farmacêuticas variadas:

- . preparo de matrizes de polímeros para efeito de liberação retardada;
- . preparo de géis de polímeros e complexação desses polímeros com proteínas;
- . preparo de películas de polímeros induzindo uma proteção, quando da colocação em contato com os fluidos biológicos;
- . preparo de formulações bio-adesivas, assegurando maior remanência, quando da aplicação sobre as mucosas;
- . preparo de adjuvantes de vacinas.

A utilização como adjuvante de vacina, com teores mássicos finais em polímero da ordem do "por cento", se apresenta sob a forma de uma vacina fluida e translúcida facilmente injetável.

As propriedades adjuvantes das substâncias sintéticas

estão muito ligadas às suas formas físicas, quando da administração. Assim, o tamanho das partículas utilizadas para acionar um efeito adjuvante importante é um parâmetro maior que vai controlar a possibilidade de encargo pelas células imunocompetentes. Além disso, em função do tamanho das partículas, será também possível orientar a resposta para uma produção de anticorpos (resposta humoral) ou antes de tudo para estimular células específicas do sistema imunitário (resposta celular). A síntese de micro-esferas de diferentes polímeros em fase solvente sob a forma de dispersões é amplamente descrita na literatura com possibilidade de encapsulamento de um agente biologicamente ativo (podendo ser um antígeno no caso das vacinas) ou utilizado como suporte de adsorção para veicular e apresentar u agente ativo ligado à superfície externa das micro-esferas por interações mais ou menos fortes.

O controle do tamanho das partículas adjuvantes é um desafio permanente, pois deve ser acompanhado de uma estabilidade dessas partículas adjuvantes no decorrer do tempo. É importante notadamente evitar as agregações no decorrer da estocagem ou as separações de fases. O controle do tamanho deve também ser acompanhada de um estabilidade da composição, após injeção no ser vivo, notadamente em razão de estresse ligado à variação de pH, à presença de enzimas, às variações de temperatura.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 ilustra os resultados comparação imunológica de microgel obtidos em emulsão com poliacrilato obtido em fase de solvente (Carbopol® 974).

A FIG. 2 ilustra resultados/ comparação de inocuidade de microgel obtido em fase de solvente (Carbopol® 974) / controle positivo de reação local: emulsão A / O.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 É por isso que a requerente buscou desenvolver uma tecnologia original de síntese dos polímeros, permitindo controlar o tamanho dos aglomerados de polímeros (ou "microgéis"), assegurando assim muito bons desempenhos adjuvantes. Para isso, a tecnologia da polimerização em emulsão água no óleo E/H, ou em emulsão inversa, é utilizada para preparar esses polímeros. Com efeito, o tamanho das gotas de solução de monômero é controlado pela utilização de sistemas tensoativos emulsionantes de tipo água no óleo adaptados às tecnologias das emulsões E/H.

10 Trata-se, em geral, do acoplamento de um tensoativo emulsionante lipófilo, tendo, por exemplo, um HLB compreendido entre 2 e 7, com um tensoativo emulsionante hidrófilo, tendo, por exemplo, um HLB compreendido entre 10 e 15, com um valor médio ponderado, assegurando uma emulsão E/H homogêneo. A polimerização dos monômeros é assegurada pelo acréscimo dos catalisadores e outros reticulantes às concentrações habituais em condições de pH e de temperatura adaptadas a uma reação completa do monômero para formar polímeros.

25 A dimensão das partículas adjuvantes tem um impacto direto sobre as propriedades imunológicas das formulações que os contêm. Além disso, em função das espécies que devem ser vacinadas e do tipo de vacina considerado, o tamanho ótimo das partículas pode diferir. Pelo "savoir-faire" de formulação das emulsões (otimização do HLB, natureza dos

30

tensoativos, concentração, processo), é possível, quando do processo de síntese em emulsão inversa, controlar a repartição do tamanho das gotas da emulsão e assim o tamanho médio e a repartição granulométrica dos aglomerados. Por dispersão, entendem-se, em função do teor em tenso-ativo e da energia de cisalhamento fornecido quando da etapa de emulsificação, sistemas heterogêneos que podem ser:

- . suspensões
- 10 . emulsões
- . microemulsões.

Essas diferentes formas dispersadas permitem controlar a dispersão de tamanho dos microgéis em domínios que vão de 50 nm a 100 µm.

- 15 As condições químicas de síntese do polímero (tipos de monômeros, catalisadores, iniciadores) permitem controlar as propriedades individuais do polímero obtido (massa molar média, reticulação, caráter aniônico).

O adjuvante assim sintetizado se apresenta sob a forma de uma emulsão "gotas de polímero no óleo" ou "látex inverso". Essa emulsão, quando é dispersada em uma solução aquosa de antígeno contendo um tampão fisiológico, se inverte e se dispersa para dar uma dispersão fluida e translúcida de microgéis de polímeros na água. Por exemplo, gotas de microgéis de poliacrilato de sódio podem ter um tamanho médio compreendido entre 0,5 e 5 micrometros, por exemplo, aproximadamente 2 micrometros.

A invenção tem por objeto um processo de preparo de uma vacina que utiliza um látex inverso. Mais particularmente, a invenção tem por objeto um processo de

preparo de uma vacina, compreendendo:

- uma etapa a) de preparo de uma composição adjuvante por dispersão em uma solução aquosa fisiologicamente aceitável, de pelo menos um látex inverso ou de um pó de polímero resultante da atomização desse látex inverso;

- uma etapa b) de mistura da composição obtida na etapa a) em um meio antigênico, destinado a formar uma composição de vacina.

Por látex inverso, entende-se uma emulsão água no óleo de polímero, na qual a fase aquosa, dispersada na fase oleosa contínua, contém esse polímero. O látex inverso, resultante da polimerização em emulsão inversa se apresenta, portanto, sob a forma de uma emulsão líquida. Uma atomização posterior desse látex inverso pode, se necessário ou se desejado, ser efetuada para formar esse pó de polímero. A atomização é, por exemplo, descrita no pedido de patente europeia EP 1 496 081 (parágrafo [0033] e parágrafos [0055] a [0072] dos exemplos A e B).

Na referida EP 1 496 081 o parágrafo [0033] menciona sobre as principais etapas do processo para obtenção de um látex inverso, i.e., etapa a) e etapa b), seguido pela etapa de atomização (etapa c). Os exemplos A e B do pedido EP 1 496 081 descrevem a produção de dois látex inversos por meio de um processo de polimerização do radical em emulsão inversa (parágrafos [0055] a [0072]).

Por solução aquosa fisiologicamente aceitável, designam-se no âmbito da presente invenção as soluções aquosas que estão aptas a serem utilizadas no preparo de vacinas, quer se trate, por exemplo, de água de qualidade conforme as farmacopéias notadamente europeia ou americana

como, por exemplo, os soros fisiológicos, ou de soluções salinas e/ou, se for o caso, hidro-alcoólicos, de acordo com essas farmacopéias.

Por composição adjuvante, designa-se uma composição
5 adjuvante de imunidade.

Pelo menos um tensoativo de caráter hidrófilo pode também ser acrescentado previamente a essa etapa a), de forma a melhorar a estabilidade dessa dispersão no tempo.

Por tensoativo de caráter hidrófilo, designam-se
10 agentes tenso-ativos emulsionantes que possuem um valor de HLB suficientemente elevado, compreendido entre 10 e 15, para fornecer emulsões óleo na água estáveis, tais como os ésteres de manitan etoxilados, os ésteres de sorbitan etoxilados como, por exemplo, o oleato de sorbitam
15 etoxilado com 20 moles de óxido de etileno, comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome de MONTANOX™ 80.

Por meio antigênico, designa-se um meio que compreende pelo menos um antígeno ou pelo menos um gerador in vivo de um composto que compreende uma sequência de ácidos
20 aminados. Por antígeno ou pelo menos um gerador in vivo de um composto que compreende uma sequência de ácidos aminados, designam-se seja microorganismos mortos, tais como vírus, as bactérias ou os parasitas, seja frações purificadas desses microorganismos, seja microorganismos
25 vivos cujo poder patógeno foi atenuado. A título de exemplos de vírus que podem constituir um antígeno segundo a presente invenção, há o vírus da raiva, o herpes virus, tais como vírus do Mal de Aujeszky, os ortomixovirus, tais como influenza, os picomavirus, tais como o vírus da febre
30 aftosa ou os retrovírus, tais como VIH. A título de micro-

organismo do tipo bacteriano que pode constituir um antígeno, segundo a presente invenção, podem-se citar E.Coli, e aqueles dos gêneros Pasteurella, Furunculosis, Vibriosis, Staphylococcus e Streptococcus. A título de exemplos de parasitas, há aqueles dos gêneros Trypanosoma, Plasmodium e Leishmania. Podem-se citar também os vírus recombinantes, notadamente os vírus não envolvidos, tais como os adenovírus, o vírus da vacina, o vírus Canarypox, o herpes vírus ou os caculovirus. Designa-se também um vetor recombinante viral não envolvido vivo, cujo genoma contém, inserida, de preferência em uma parte não essencial para a réplica do vírus envolvido correspondente, uma sequência codificando para uma subunidade antigênica, induzindo uma síntese de anticorpo e/ou um efeito protetor contra o mencionado vírus envolvido ou microorganismo patógeno; essas subunidades antigênicas podem ser, por exemplo, uma proteína, uma glicoproteína, um peptídeo ou uma fração peptídica e/ou protetora contra uma infecção por um micro-organismo vivo tal como um vírus envolvido, uma bactéria ou um parasita. O gene exógeno inserido no micro-organismo pode ser, por exemplo,, oriundo de um vírus Aujeszky ou HIV.

Pode-se citar notadamente um plasmídeo recombinante constituído de uma sequência de nucleotídeos, na qual é inserida uma sequência nucleotídica exógena, proveniente de um micro-organismo ou de um vírus patógeno. Esta última sequência nucleotídica tem por finalidade permitir a expressão de um composto que compreende uma sequência de ácidos aminados, esse composto tendo ele próprio por finalidade acionar uma reação imune em um organismo

hospedeiro.

Por gerador "in vivo" de um composto que compreende uma seqüência de ácidos aminados, designa-se qualquer produto biológico capaz de expressar esse composto no
5 organismo hospedeiro, no qual se introduz esse gerador in vivo. O composto que compreende a seqüência de ácidos aminados pode ser uma proteína, um peptídeo ou uma glicoproteína. Esses geradores *in vivo* são geralmente obtidos por processos oriundos da engenharia genética. Mais
10 particularmente, podem consistir em micro-organismos vivos, geralmente um vírus, que exerce o papel de vetor recombinante, no qual é inserida uma seqüência nucleotídica, notadamente um gene exógeno. Esses compostos são conhecidos como tais e utilizados notadamente como
15 vacina subunitária recombinante. Em relação a isto, é possível se referir ao artigo de M.Eliot et al., Journal of virology (1990) 71, 292-2431 e aos pedidos internacionais de patente publicados sob os números WO-A-91/00107 e WO-A-94/16681. Os geradores *in vivo*, de acordo com a invenção,
20 podem também consistir em um plasmídeo recombinante, compreendendo uma seqüência nucleotídica exógena, capaz de expressar em um organismo hospedeiro um composto que compreende uma seqüência de ácidos aminados. Esses plasmídeos recombinantes e seu modo de administração em um
25 organismo hospedeiro foram descritos em 1990, por LIN et al., Circulation 82: 2227, 2221; COX et al, J. of VIROL. Sept. 1993, 67, 9, 5664-5667 e no pedido internacional publicado sob o número WO 95/25542. Segundo a natureza da seqüência nucleotídica compreendida no gerador *in vivo*, o
30 composto que compreende a seqüência de ácidos aminados que

é expressa no meio do organismo hospedeiro pode:

(I) ser um antígeno, e permitir o acionamento de uma reação imune;

(II) ter uma ação curativa face uma doença,
5 essencialmente uma doença de ordem funcional, que se desenvolveu no organismo hospedeiro. Nesse caso, o gerador *in vivo* permite um tratamento do hospedeiro, do tipo terapia gênica.

A título de exemplo, essa ação curativa pode consistir
10 em uma síntese pelo gerador *in vivo* de citoquinas, como as interleuquinas, notadamente a interleuquina 2. Estas permitem o desencadear ou o reforço de uma reação imune visando à eliminação seletiva das células cancerígenas.

A composição de vacina tal como definida acima
15 compreende uma concentração em antígeno que depende da natureza desse antígeno que depende da natureza desse antígeno e da natureza do indivíduo tratado. Todavia, é particularmente notável que um adjuvante, de acordo com a invenção, permita diminuir notavelmente a dose habitual de
20 antígeno requerido. A concentração adequada de antígeno pode ser determinada de maneira clássica pelo técnico. Geralmente, essa dose é da ordem de $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ a $1 \text{ g}/\text{cm}^3$ mais geralmente compreendida entre $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ e $100 \text{ mg}/\text{cm}^3$. A concentração desse gerador *in vivo* na composição, de acordo
25 com a invenção, depende, ainda, notadamente da natureza desse gerador e do hospedeiro no qual é administrado. Essa concentração pode ser facilmente determinada pelo técnico, com base de experiência de rotina. A título indicativo, quando o gerador *in vivo* é um micro-organismo recombinante,
30 sua concentração na composição, de acordo com a invenção,

em geral compreendida entre 10^2 e 10^{15} microorganismos/cm³ e, de preferência, entre 10^5 e 10^{12} microorganismos/cm³. Quando o gerador *in vivo* é um plasmídeo recombinante, sua concentração na composição obtida, segundo o processo
5 objeto da invenção, pode estar compreendida entre 0,01 g/dm³ e 100 g/dm³. A vacina, tal como definido anteriormente, é preparado, misturando-se a fase adjuvante e a fase antigênica, acrescentando eventualmente água ou um meio diluente farmacêuticamente aceitável.

10 A fase contínua oleosa, utilizada para preparar o látex inverso utilizado no decorrer da etapa a) do processo objeto da presente invenção, compreende um ou vários compostos escolhidos dentre os óleos de origem mineral, vegetal ou animal, os ésteres alquílicos desses óleos, os
15 ésteres alquílicos de ácidos graxos ou os éteres alquílicos de ácidos graxos, os ésteres de ácidos graxos e de polióis ou os éteres de álcoois graxos e de polióis, os óleos de síntese.

Um óleo mineral comercial pode também ser utilizado,
20 isto é, um óleo mineral comercial, contendo hidrocarbonetos saturados como as parafinas, as isoparafinas, as cicloparafinas, apresentando à temperatura ambiente, uma densidade entre 0,7 e 0,9 e um ponto de ebulição superior a 180 °C, tais como, por exemplo, o EXXSOL™ D 100 S, ou o
25 Marcol™52 comercializados pela sociedade EXXON CHEMICAL, o iso-hexadecano ou o isododecano, seja uma mistura de vários desses óleos.

Segundo um aspecto preferido da presente invenção, a fase óleo é constituída de MARCOL™ 52 ou de iso-
30 hexadecano; o iso-hexadecano, que é identificado em

Chemical Abstracts pelo número RN = 93685-80-4, é uma mistura de isoparafinas em C₁₂, C₁₆ e C₂₀, contendo pelo menos 97 % de isoparafinas em C₁₆, dentre as quais o constituinte principal é o 2,2,4,4,6,8,8-heptameyil nonano (RN = 4390-04-9). Ele é comercializado na França pela sociedade BAYER. O MARCOL™ 52 é um óleo comercial respondendo à definição dos óleos de vaselina do Codex francês. É um óleo branco mineral conforme as regulamentações FDA 21 CFR 172.878 e CFR 178.3620 (a) e ela é inscrita na Farmacopéia dos USA, US XXIII (1995) e na Farmacopéia européia (1993).

Como exemplos de óleos de origem vegetal, há o óleo de amendoim, o óleo de oliva, o óleo de gergelim, o óleo de soja, o óleo de germes de trigo, o óleo de pevide de uva, o óleo de girassol, o óleo de rícino, o óleo de linho, o óleo de soja, o óleo de milho, o óleo de coprah, o óleo de palma, o óleo de noz, o óleo de amêndoa, o óleo de colza ou ainda o óleo de peixe cartilaginoso, ou o óleo de origem vegetal comercializado na França pela sociedade SOPHIM, sob o nome PHYTOSQUALAN™, identificado em Chemical Abstracts pelo número RN = 111-01-3, e que consiste em uma mistura de hidrocarbonetos contendo mais de 80 %, em peso de 2, 6, 10, 15, 19, 23 - hexametil tetracosano.

Como exemplos de óleos de origem animal, há o óleo de *spermaceti*, a gordura de porco, o óleo de peixe cartilaginoso ou o óleo extraído dos fígados de peixes.

Como exemplos de ésteres alquílicos de óleos, há os ésteres metílicos etílicos, propílicos lineares ou ramificados ou butílicos, lineares ou ramificados, esses óleos.

Como ácidos graxos apropriados ao preparo dos ésteres citados acima, há mais particularmente, aqueles comportando de 12 a 22 átomos de carbono, tais como, por exemplo, o ácido mirístico, o ácido palmítico, o ácido oléico, o ácido ricinoleico ou o ácido isosteárico e vantajosamente um ácido graxo líquido a 20 °C.

Como exemplos de ésteres de ácidos graxos ou de éteres de ácidos graxos há os ésteres alquílicos de ácidos graxos, tais como o oleato de etila, o oleato de metila, o miristato de isopropila, ou o palmitato de octila, os ésteres de ácidos graxos e de polióis ou os éteres de álcoois graxos e de polióis, tais como os monoglicerídeos de ácidos graxos, os diglicerídeos de ácidos graxos, os triglicerídeos de ácidos graxos, os ésteres de ácidos graxos com um poliglicerol ou os ésteres de ácidos graxos e de propileno glicol, e, mais particularmente, os ésteres de ácidos graxos com um hexol, tal como, por exemplo o sorbitol ou o manitol, os ésteres de ácidos graxos com um anidrido de hexol, como o sorbitano ou o manitano.

Como exemplos de óleo de síntese, há o polideceno hidrogenado ou o poliisobuteno hidrogenado, comercializado na França pela sociedade ETs B. Rossow et Cie sob o nome PARLEAM - POLYSYNLANE™, que é citado por Micehl et Irene Ash, "Thesaurus of Chemical Products", Chemical Publishing Co, Inc. 1986 Volume I, página 211 (ISBN 0 7131 3603 0).

No âmbito da presente invenção, a fase contínua oleosa, utilizada para preparar o látex inverso utilizado no decorrer da etapa a) do processo objeto da presente invenção, pode compreender um único dos compostos citados acima ou uma mistura de vários dos compostos citados acima.

A proporção da fase oleosa no látex inversa está compreendida entre 10 % e 50 % mássica, e, de preferência, entre 15 % e 25 % mássico, da massa total do látex inverso.

Pelo menos um polímero obtido por polimerização em emulsão inversa, levando ao látex inverso na base do preparo da composição adjuvante preparada, quando da etapa a) do processo objeto da invenção é escolhido dentre os polieletrólitos aniônicos, ramificados ou reticulados, escolhidos dentre os copolímeros do ácido acrílico e do ácido 2-metil -[(1-oxo-2-propenil) amino] 1-propano sulfônico (AMPS), os copolímeros de acrilamina e do ácido 2-metil-[(1-oxo-2-propenil)amino] 1-propano sulfônico, os copolímeros do ácido -2-metil-[1-oxo-2-propenil) amino] 1-propano sulfônico e acrilato de (2-hidróxi etila), o homopolímero do ácido -2-metil-[(1-oxo-2- propenil)amino] 1-propano sulfônico parcial ou totalmente salificado, o homopolímero do ácido acrílico, parcial ou totalmente salificado, o homopolímero do ácido metacrílico parcial ou totalmente salificado, os copolímeros do cloreto de acrilóil etil trimetil amônio e acrilamida, os copolímeros do AMPS e da vinil pirrolidona, os copolímeros do AMPS e da N-metil acrilamida, os copolímeros do AMPS e o N,N-dimetil acrilamida, os copolímeros do AMPS e do metacrilamida, os copolímeros do AMPS e o N-isopropilacrilamida, os copolímeros do AMPS e o N-[2-hidróxi -1,1- bis(hidróxi metil) etil] propenamida [ou tris(hidróxi metil) acrilamidometano ou N-tris(hidróxi metil) metil acrilamida denominado também THAM], os copolímeros do ácido acrílico e do acrilamida, os copolímeros do ácido acrílico e a N-metil acrilamida, os copolímeros do ácido acrílico e N,N-

dimetil acrilamida, os copolímeros do ácido acrílico e metacrilamida, os copolímeros do ácido acrílico e o N-isopropilacrilamida, os copolímeros do ácido acrílico e o N-[2-hidróxi-1,1-bis (hidróxi metil) etil] propenamida [ou
5 o tris(hidróxi metil) acrilamida metano ou N-tris(hidróxi metil) metil acrilamida denominado também THAM], os copolímeros do ácido acrílico e de acrilatos de alquila, cuja cadeia carbonada compreende entre dez e trinta átomos de carbono, os copolímeros do AMPS e de acrilatos de
10 alquila, cuja cadeia carbonada compreende entre dez e trinta átomos de carbono.

Por polímero ramificado, designa-se um polímero não linear que possui cadeias pendentes, de maneira a se obter, quando esse polímero é colocado em solução na água, um
15 forte estado de emaranhado, levando a viscosidades, de baixo gradiente de velocidade, muito importantes.

Por polímero reticulado, designa-se um polímero não linear que se apresenta no estado de rede tridimensional insolúvel na água, mas inflável na água e levando,
20 portanto, à obtenção de um gel químico.

Quando esse polieletrólito é reticulado, é mais particularmente com um composto dietilênico ou polietilênico na proporção molar expressa em relação aos monômeros utilizados, de 0,005 a 1 % e, de preferência, de
25 0,01 % a 0,2 % e, mais particularmente, de 0,01 % a 0,1 %. De preferência, o agente de reticulação e/ou o agente de ramificação é escolhido dentre o dimetacrilato de etileno glicol, o diacrilato de dietileno glicol, o dialquilóxi acetato de sódio, o diacrilato de etileno glicol, a dialil
30 uréia, a trietilalilamina, o trimetilol propano triacrilato

ou o metileno-bis-(acrilamida), alil sacarose.

Quando o látex inverso é utilizado, quando da etapa de preparo da composição adjuvante preparada na etapa a) objeto do processo da invenção, ele compreende geralmente
5 de 1 a 5 % mássico de u sistema emulsionante de tipo água no óleo (E/H).

Por sistema emulsionante de tipo água no óleo (E/H), designa-se, na definição precedente, seja um único tensoativo, seja uma mistura de tensoativos à condição que
10 essa mistura tenha um valor de HLB suficientemente baixo para induzir emulsões água no óleo. Como agente emulsionante de tipo água - no óleo, há, por exemplo, os ésteres de sorbitan, como o oleato de sorbitan, como aquele comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome MONTANE™
15 70 ou o sesquiolato de sorbitan como aquele comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome MONATANE™ 83. Há também certos ésteres de sorbitan polietoxilados, por exemplo, o monooleato de sorbitan pentaetoxilado como aquele comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome MONTANOX™
20 81 ou o isostearato de sorbitan pentaetoxilado como aquele comercializado sob o nome MONTANOX™ 71 pela sociedade SEPPIC. Há ainda o álcool oleocetílico dietoxilado como aquele comercializado sob o nome SIMULSOL™ OC 72 pela sociedade SEPPIC, os poliésteres de peso molecular compreendido entre 1000 e 3000, produtos da condensação
25 entre um ácido poli(isobutenil) succínico ou seu anidrido e a dietanol amina, tais como o HYPERMER™ 2296 comercializado pela sociedade UNIQEMA ou enfim os copolímeros com blocos de peso molecular compreendido entre
30 2500 e 3500, como o HYPERMER™ B26 comercializado pela

sociedade UNIQEMA ou a SIMALINE™ IR200 comercializado pela sociedade SEPPIC.

Quando o látex inverso é utilizado quando da etapa de preparo da composição adjuvante preparada na etapa a) objeto do processo da invenção, ele compreende geralmente de 2 a 8 % mássico de um sistema emulsionante de tipo óleo na água (H/E).

Por sistema emulsionante de tipo óleo na água (H/E), designa-se na definição precedente, seja um único tensoativo, seja uma mistura de tensoativos à condição que essa mistura tenha um valor de HLB suficientemente elevado para induzir emulsões óleo na água. Como agente emulsionante de tipo óleo na água, há, por exemplo, os ésteres de sorbitan etoxilados como o oleato de sorbitan polietoxilado com 20 moles de óxido de etileno, comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome de MONTANOX™ 80, o laurato de sorbitan polietoxilado com 20 moles de óxido de etileno, comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome de MONTANOX™ 20, o óleo de rícino polietoxilado com 40 moles de óxido de etileno comercializado sob o nome SIMULSOL™ OL50, o álcool oleodecílico decaetoxilado, comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome SIMULSOL™ OC 710, o álcool áurico heptaetoxilado comercializado sob o nome SIMULSOL™ P7 ou o monoestearato de sorbitan polietoxilado com 20 moles de óxido de etileno comercializado pela sociedade SEPPIC sob o nome MONTANOX™ 60.

Um polímero obtido por polimerização em emulsão, levando ao látex inverso na base do preparado da composição adjuvante preparada quando da etapa a) do processo objeto

da invenção, vantajosamente utilizado, é escolhido dentre o grupo constituído do homopolímero do ácido acrílico total ou parcialmente salificado, o homopolímero do ácido metacrilato parcial ou totalmente salificado, os
5 copolímeros do ácido acrílico e do ácido-2-metil -[(1-oxo-2-propenil) amino] 1-propano sulfônico, os copolímeros da acrilamida e o ácido -2-metil-[(1-oxo-2-propenil) amino] 1-propano sulfônico, os copolímeros do ácido -2-metil-[(1-oxo-2-propenil)amino] 1-propano sulfônico e o acrilato de
10 (2-hidroxietila) e ainda mais vantajosamente o poliacrilato de sódio.

A proporção mássica de pelo menos um látex inverso na composição adjuvante preparada quando da etapa a) do processo objeto da invenção está compreendida entre 0,5 % e
15 30 % da massa total da composição adjuvante, e preferencialmente entre 5 e 15 % da massa total da composição adjuvante.

Quando da etapa a) do processo objeto da presente invenção, uma substância imunoestimulante pode ser
20 acrescentada. A substância imunoestimulante é, por exemplo, escolhida dentre um ou vários agentes estimulantes imunitários convencionais, tal como AvridinaTM, a N,N-dioctadecil -N',N'-bis (2-hidróxi etil) propanodiamina, os derivados do MDP (muramil dipeptídeo), notadamente o
25 treonil-MDP, os derivados do ácido micólico ou os derivados do Lipídeo A. Essa substância é mais particularmente uma substância ionizada. A substância ionizada é, por exemplo,, escolhida dentre um ou vários sais orgânicos de cátions metálicos hidro-solúveis, tal como, por exemplo, o
30 gluconato de cálcio, o gluconato de manganês, o salicilato

de alumínio ou o acetato de alumínio solúvel. Quando a composição adjuvante, de acordo com a invenção, compreende um sal farmacologicamente aceitável, este está a uma concentração de 0,02 a 3000 mg/cm³, de preferência 0,1 a 1000 mg/cm³, mais preferencialmente de 0,1 a 150 mg/cm³. Sais insolúveis geralmente utilizados como adjuvantes de imunidade, tais como o hidróxido de alumínio ou o fosfato de cálcio podem também ser utilizados.

De acordo com um aspecto da invenção, quando da etapa a), pelo menos um tensoativo de caráter hidrófilo destinado a estabilizar a emulsão é acrescentado. O HLB de pelo menos um tensoativo de caráter hidrófilo está compreendido entre 10 e 15.

A composição preparada na etapa a) comporta entre 0,1 e 15 % de pelo menos um tensoativo e, de preferência, entre 0,1 e 5 % de pelo menos um tensoativo.

No sentido da presente invenção, o número HLB de um tensoativo é calculado pela fórmula $HLB = 20 (1 - I_s / I_a)$, na qual I_s representa o índice de saponificação e I_a o índice de ácido do ácido graxo utilizado para o preparo do tensoativo. No caso de uma mistura de tensoativos, o HLB da mistura é a soma ponderada de HLB de cada tensoativo. Esses dois índices de saponificação e de ácido são determinados por métodos descritos na Farmacopéia européia.

De acordo com um outro aspecto particular da invenção, a composição obtida quando da etapa a) do processo objeto da presente invenção apresenta um teor mássico em fase oleosa compreendida entre 0,1 e 5 % da massa total da composição obtida quando da etapa a) do processo objeto da presente invenção, e, de preferência, entre 0,2 e 1 %

mássico.

Os agentes tensoativos de caráter hidrófilo utilizados são geralmente escolhidos dentre os corpos graxos modificados.

5 Os corpos graxos modificados utilizados no âmbito da presente invenção podem ser de origem mineral vegetal ou animal. Como corpos graxos modificados de origem mineral, há os óleos de origem petrolífera.

10 Como corpos graxos modificados de origem vegetal, há os óleos vegetais modificados, por exemplo, os óleos modificados de amendoim, de oliva, de gergelim, de soja, de germes de trigo, de pevides de uva, de girassol, de rícino, de linho, de soja, de milho, de coprah, de palma, de noz, de amêndoas ou de colza.

15 Como corpos graxos modificados, designam-se notadamente os derivados alcoxilados de corpos graxos e mais particularmente os derivados alcoxilados de óleos ou os derivados alcoxilados de ésteres alquílicos de óleos e, mais particularmente, os derivados etoxilados e/ou
20 propoxilados de óleos ou os derivados etoxilados e/ou propoxilados dos ésteres metílicos, etílicos, propílicos lineares ou ramificados ou butílicos, lineares ou ramificados, desses óleos. A invenção tem mais especificamente por objeto uma composição tal como definida
25 anteriormente, na qual o corpo graxo modificado é escolhido dentre os derivados etoxilados de óleos que tem um número de moles de óxido de etileno compreendido entre 1 e 10.

Por corpos graxos modificados designam-se também os ésteres de ácidos graxos e de polióis ou os ésteres de
30 álcoois graxos e de polióis, e mais particularmente os

ésteres de ácidos graxos com um hexol, tal como, por exemplo, o sorbitol ou o manitol ou os ésteres de ácidos graxos com um anidrido de hexol, como o sorbitano ou o manitano, os derivados alcoxilados de ésteres de ácidos graxos e de polióis ou os derivados alcoxilados de éteres de álcoois graxos e de polióis, como os triglicerídeos de ácidos graxos alcoxilados, os ésteres alcoxilados de poliglicerol de ácidos graxos, e mais particularmente os ésteres alcoxilados de ácidos graxos com um hexol, tal como, por exemplo, o sorbitol ou o manitol ou os ésteres alcoxilados de ácidos graxos com um anidrido de hexol, como o sorbitano ou o manitano que tem um número de moles de óxidos de etileno compreendido entre 1 e 20.

Por ésteres de ácidos graxos e de polióis, designam-se no âmbito da presente invenção, os monoésteres de ácidos graxos e de polióis ou os poliésteres de ácidos graxos e de poliol, tais como, por exemplo, os diésteres de ácidos graxos e de polióis ou os triésteres de ácidos graxos e de polióis. O mesmo acontece com os derivados polialcoxilados desses ésteres

Por éteres de ácidos graxos e de polióis, designam-se no âmbito da presente invenção, os monoéteres de ácidos graxos e de polióis ou os poliéteres de ácidos graxos e de poliol, tal como, por exemplos os diéteres de ácidos graxos e de polióis ou os triéteres de ácidos graxos e de polióis. O mesmo acontece com os derivados polialcoxilados desses éteres.

Os corpos graxos modificados podem ser escolhidos dentre os derivados etoxilados de éteres de álcoois graxos e de polióis, e, mais particularmente, os ésteres

etoxilados de ácidos graxos com um hexol, tal como, por exemplo, o sorbitol ou o manitol ou os ésteres etoxilados de ácidos graxos com um anidrido de hexol, como o sorbitano ou o manitano tendo um número de moles de óxido de etileno
5 compreendido entre 5 e 10.

Como ácidos graxos apropriados ao preparo dos corpos graxos modificados descritos acima, há aqueles que comportam em média de 12 a 22 átomos de carbono, tais como, por exemplo, aqueles que comportam de 16 a 18 átomos de carbono,
10 como ácido oléico, o ácido ricinoléico ou o ácido isosteárico e vantajosamente os ácidos graxos líquidos a 20 °C.

De acordo comum aspecto da invenção, quando da etapa b), pelo menos um imunoestimulante escolhido dentre as saponinas, os óleos animais e/ou vegetais e/ou minerais
15 e/ou de síntese, os tensoativos, o hidróxido de alumínio, as lecitinas e os derivados de lecitina são acrescentados.

De acordo com um aspecto particular da invenção, a vacina obtida quando da etapa b) compreende entre 10 % e 20 % do preparado obtido na etapa a) e entre 80 e 90 % de um
20 meio antigênico.

A invenção tem também por objeto uma composição de vacina, compreendendo entre 10 e 20 % de um preparado obtido segundo a etapa a) do processo, tal como descrito anteriormente, e entre 80 e 90 % de um meio antigênico.

25 A composição de vacina tal como descrita acima pode ser utilizada como medicamento preventivo ou curativo. Segundo a natureza do antígeno ou do gerador in vivo, uma composição, de acordo com a invenção, pode ser administrada em peixes, crustáceos, tais como camarões, aves,
30 notadamente, gansos, peruas, pombas e frangos, nos

canídeos, tais como o cão, nos felídeos, tais como o chato, os porcos, os primatas, os bovinos, os ovídeos, os cavalos, em roedores, tais como o rato, os lagomorfos, tais com o coelho, os caprinos, tais como cabras, grandes mamíferos, tais como os elefantes. A composição, de acordo com a invenção, pode ser também administrada no homem.

A administração da composição pode ser feita de maneira clássica por via parenteral, notadamente por injeção subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal. Ela pode também ser feita por via oral, nasal, ocular, por imersão ou por balneação.

A invenção tem enfim por objeto a utilização de um composição adjuvante obtida segundo a etapa a) do processo, tal como descrito anteriormente para o preparo de uma composição de vacina.

As percentagens utilizadas ao longo do pedido representam proporções mássicas.

De maneira muito surpreendente, a comparação das propriedades adjuvantes de dispersões de látex inversas em relação a polímeros de mesma composição química, mas obtidas por síntese em fase solvente seguida de uma precipitação, demonstra efeitos adjuvantes muito superiores tanto na resposta humoral (diagrama 1) quanto celular acompanhada de uma grande inocuidade (diagrama 2).

Os exemplos seguintes ilustram a invenção, sem, todavia, limitá-la.

EXEMPLO 1: Composição adjuvante à base de poliacrilato de sódio obtido em emulsão água no óleo mineral

Utiliza-se um óleo mineral fluido "Marcol t1 52, fornecida por EXXON. A emulsão de polímero obtido após

polimerização se apresenta sob a forma de um gelo oleoso branco e viscoso. Sua composição é de 30 % de óleo mineral (a fase contínua), 5 % de tensoativo destinados a estabilizar a emulsão e 25 % de poliacrilato de sódio e 40 % de água. Ao contato com uma solução antigênica aquosa tamponada com pH 7, a 3 %, a emulsão polímero no óleo se inverte para dar uma dispersão fluida de polímero contendo traços de óleo.

EXEMPLO 2: adjuvante para vacina à base de poliacrilato de sódio obtido por polimerização em emulsão.

Uma dispersão na água contendo 10 % do polímero descrito no exemplo 1 é preparada com uma agitação mecânica suficiente. A regulagem da viscosidade pode ser realizada pelo acréscimo de substâncias ionizadas (sais) inertes (exemplo cloreto de sódio) ou imunoestimulante (exemplo gliconato de manganês). Esse gel, pronto para uso, pode ser redispersado à concentração necessária no meio antigênico considerado, O acréscimo, no gel, de tensoativos suplementares destinados a estabilizar a dispersão do óleo na água pode também ser feita.

EXEMPLO 3: vacina contendo poliacrilato de sódio obtido por polimerização em emulsão

Uma vacina é constituída de 85 % de meio antigênico, no qual são acrescentados 15 % do preparado descrito no exemplo 2, O acréscimo de outros imunoestimulantes como, por exemplo, as saponinas, os óleos animais e/ou vegetais e/ou minerais e/ou de síntese, tensoativos, hidróxido de alumínio, lecitinas e derivados de lecitina é possível.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de preparo de uma vacina, caracterizado por compreender:

- uma etapa a) de preparo de uma composição adjuvante por dispersão em uma solução aquosa fisiologicamente aceitável, de pelo menos um látex inverso ou de um pó de polímero resultante da atomização desse látex inverso;

em que o látex inverso é uma emulsão de água no óleo de polímero, em que o polímero está presente na forma de gotas na fase interna da dita emulsão;

e em que o látex inverso compreende pelo menos um tensoativo de caráter hidrófilo com HLB entre 10 e 15 e pelo menos um polieletrólito aniônico, ramificado ou reticulado, compreendendo um homopolímero do ácido acrílico parcial ou totalmente salificado e compreendendo ainda uma etapa a) (i) de adicionar um ou mais sais orgânicos de cátions metálicos hidro-solúveis;

- uma etapa b), realizada sob agitação, de mistura da composição obtida na etapa a) em um meio antigênico compreendendo um antígeno, em que a etapa b) compreende uma mistura de 10 a 20% de um preparado obtido na etapa a) com 80 a 90 % de um meio antigênico, para formar uma composição de vacina capaz de desencadear uma resposta imune ao antígeno quando da administração à um sujeito;

em que o antígeno está presente na fase aquosa fisiologicamente aceitável;

em que o dito látex inverso é feito em solução tamponada de antígeno.

2. Processo de preparo de uma vacina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de, quando da

etapa a), pelo menos uma substância imunoestimulante é acrescentada.

3. Processo de preparo de uma vacina, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de
5 compreender, ainda, quando da etapa b)

- uma etapa de acréscimo de pelo menos um imunoestimulante escolhido dentre as saponinas, os óleos animais e/ou vegetais e/ou minerais e/ou de síntese, os tensoativos, o hidróxido de alumínio, as lecitinas e os
10 derivados de lecitina.

4. Processo de preparo de uma vacina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o um ou mais sal(is) orgânico(s) de cátion metálico hidrossolúvel compreende(m) gluconato de manganês.

15

Figura 1: Resultados / Comparação imunológica de microgel obtidos em emulsão com poliacrilato obtido em fase de solvente (carbopol® 974)

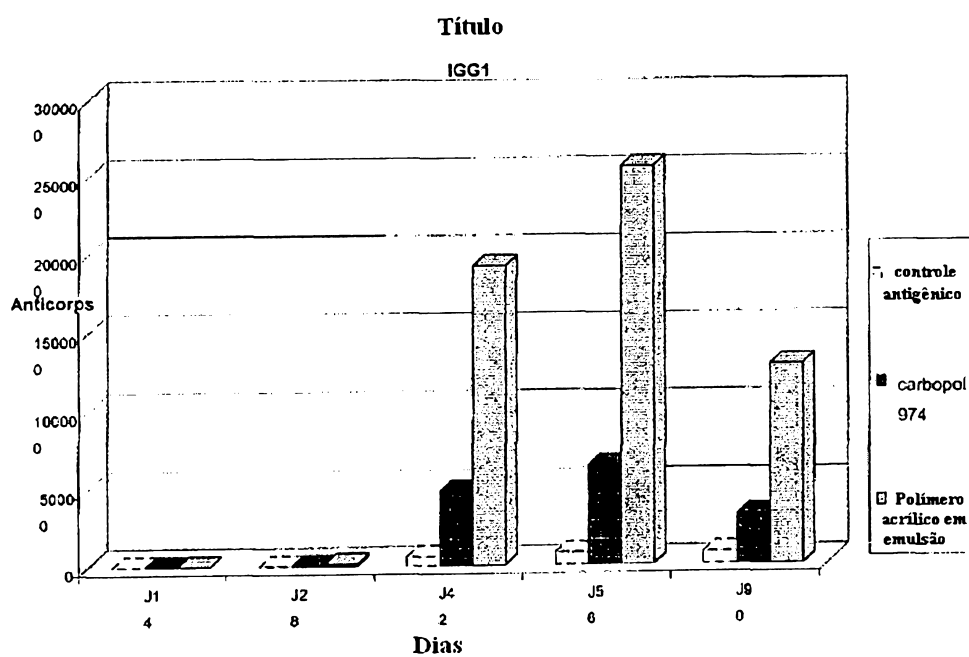


Figura 2:

Resultados / Comparação de inocuidade de microgel obtidos em emulsão com poliácrlato obtido em fase de solvente (carbopol ® 974) / controle positivo de reação local: emulsão W/O

