



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

(21) **PI 1003332-7 A2**

(22) Data de Depósito: 21/09/2010  
(43) Data da Publicação: 08/01/2013  
(RPI 2192)



**(51) Int.Cl.:**  
A61K 9/107  
A61K 39/205  
A61K 35/76  
A61P 43/00

---

**(54) Título:** FORMULAÇÃO DE ADJUVANTES PARA  
IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM VÍRUS RÁBICO

**(73) Titular(es):** Fundação Ezequiel Dias

**(72) Inventor(es):** Armando da Silva Cunha Junior, Patrícia Cota  
Campos, Roberta Márcia Marques dos Santos, Sophie Yvette  
Leclercq, Sílvia Ligório Fialho

**(57) Resumo:** FORMULAÇÃO DE ADJUVANTES PARA  
IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM O VÍRUS RÁBICO. A presente  
invenção diz respeito a formulação farmacêutica adjuvante para  
imunização de animais para produção de soro anti-rábico. A dita  
formulação compreende uma composição adjuvante, do tipo  
microemulsão óleo em água, contendo um óleo metabolizável e  
emulsionantes, aplicável à administração pela via parenteral. A  
formulação adjuvante é capaz de produzir elevados níveis de  
anticorpos e é segura para administração parenteral.

RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO:  
"FORMULAÇÃO DE ADJUVANTES PARA IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM O  
VÍRUS RÁBICO"

A presente invenção diz respeito a formulação  
5 farmacêutica adjuvante capaz de promover efeitos  
imunomodulatórios. Esta invenção diz respeito a formulação  
de microemulsão óleo em água. A raiva constitui uma zoonose  
viral distribuída no mundo inteiro, responsável pela morte  
de 50.000-60.000 pessoas por ano (Warrell M, Warrell D.  
10 Rabies and other lyssavirus diseases. The Lancet, v. 363,  
p. 959-969, 2004). Este cenário, portanto, estimula o  
desenvolvimento de novas modalidades de prevenção e  
tratamento da doença. A dita formulação compreende uma  
composição adjuvante, do tipo microemulsão óleo em água,  
15 contendo um óleo metabolizável e emulsionantes. A  
formulação é aplicável à administração pela via parenteral.

As formulações em questão podem ser utilizadas como  
adjuvantes para outros antígenos, tanto para produção de  
soros quanto para o desenvolvimento de vacinas.

20 De todas as zoonoses conhecidas, a raiva é a mais  
temida, sendo uma doença infecciosa aguda, que leva, em  
todos os casos, à morte após a manifestação dos sintomas  
clínicos. A doença, de etiologia viral (gênero Lyssavirus),  
é caracterizada pelo comprometimento do Sistema Nervoso  
25 Central (SNC) e acomete algumas espécies de mamíferos  
silvestres, domésticos e humano (Warrell M, Warrell D.  
Rabies and other lyssavirus diseases. The Lancet, v. 363,  
p. 959-969, 2004; Hemachudha T, Nacharapluksadee S,  
Laotamatas J, Wilde H. Rabies. Curr Neurol Neurosc Rep.  
30 v.61, p.460-468, 2006). A transmissão do vírus ocorre,  
principalmente, pela deposição de saliva contaminada, na

pele ou mucosas de animais susceptíveis ou humanos, por mordedura, arranhadura ou lambedura. A raiva urbana é caracterizada pela presença da doença em animais domésticos de estimação (cães e gatos) principais transmissores para o homem em países onde a raiva ainda é endêmica. Em outros países, onde o ciclo urbano está sob controle, um novo ciclo envolvendo morcegos, denominado ciclo aéreo, vem sendo responsável pelo aumento de casos de raiva humana.

O tratamento pós-exposição é o mais freqüente e ocorre, geralmente, após acidentes com animais. As recomendações para o tratamento são a desinfecção imediata da ferida combinada com vacinação ou soro-vacinação, dependendo da gravidade do acidente e das características do animal envolvido (Costa W A. - Projeto Diretrizes: Vacina contra a raiva humana. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina- Sociedade Brasileira de Pediatria, 2002.). Uma vez que não existe tratamento específico para a doença após o início do quadro clínico, a neutralização do vírus, antes que atinja as terminações nervosas, é o único meio de prevenção da morte humana (Sellal F, Stoll-Keller F. Rabies: ancient yet contemporary cause of encephalitis. Lancet. V.365, p. 921-3, 2005.). Podem ser empregados dois tipos de preparações de anticorpos anti-rábico na profilaxia pós-exposição. O primeiro é composto de anticorpos humanos (homólogo), purificado do plasma do doador imunizado. Entretanto, estes anticorpos são caros e pouco disponíveis. O segundo é constituído de anticorpos anti-rábico de cavalo (heterólogo) preparado a partir de plasma eqüino hiperimune. A produção de soro anti-rábico depende da indução de um elevado nível de anticorpos específicos pelo

animal imunizado. Uma forma de atingir este objetivo é por meio da utilização de adjuvantes (Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. v.25, p. 3752-62, 2007).

5 O objetivo da utilização de adjuvantes é aumentar a potência da resposta imune de antígenos e eles têm sido utilizados desde a década de 70 com esta finalidade (Choi MJ, Kim JH, Maibach HI. Topical DNA Vaccination with DNA/Lipid Based Complex. Curr Drug Del. v. 3, p.37-45, 10 2006). A capacidade do adjuvante em promover este aumento da resposta imune tem sido explicada pela formação de depósito, o que promove uma liberação lenta do antígeno no local de aplicação ou nas células apresentadoras do antígeno (Horzinek MC, Schijns VECJ, Denis M. General 15 description of vaccines. In: Postoret PP, Blancou J, Vannier P, Verchueren C, editors. Veterinary Vaccinology, 1997:140-52; Bowersock TL, Stephen M. 2000. Controlled release vaccines in veterinary medicine. In: Rathbone MJ, Gurny R, editors. Controlled release veterinary drug 20 delivery: biological and pharmaceutical considerations. Netherlands: Elsevier. p. 269-30).

Diferentes classes de compostos apresentam atividade adjuvante em modelos pré-clínicos como produtos bacterianos, sais minerais, ácidos nucleicos e lipossomas. 25 Entretanto, a grande maioria, mesmo sendo utilizados em animais, apresenta perfil de segurança inaceitável (Canadian Council on Animal Care. Guidelines on Antibody production. 2002; Fiocruz. Manual de utilização de animais. Vice-presidência de desenvolvimento científico e 30 tecnológico - Comissão de ética no uso de animais de experimentação, 2008). Atualmente, tem sido discutido que o

adjuvante de Freund deve ser evitado, mesmo em modelos animais, e diferentes instituições/países têm publicado guias para regulação de seu uso principalmente devido a reações inflamatórias severas que ocorrem no local de aplicação (Canadian Council on Animal Care. Guidelines on Antibody production. 2002; Fiocruz. Manual de utilização de animais. Vice-presidência de desenvolvimento científico e tecnológico - Comissão de ética no uso de animais de experimentação, 2008; Fukunoki S, Iwakura T, Iwaki S, Matsumoto K, Takeda R, Ikeda K, Shi Z, Mori H. Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. Avian Pathol v. 30, p. 509-516, 2001).

Portanto, a presente invenção tem por objetivo a utilização de um adjuvante alternativo aos adjuvantes tradicionais para imunização de equinos para produção de soro rábico. Adicionalmente, esta invenção pode ser empregada como adjuvante para outros soros hiperimunes e também para vacinas.

Atualmente, encontramos disponíveis algumas patentes relacionadas a adjuvantes para imunização.

A patente PI 9607623-2 intitulada "Composição adjuvante de liberação base água e métodos para conferir características de liberação a uma superfície de liberação e para a preparação de uma composição adjuvante de liberação base água" descreve uma composição compreendendo uma emulsão estável de um álcool, um ácido graxo ou óleo, lecitina, um tensoativo solúvel em água ou dispersível em água, e água (Glover D. Composição adjuvante de liberação base água e métodos para conferir características de

liberação a uma superfície de liberação e para a preparação de uma composição adjuvante de liberação base água. Patente PI 9607623-2; 1996).

5 A patente PI 9910269-2A intitulada "Composição adjuvante e métodos para seu uso" descreve uma composição adjuvante do tipo emulsão óleo em água com tamanho de partícula menor que 3µm e combinada com um derivado de lipídio A atenuado para acentuar a adjuvantividade da formulação (Leesman GD. Composição adjuvante e métodos para  
10 seu uso. Patente PI 9910269-2; 2001). A formulação desta patente é composta ainda por um óleo metabolizável, tensoativos, antioxidante e agente osmótico e pode ser empregada como adjuvante para vacina uma vez que estimulou a resposta imune em animais após administração com um  
15 antígeno.

A patente PI 0207698-5 intitulada "Adjuvante para uso em formulação de vacina, vacina, e, uso de um emulsificante polimérico" descreve uma formulação adjuvante para utilização em vacina compreendendo uma emulsão água em óleo  
20 composta por emulsionante polimérico (Jansen TT, Schijns VEJC, Hermkens EE. Adjuvante para uso em formulação de vacina, vacina, e, uso de um emulsificante polimérico. Patente PI 0207698-5; 2002). A dita formulação é estável, possui baixa viscosidade, possui excelente atividade  
25 adjuvante e é bem tolerada.

A patente PI 0400341-1 intitulada "Processo de obtenção de vacina anti-rábica em células BHK-21, purificada, para uso veterinário, e respectiva vacina resultante" descreve uma vacina que utiliza albumina eqüina  
30 como estabilizador e otimizador da resposta imune humoral (Gallina NMF. Processo de obtenção de vacina anti-rábica em

células BHK-21, purificada, para uso veterinário, e respectiva vacina resultante. Patente PI 0400341-1; 2004). A referida vacina anti-rábica é uma suspensão de vírus rábico e se apresenta na forma liofilizada.

5 Patentes que descrevem especificamente a utilização de microemulsões como adjuvantes para imunização de vírus rábico não são descritas.

O termo microemulsão foi introduzido, na década de 40, por Hoar e Schulman (Hoar TP, Schulman JH. Transparent  
10 water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. Nature. v.152, p.102-5, 1943) para definir um sistema fluido e translúcido obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média como o hexanol ou o pentanol. No ponto de  
15 clarificação, não foi necessária a agitação e formou-se, espontaneamente, uma dispersão transparente. Esses pesquisadores observaram, por meio de microscopia eletrônica, que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microglóbulos de óleo em água (O/A) ou água  
20 em óleo (A/O), cercados por um filme interfacial misto de emulsionante e co-emulsionante (álcool). O tamanho dos glóbulos, significativamente menor que o da emulsão simples inicial, variava de 100 a 600 nm, justificando seu aspecto transparente e o termo microemulsão, que foi revisado  
25 muitas vezes. A definição de Danielsson e Lindman (Danielsson I, Lindman B. The definition of microemulsion. Colloids Surface, v. 3, p. 391-395, 1981), que descreve que "as microemulsões são soluções líquidas, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis, compostas de  
30 água, óleo e tensoativo", tem sido a mais aceita. Em uma definição mais ampla, as microemulsões são dispersões de

água e óleo estabilizadas por um emulsionante e por um co-emulsionante. São sistemas transparentes, termodinamicamente estáveis e apresentam partículas de tamanho menor que 1,0  $\mu\text{m}$  (Gasco MR. Microemulsions in the pharmaceutical field: perspectives and applications. In: Solans C; Kunieda H. Industrial applications of microemulsions, Marcel Dekker, New York, 66, cap.5 :97-122, 1997). Elas requerem a adição de quantidades elevadas de emulsionantes para estabilizar a grande área interfacial criada pelos nanoglóbulos e a adição de co-emulsionantes para garantir uma viscosidade adequada (Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. Crit Rev Ther Drug Carr Sys. v. 18, p. 77-140, 2001).

Tais sistemas diferem das emulsões simples por apresentarem tensão interfacial bem menor, já que as moléculas do co-emulsionante se intercalam entre as moléculas do emulsionante na interface óleo-água afetando a curvatura do glóbulo. Essa baixa tensão interfacial promove não só a formação espontânea desses sistemas monofásicos, não havendo necessidade de imposição de uma força externa, como também a formação de glóbulos de tamanho reduzido e a estabilidade termodinâmica do sistema. Já as emulsões simples são dispersões grosseiras bifásicas, turvas ou leitosas, termodinamicamente instáveis e requerem energia externa para sua formação (Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. Crit Rev Ther Drug Carr Sys. v. 16, p. 461-521, 1999).

As microemulsões podem ser de três tipos: O/A, A/O ou bicontínua. Geralmente, as do tipo O/A são formadas na



presença de baixa concentração de fase oleosa, com emulsionantes que apresentam equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) na faixa de 8-18; as do tipo A/O são formadas quando a concentração de fase aquosa é baixa com emulsionantes com EHL na faixa de 3-8; as do tipo bicontínuo se formam quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa são similares, sendo que tanto o óleo quanto a água existem como uma fase contínua na presença de uma interface estabilizada por emulsificante com uma curvatura igual a zero (Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev*, v. 45, p. 89-121, 2000; Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug Carr Sys*. v. 16, p. 461-521, 1999).

O interesse na aplicação das microemulsões como veículos de preparações farmacêuticas se deve à capacidade desses sistemas de solubilizar, ao mesmo tempo, substâncias hidrofílicas e lipofílicas e, também, de melhorar a solubilidade e estabilidade de substâncias ativas. A presença de emulsionantes aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que facilita a absorção da substância (Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Crit Rev Ther Drug Carr Sys*. v. 18, p. 77-140, 2001). Além disso, graças à formação espontânea desses sistemas, fatores como intensidade e duração da agitação, temperatura, tempo de emulsificação, entre outros, podem ser evitados, sendo possível, igualmente, a esterilização por filtração devido à baixa viscosidade por eles apresentada. Esses fatores tornam as microemulsões bastante atrativas do ponto de vista da

produção farmacêutica (Gasco MR. 1997. Microemulsions in the pharmaceutical field: perspectives and applications. In: Solans C; Kunieda H. Industrial applications of microemulsions, Marcel Dekker, New York, 66, cap.5 :97-122).

Na preparação das microemulsões, devem ser construídos diagramas de fase pseudoternários para definir a extensão e a natureza das regiões de formação desses sistemas. Para isso, selecionam-se os constituintes da formulação, que, geralmente, são os seguintes: fase oleosa (óleos vegetais e sintéticos, triglicerídeos, ésteres de ácido graxo); fase aquosa (água, solução de cloreto de sódio, tampões); emulsionantes (iônicos e não-iônicos, lecitina) e co-emulsionantes (álcoois, derivados de glicóis, poligliceróis). Para simplificar a sua construção, assume-se que as microemulsões são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e uma mistura de emulsionantes (emulsionante/co-emulsionante), sendo que cada vértice do diagrama representa um desses componentes. Qualquer combinação dos constituintes pode ser representada como porcentagem no diagrama (Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. Crit Rev Ther Drug Carr Sys. v. 18, p. 77-140, 2001; Tenjarla S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. Crit Rev Ther Drug Carr Sys. v. 16, p. 461-521, 1999). Entretanto, em virtude da complexidade e do longo tempo investido no preparo desses diagramas, o método da titulação com co-emulsionante tem sido comumente utilizado. Nesse método, forma-se uma emulsão inicial de aspecto leitoso pela adição da fase

aquosa, fase oleosa e emulsionante. Esse sistema é então titulado com o co-emulsionante até obtenção da microemulsão, caracterizada pelo aspecto transparente ou translúcido.

5 A caracterização da microestrutura desses sistemas requer técnicas sofisticadas de análise, diferentes das utilizadas rotineiramente (Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems. Adv Drug Del Rev, v. 45, p. 89-121,2000). Algumas  
10 propriedades são obtidas de maneira relativamente simples, utilizando-se medidas de viscosidade, condutividade e tensão superficial. Entretanto, para caracterização da natureza isotrópica, são utilizadas técnicas nem sempre facilmente disponíveis tais como, ressonância magnética  
15 nuclear (RMN), dispersão dinâmica, estática e eletroforética da luz, raio-x e microscopia eletrônica.

Até o momento o estado da arte não descreve claramente, um sistema na forma de microemulsão que permita a utilização como adjuvante, em específico contendo o vírus  
20 rábico. A presente invenção baseia-se na utilização de uma microemulsão do tipo óleo em água compatível com a aplicação parenteral em humanos e animais, podendo conter diferentes antígenos.

Para composição da formulação é utilizado um óleo  
25 metabolizável do tipo éster de cadeia ramificada, um emulsionante do tipo ésteres de sorbitano etoxilado e um co-emulsionante da classe dos glicóis.

Os óleos do tipo éster de cadeia ramificada, como por exemplo, miristato de isopropila, palmitato de octila,  
30 monoestearato de glicerila, oleato de metila, entre outros, possuem origem sintética, podendo ser produzido a partir de

ácido graxo animal ou de origem vegetal e apresentam baixa toxicidade, tendo sido aprovados para utilização humana pelo Food and Drug Administration (FDA) (Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press, 888p., 2009).

Os ésteres de sorbitano etoxilado, também conhecidos como polissorbatos, são emulsionantes do tipo não iônico derivados do sorbitano polietoxilado e ácido oléico. Conforme o tipo de ácido graxo de origem e grau de etoxilação podem ser obtidos produtos com diferentes equilíbrios hidrófilo-lipófilo (EHL). Por apresentarem características não tóxicas e não irritantes, os polissorbatos são amplamente empregados em cosméticos, alimentos e formulações farmacêuticas orais, parenterais e tópicas (Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press, 888p., 2009).

Os compostos orgânicos da classe dos glicóis ou dióis, como etilenoglicol ou propilenoglicol, são amplamente empregados como solventes e co-solventes, conservantes e umectantes em diferentes formulações parenterais e não parenterais. Estes compostos são conhecidos por serem não tóxicos e, provavelmente como consequência de seu metabolismo e excreção, o propilenoglicol é menos tóxico que os outros glicóis e foi aprovado pela FDA para utilização em preparações parenterais (Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: Pharmaceutical Press, 888p., 2009).

A presente invenção é adicionalmente descrita pelos exemplos a seguir:

Exemplo 1 - Preparo do antígeno rábico

Para a produção do antígeno rábico, fibroblastos de rim de hamster (células BHK-21) foram expandidos por cultivo seriado até atingir uma concentração de células  
5 suficiente para a semeadura com superfície de 675 cm<sup>2</sup>. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C até que se obtivesse uma mono-camada de aproximadamente 50% de confluência celular. Foi então realizada uma troca de todo o meio de cultura e o vírus fixo Pasteur (cepa PV) foi  
10 inoculado na cultura com uma multiplicidade de infecção 0,2. Após 48 horas de incubação, a cultura infectada passou a ser incubada a 33°C e o primeiro sobrenadante foi recolhido com 48 horas. Neste momento, adicionou-se meio fresco com 2% de SFB e retomou-se a incubação a 33°C por 48h até o  
15 recolhimento de nova amostra. Os sobrenadantes da cultura infectada foram submetidos à inativação com beta-propiolactona, na concentração final de 1:8.000. A ausência de virulência residual foi verificada através da inoculação da suspensão, por via intracerebral, em camundongos recém-  
20 nascidos (1 a 3 dias) e recém desmamados (21 a 28 dias). Para que os resultados fossem considerados satisfatórios em relação à inativação do vírus, os animais não devem apresentar sintomas clássicos da raiva ou morte durante um período de observação de 21 dias. Para o desenvolvimento  
25 das formulações, foi usada uma suspensão viral com um título inicial de 10<sup>-6</sup> DL50/0,03 ml.

Exemplo 2: Preparo da microemulsão

A microemulsão foi preparada de acordo com o método introduzido na década de 40 por Hoar e Schulman (Hoar TP,  
30 Schulman JH. Transparent water-in-oil dispersions: the

oleopathic hydromicelle. Nature, v. 152, p. 102-105, 1943), denominado titulação com co-emulsionante.

Inicialmente, a suspensão viral contendo o vírus rábico inativado e parte da fase aquosa foram dispersas na fase oleosa (miristato de isopropila). O emulsificante (polissorbato 80) e o restante da fase aquosa foram adicionados e agitados até formação de uma emulsão simples do tipo óleo em água. Em seguida, o co-emulsificante (propilenoglicol) foi adicionado à emulsão simples inicialmente preparada, e agitado até a formação de um sistema transparente.

Uma microemulsão contendo a suspensão com vírus rábico inativado foi obtida e se apresentou macroscopicamente homogênea e transparente. A formulação apresenta a composição descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Composição da microemulsão desenvolvida:

Componente	Porcentagem
Miristato de isopropila	3-10%
Polissorbato 80	25-40%
Fase aquosa contendo a suspensão viral	45-60%
Propilenoglicol	2-7%

Trabalhos descrevendo a utilização de microemulsões como sistemas de transporte de substâncias ativas geralmente contem proteínas ou substâncias purificadas (Haße A, Keipert S. Development and characterization of microemulsions for ocular application. Eur J Pharm Biopharm, v. 43, p. 179-83, 1997; Peltola S, Saarinen-Savolainen P, Kiesvaara J, Suhonen TM, Urtti A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. Int J Pharm, v. 254, p. 99-107, 2003). A confirmação de que fase

aquosa complexa (contendo por exemplo, células e suspensões virais) possa ser incorporada nestes sistemas, sem causar alteração nas suas características ainda não foi muito bem descrito. A formulação desenvolvida na presente invenção

5 apresenta fase aquosa contendo proteínas residuais e lipídios de células, e a mesma pôde ser incorporada na microemulsão proposta sem a perda das características e estabilidade do sistema.

Exemplo 3: Caracterização da microemulsão desenvolvida

10 a) determinação de pH

O pH da microemulsão desenvolvida foi determinado utilizando o pHmetro Q-400 MT (Quimis, Brazil). Para análise, a formulação foi previamente dispersa em água ultrapura para obtenção de uma concentração entre 8% e 12%.

15 As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura constante de 25°C e os valores são descritos como a média  $\pm$  desvio padrão.

O valor de pH obtido para a microemulsão foi de 6,5-8,0  $\pm$  0,21. A faixa de pH aceitável para administração

20 intravenosa e intramuscular é de 2-12, enquanto para administração subcutânea a faixa é reduzida para 2,7-9,0 uma vez que a taxa de diluição *in vivo* por esta via é significativamente reduzida o que pode resultar em maior possibilidade de ocorrência de irritação no local de

25 injeção (Jain J, Fernandes C, Patravale V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. AAPS Pharm Sci Tech, v. 11(2), p. 826-31, 2010). O pH da formulação desenvolvida se encontrou dentro da faixa aceitável para administração subcutânea, de forma

30 que a mesma não apresenta potencial de causar irritação no local de aplicação.

b) Determinação do diâmetro dos glóbulos

A determinação do diâmetro médio dos glóbulos da microemulsão foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons por meio do equipamento nanosizer Coulter N4 (Coulter Electronics, USA) sem necessidade de tratamento prévio da formulação. As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura constante de 25°C e os valores são descritos como a média  $\pm$  desvio padrão.

A microemulsão apresentou diâmetro médio dos glóbulos de 18,00-40,00  $\pm$  4,26 nm. O diâmetro reduzido dos glóbulos da microemulsão era esperado pois as moléculas do co-emulsionante penetram no filme do emulsionante reduzindo a fluidez e a viscosidade superficial do filme interfacial, diminuindo o raio de curvatura dos microglóbulos e formando sistemas transparentes (Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev, v. 45, p. 89-121, 2000).

c) Determinação da viscosidade

A viscosidade dinâmica da microemulsão desenvolvida foi medida utilizando o viscosímetro rotacional (Brookfield LVF, Brookfield Engineering Laboratory, USA) ajustado na velocidade de 60rpm. As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura constante de 25°C e os valores são descritos como a média  $\pm$  desvio padrão.

A microemulsão desenvolvida apresentou viscosidade de 0,1-0,6  $\pm$  0,09 Pa.s. A baixa viscosidade da formulação desenvolvida era esperada devido ao reduzido diâmetro médio dos glóbulos. O valor de viscosidade obtido permite filtração esterilizante e também a dispensação como forma farmacêutica injetável.



d) Determinação do índice de refração

Visando avaliar a transparência do sistema e confirmar sua formação, o índice de refração da microemulsão foi determinado utilizando o refratômetro Nr 128596 (Zeiss Opton, Alemanha) sem necessidade de tratamento prévio da formulação. As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura constante de 25°C e os valores são descritos como a média  $\pm$  desvio padrão.

O índice de refração de 1,2-1,6  $\pm$  0,34 obtido para a microemulsão desenvolvida foi próximo ao da água que, de acordo com a literatura (The Merck Index. Budavari S, et al. eds. USA: Merck & Co., Inc., 1996) é de 1,33, confirmando a transparência do sistema.

e) determinação da condutividade

Para determinar se o tipo de microemulsão formada é água em óleo ou óleo em água, a condutividade foi determinada utilizando o condutivímetro DM-31 (Digimed, Brasil). As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura constante de 25°C e os valores são descritos como a média  $\pm$  desvio padrão.

De acordo com o resultado das medidas de condutividade (4,0-8,0  $\mu$ S/cm) o tipo de microemulsão formada foi confirmado, neste caso um sistema óleo em água.

Exemplo 4: Avaliação da resposta imune humoral após imunização em camundongos

Animais: Camundongos da raça *Swiss Webster*, pesando entre 11 e 14 gramas foram utilizados. Durante todo o período do estudo os animais foram mantidos no biotério da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil. Eles foram mantidos em ambiente calmo e climatizado com acesso livre a ração e água.

Camundongos (n=8) foram imunizados pela via subcutânea com 100  $\mu$ l da microemulsão, dos adjuvantes tradicionais (adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio) e da suspensão viral em solução salina sem adjuvante quatro vezes com 5 intervalos de duas semanas. Anteriormente à cada imunização, foi feita uma sangria pela veia caudal para análise da resposta de anticorpo. Um grupo controle recebeu 100  $\mu$ l de PBS estéril no mesmo esquema de imunização.

Os soros de camundongos, imunizados com o vírus da 10 raiva inativado, foram analisados pelo método de ELISA conforme descrito a seguir. As placas para microtitulação foram sensibilizadas por incubação durante a noite a 4°C com o vírus da raiva inativado na concentração de 2,5  $\mu$ g/ml diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6. No 15 dia seguinte, as placas foram lavadas com solução contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de tween 20 pH 7,2 (solução de lavagem) e bloqueadas com 1% de leite em pó desnatado diluído em PBS 0,1 M pH 7,2 durante uma hora a 37°C. Após a lavagem, os soros de camundongos foram adicionados na 20 diluição de 1/25 e as placas foram incubadas novamente por uma hora a 37°C. Após novas lavagens, adicionou-se o conjugado proteína A ligado a peroxidase na diluição 1/10000 conforme recomendação do fabricante. Após uma hora de incubação a 37°C e lavagem das placas, o substrato 25 enzimático (OPD -OrthoPhenilDiamino-, peróxido de hidrogênio e tampão citrato) foi adicionado e as placas incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1/20 e as placas foram lidas em leitor de ELISA 30 com filtro de 492nm.

Os dados, expressos como a absorvância média, dos grupos que receberam a microemulsão, adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio e solução salina contendo o vírus rábico mostraram que a microemulsão e o adjuvante de Freund  
5 induziram maiores títulos de anticorpos quando comparado ao vírus rábico sem adjuvante ( $p < 0,05$ ). A microemulsão apresentou 0,711 de absorvância e o adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio e vírus em solução salina apresentaram absorvância de 0,793, 0,556 e 0,335,  
10 respectivamente.

Exemplo 6: Teste de potência *in vivo*

Camundongos Swiss webster foram divididos em grupos de 8 animais. Quatros grupos receberam, como controle de morte, o vírus fixo desafio, cepa CVS (Challenge Vírus  
15 Standard), com título aproximado de  $10^{-7}$  DL50/0,03ml. Foram realizadas diluições seriadas do vírus CVS em PBS 0,1M, pH 7,2 e injetadas nos camundongos, por via intracerebral, 0,03 ml das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , respectivamente. Outros grupos receberam 100 DL50 do vírus  
20 CVS previamente incubado durante uma hora e trinta minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , com várias diluições (1/1000, 1/2000, 1/4000 e 1/8000) do pool de soro dos camundongos imunizados com as várias formulações. Os animais foram observados durante 14 dias com relação aos sintomas e óbitos decorrentes da  
25 raiva. A dose efetiva que protege 50% dos animais (DE50) foi determinada utilizando o programa CombiStats. Os resultados demonstraram que a microemulsão, quando usada com o antígeno rábico em camundongos, induziu uma maior potência do plasma comparado ao adjuvante de Freund e ao  
30 hidróxido de alumínio. A DE50 foi de 1/1242 para a

microemulsão e inferior a 1/1000 para os adjuvantes tradicionais.

Em um segundo experimento, visando determinar a DE50 para os adjuvantes tradicionais, grupos de 8 camundongos receberam 100 DL50 do vírus CVS previamente incubado com diluições do soro inferiores as previamente testadas (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320), segundo o mesmo protocolo descrito acima. O resultado mostrou que a DE50 obtida para os grupos que receberam adjuvante de Freund e hidróxido de alumínio foi de 6 (1/200) e 18 (1/66) vezes inferior a microemulsão, respectivamente.

#### Exemplo 7: Análise de toxicidade

Para análise de toxicidade, camundongos Swiss Webster (n=3) foram utilizados. Cada animal recebeu injeção subcutânea de 100 $\mu$ l de cada formulação, 4 vezes com duas semanas de intervalo entre elas. Após um mês de descanso, os animais receberam mais duas injeções com duas semanas de intervalo entre elas. Duas semanas após a última imunização, os camundongos foram sacrificados e os órgãos removidos. Fragmentos de pele (subcutâneo e outros), baço, pulmão, rim, fígado e coração foram fixados em tampão fosfato com formalina 10% e processados pela técnica de impregnação em parafina. Cortes histológicos (4 $\mu$ m) foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e observadas em microscópio óptico com aumento de 25 X e 100 X. Os resultados mostraram que nenhuma das formulações induziu efeitos sistêmicos. No entanto, quando analisada a pele no local de injeção, o grupo imunizado com o adjuvante de Freund apresentou uma hipoderme com infiltrado inflamatório misto intenso, constituído de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos quando comparado ao grupo controle imunizado

com o antígeno rábico sem adjuvante. Em contraste, o grupo imunizado com microemulsão não mostrou nenhuma alteração significativa comprovando a sua ausência de toxicidade.

## REIVINDICAÇÕES:

1. Formulação de adjuvante contendo antígeno para imunização
2. Formulação de adjuvante como descrito na reivindicação 1 contendo antígeno para imunização, em que o antígeno compreende o vírus rábico inativado.
3. Formulação de adjuvante como descrito na reivindicação 1 contendo antígeno para imunização na forma de microemulsão óleo em água.
4. Formulação de adjuvante como descrito na reivindicação 1 contendo antígeno para imunização de administração que pode ser administrada pela via parenteral.
5. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 1 contendo antígeno para imunização, em que tal formulação consiste de um óleo metabolizável e emulsionante, tais como miristato de isopropila e polissorbato 80, respectivamente.
6. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 5 contendo antígeno para imunização com pH de  $7,72 \pm 0,21$ .
7. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 5 contendo antígeno para imunização com diâmetro médio dos glóbulos de  $22.40 \pm 4.26$  nm.
8. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 5 contendo antígeno para imunização com viscosidade de  $0,15 \pm 0,09$  Pa.s.
9. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 5 contendo antígeno para imunização com índice de refração de  $1,39 \pm 0,34$ .
10. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação 5 contendo antígeno para imunização com condutividade de  $4,487 \mu\text{s/cm}$

11. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação  
5 contendo antígeno que apresenta elevados títulos de  
anticorpos após imunização de camundongos com o vírus  
rábico.
- 5 12. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação  
5 contendo antígeno que apresenta potência *in vivo* superior  
aos adjuvantes tradicionais.
13. Formulação farmacêutica como descrito na reivindicação  
5 contendo antígeno que não apresenta evidências de  
10 toxicidade, avaliada por histopatologia.

RESUMO DA PATENTE DE INVENÇÃO:

"FORMULAÇÃO DE ADJUVANTES PARA IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS  
COM O VÍRUS RÁBICO"

A presente invenção diz respeito a formulação  
5 farmacêutica adjuvante para imunização de animais para  
produção de soro anti-rábico. A dita formulação compreende  
uma composição adjuvante, do tipo microemulsão óleo em  
água, contendo um óleo metabolizável e emulsionantes,  
aplicável à administração pela via parenteral. A formulação  
10 adjuvante é capaz de produzir elevados níveis de anticorpos  
e é segura para administração parenteral.