

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO FORMULACIONES UNEDOSAS
QUE ESTABILIZAN UNA COMPOSICION
DE PROTEINA DE N. MENINGITIDIS
2086

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE WYETH.

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS.

74. APODERADO ALVARO GORREA.

22. BOGOTÁ, D.C., 13 DE JULIO 2015.



No. 08-125423-A-00009-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:11 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6



No. 15-163062-00000-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

**DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN**

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

WYETH

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940	Madison
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com		6341500

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Correa Ordoñez, Alvaro

79.143.366

20.281

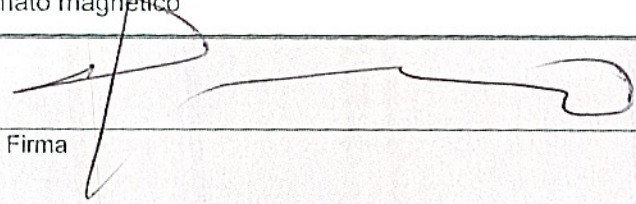
Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
AV. 82 No. 10 62 Piso 6		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente <u>08.125.423A</u> De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____
5. Comprobante de Pago No <u>15-0055544</u> Fecha <u>19 / 05 / 2015</u>		
6. Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud ☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético		
7. Firma		
Nombre y apellidos	 Firma	
C.C	Tarjeta Profesional	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

2015/063

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0055544

Bogotá D.C., Mayo 19 de 2015 - 16:38:02

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	673666383	14/05/2015	112.425.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCERTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIEDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125423-A-00009-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:11 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-163062-00000-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 19 de 2015 - 16:38:41

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0077560

Bogotá D.C., Julio 13 de 2015 - 08:17:21

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	14845	05/02/2015	119.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	14964	05/02/2015	10.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	130533	09/12/2014	31.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	160.000.00
			\$160.000.00

SON: **CIENTO SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125423-A-00009-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:11 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act 851 DIVISIONAL Folios 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7



No. 15-163062-00000-0000

Fecha 2015-07-14 16:01:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios 6

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 13 de 2015 - 08:17:22

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>5</u>
--	---------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DELG. PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código: 2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código: 2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA		
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:
Expediente: 08-125423-A - 09 15-163062 - 0	Solicitante / <i>Quejoso / Demandante / otros.</i>	
Prueba excluida: <u>CD</u>		
Nº. de Pruebas excluidas: <u>1</u>		
Fecha de emisión de la Prueba:		
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO		
Nº. de bloque:		Otras especificaciones:
Nº. de rodante:		
Nº. de estante:		
Nº. de archivador:		
Nº. de entrepaño:		
Nº. de gaveta:		
Nº. de caja:		
IMPORTANTE: - El material gráfico <i>o especial</i> que se encuentra <i>dentro o anexo a</i> las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.		
Observaciones: <u>El CD contiene</u> <u>4 archivos en formato PDF</u> <u>procesados y cargados al</u> <u>sistema.</u> <u>Andrés</u>		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro



No. 08-125423-A-00009-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:11 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

6


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

A



No. 15-163062-00000-0000

Fecha: 2015-07-14 16:01:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN UNA COMPOSICIÓN DE
PROTEÍNA DE N. MENINGITIDIS 2086

Resumen

La presente invención trata de la necesidad existente en el arte de mejorar la estabilidad de composiciones inmunogénicas tales como conjugados de polisacárido-proteína e inmunógenos de proteína. La invención trata ampliamente de formulaciones novedosas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la invención descrita en lo sucesivo, trata de la necesidad en la técnica de formulaciones que estabilicen e inhiban la formación particulado (verbigracia, agregación, precipitación) de composiciones inmunogénicas que son procesadas, desarrolladas, formuladas, manufacturadas y/o almacenadas en recipientes tales como fermentadores, biorreactores, frascos, contenedores, bolsas, jeringas, tapones de caucho, tubería y similares.

FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN
LA PRECIPITACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

Campo de la invención

La presente invención trata generalmente de campos de la inmunología, bacteriología, formulación de vacunas, estabilidad de proteínas y desarrollo de procesos. Más particularmente, la invención trata de formulaciones novedosas que inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas.

Antecedentes de la invención

Por lo general se acepta en el arte biofarmacéutico que la mejora de la estabilidad de una composición inmunogénica (verbigracia, un inmunógeno de proteína, un conjugado de polisacárido-proteína) es un objetivo necesario y altamente deseable. Por ejemplo, una composición inmunogénica deberá parecer fresca, elegante y profesional al administrarse a un paciente. Cualesquiera cambios en la estabilidad y/o apariencia física de la composición inmunogénica, tal como cambio de color, turbidez, opacifidad, podrá hacer que el paciente o consumidor pierdan confianza en el producto. Además, debido a que muchas formulaciones inmunogénicas son surtidas en recipientes de dosis múltiples, deberá asegurarse con el tiempo, la uniformidad del contenido de la dosis del ingrediente activo (verbigracia, un conjugado de polisacárido-proteína) (verbigracia, una

solución turbia puede conllevar a un patrón de dosificación desuniforme). Adicionalmente, la composición inmunogénica deberá ser activa durante toda su vida en almacenamiento "esperada", donde cualquier desintegración de la composición inmunogénica hacia una forma inactiva u otra deseada (verbigracia, un agregado) baja la concentración total del producto.

Varios informes en la literatura han sugerido que la estabilidad de una composición inmunogénica particular (verbigracia, un inmunógeno de proteína, un conjugado de polisacárido-proteína) depende por lo menos en parte de la proteína específica o proteína transportadora (Ho y colaboradores, 2001; Ho y colaboradores, 2002; Bolgiano y colaboradores, 2001). Por ejemplo, el análisis de estabilidad de polisacáridos de meningococo C (MenC) y polisacáridos del tipo b (Hib) *Haemophilus influenzae*, conjugados o bien con un toxoide del tétano (TT) o una proteína transportadora CRM₁₉₇, reveló diferentes perfiles de estabilidad dependientes de la proteína transportadora (Ho y colaboradores, 2002). En otro estudio (Ho y colaboradores, 2001), se analizaron los conjugados MenC-CRM₁₉₇ provenientes de dos fabricantes diferentes (Ho y colaboradores, 2001), donde los conjugados MenC-CRM₁₉₇ difirieron en su química de conjugación y longitud del polisacárido conjugado (ambos teniendo la misma proteína transportadora, CRM₁₉₇). Los datos de este estudio indicaron además que factores tales

como la química de la conjugación (verbigracia, aminación reductora o bien directamente o por medio de un grupo separador químico), número de sitios de conjugación, longitud de la cadena de polisacárido, pH, tampón del almacenamiento, temperatura(s) del almacenamiento y ciclos de congelamiento/descongelamiento también influyen en la estabilidad de una composición inmunogénica.

De este modo, cuando se desarrolla una formulación para una composición inmunogénica, muchos factores deberán ser considerados para asegurar un producto seguro, estable, robusto y efectivo en cuanto a costo. Tales consideraciones incluyen, pero sin limitación, estabilidad química de la composición inmunogénica (verbigracia, hidrólisis de sacáridos, despolimerización de polisacáridos, proteólisis o fragmentación de proteínas), estabilidad física/térmica de la composición inmunogénica (verbigracia, agregación, precipitación, absorción), compatibilidad de la composición inmunogénica con el sistema de recipiente/cierre, interacciones entre la composición inmunogénica e ingredientes activos (verbigracia, tampones, sales, excipientes, crioprotectores), el proceso de fabricación, la forma de dosificación (verbigracia, liofilizada, líquida), las condiciones ambientales encontradas durante el envío, almacenamiento y manejo (verbigracia, temperatura, humedad, esfuerzos cortantes) y la duración de tiempo entre la manufactura y el uso.

Se ha sugerido en el arte que el aceite de silicona, el cual induce cambios conformacionales secundarios y terciarios de la proteína, podría ser responsable de la agregación/precipitación vista en ciertas preparaciones farmacéuticas de proteínas (Jones y colaboradores, 2005). Por ejemplo, varios informes en la década de 1980 implicaron la liberación del aceite de silicona a partir de jeringas plásticas desechables como el agente causante en la agregación de la insulina humana (Chantelau y Berger, 1985); Chantelau y colaboradores, 1986; Chantelau, 1989; Bernstein, 1987; Baldwin, 1988; Collier y Dawson, 1985). Chantelau y colaboradores (1986) observaron que después de tres o más retiros de una preparación de diez dosis de insulina (utilizando jeringa desechable siliconada), el frasco comenzaría a volverse turbio debido a la contaminación del aceite de silicona, resultando así en la agregación y desactivación de la insulina (Chantelau y colaboradores, 1986). Paradójicamente, el aceite de silicona es un componente necesario de las jeringas plásticas, ya que sirve para lubricar el émbolo de caucho y facilitar la transferencia del émbolo bajando por el tambor de la jeringa (es decir, el aceite de silicona mejora la jeringabilidad de la formulación).

Además, el uso de aceite de silicona no está limitado a jeringas en vista de que se utiliza como revestimiento para frascos de vidrio con el fin de minimizar la absor-

ción de proteína, como lubricante para evitar la conglomeración de tapones de caucho durante los procedimientos de llenado, como lubricante crítico para la procesabilidad/maquinabilidad de cierres de vidrio y elastoméricos y como lubricante para facilitar la penetración de la aguja de los tapones de caucho para frascos. Adicionalmente, la siliconación de jeringas, frascos de vidrio, tapones de caucho y similares, no es un proceso bien controlado o estandarizado y como tal, existe un elevado grado de variabilidad del contenido de aceite de silicona de un lote a otro.

Por consiguiente, existe una necesidad actual en el arte de formulaciones que mejoren la estabilidad e inhiban la precipitación de composiciones inmunogénicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención trata ampliamente de formulaciones novedosas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas. Más específicamente en ciertas modalidades, la presente invención trata de formulaciones novedosas que inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas comprendidas en recipientes. En una modalidad específica, la invención trata de formulaciones novedosas que estabilizan composiciones inmunogénicas contra interacciones del aceite de silicona, esfuerzos cortantes, agitación del envío y similares.

De este modo, en ciertas modalidades, la invención

trata de formulaciones que estabilizan un conjugado de polisacárido-proteína, la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, (ii) un surfactante y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína. En una modalidad específica la formulación de conjugado de polisacárido-proteína está comprendida en un recipiente. En ciertas modalidades, el recipiente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma desechable. En ciertas modalidades, el recipiente es siliconado.

En ciertas modalidades, la solución salina tamponada de pH de las formulaciones tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato. En ciertas modalidades, el tampón es succinato a una concentración definitiva de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0. En una modalidad particular, la concentración final del tampón de succinato es 5 mM. En otras modalidades, la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos. En una modalidad particular, la sal de la solución salina tamponada de pH

es cloruro de sodio.

En otra modalidad, el surfactante de las formulaciones se selecciona a partir del grupo que consiste en polisorbato 20 (TweenTM20), polisorbato 40 (TweenTM40), polisorbato 60 (TweenTM60), polisorbato 65 (TweenTM65), polisorbato 80 (TweenTM80), polisorbato 85 (TweenTM85), TritonTM N-101, TritonTM X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, trietanolamina polipéptido oleato, polioxietileno-660 hidroxistearato (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor ELTM), lecitina de soya y un poloxámero. En una modalidad particular, el surfactante es polisorbato 80. En otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es por lo menos el 0,01% al 10% polisorbato 80 peso /volumen de la formulación. En otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,01% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,05% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,1% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En ciertas otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 1,0% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 10,0% po-

lisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

En otra modalidad, el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococo. En ciertas modalidades, el uno o más polisacáridos de neumococo son un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae*. En ciertas modalidades, la proteína de la formulación del conjugado de polisacárido-proteína se selecciona del grupo que consiste en CRM₁₉₇, un toxoide del tétano, un toxoide del cólera, un toxoide de la tos ferina, un toxoide lábil al calor *E. coli* (LT), un toxoide de neumolisina, una proteína superficial de neumococo A (PspA), proteína de adhesina del neumococo A (PsaA), peptidasa C5a de estreptococo, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y derivado proteico purificado de tuberculina (PPD).

En una modalidad específica, la formulación del con-

jugado de polisacárido-proteína de valencia 7 (7vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇ y un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

En otra modalidad específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es un conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido

serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇.

En otras modalidades, la formulación comprende además uno o más polisacáridos de meningococo, una o más proteínas antigénicas de meningococo o una combinación de las mismas. Todavía en otras modalidades, la formulación comprende además uno o más polisacáridos, una o más proteínas antigénicas de estreptococo o una combinación de las mismas.

En ciertas otras modalidades, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se describen ejemplos de adyuvantes adecuados.

En otras modalidades, la invención trata de formulaciones que estabilizan una composición de peptidasa C5a de estreptococo (SCP), la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 6,5, (ii) un surfactante y (iii) una peptidasa C5a de estreptococo. En una modalidad específica, una formulación de SCP va comprendida en un recipiente. En ciertas modalidades, el recipiente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de

vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma desechable.

En otras modalidades, la solución salina tamponada de pH de la formulación tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón es succinato, histidina, fosfato o citrato. En una modalidad específica, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5,8 a 6,0. En otra modalidad específica, la concentración final del tampón de succinato es 5 mM. Todavía en otras modalidades, la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, el surfactante de las formulaciones se selecciona a partir del grupo que consiste en polisorbato 20 (TweenTM20), polisorbato 40 (TweenTM40), polisorbato 60 (TweenTM60), polisorbato 65 (TweenTM65), polisorbato 80 (TweenTM80), polisorbato 85 (TweenTM85), TritonTM N-101, TritonTM X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, trietanolamina polipéptido oleato, polioxietileno-660 hidroxistearato (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-riconoleato (Cremophor ELTM), lecitina de soya y un poloxámero. En una modalidad específica, el surfactante es polisorbato 80. En ciertas modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,01% al

10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,01% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,05% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,1% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 1,0% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 10,0% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

En ciertas otras modalidades, la composición SCP comprende además uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido de estreptococo, un polipéptido de neumococo, un polipéptido de meningococo y un polipéptido de estafilococo. Todavía en otras modalidades, la composición SCP comprende además uno o más polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en un polisacárido de estreptococo, un polisacárido de neumococo, un polisacárido de meningococo y un polisacárido de estafilococo.

En otra modalidad, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se describen ejemplos

de adyuvantes adecuados.

En otra modalidad, la invención trata de formulaciones que inhiben la precipitación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína comprendido en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, (ii) una sal de aluminio, y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína. En ciertas modalidades, el recipiente siliconado se selecciona de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma desechable.

En ciertas modalidades, la solución salina tamponada de pH en las formulaciones tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón de las formulaciones es fosfato, succinato, histidina o citrato. Todavía en otras modalidades, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5,8 a 6,0. En una modalidad particular, la concentración final del tampón de succinato es 5 mM. Todavía en otras modalidades, la sal de la solución salina tamponada con pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de

los mismos. En una modalidad particular, la sal de la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio.

En otras modalidades, la sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio. En una modalidad específica, la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

En ciertas otras modalidades, la formulación comprende además polisorbato 80 (TweenTM80). En una modalidad específica, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es por lo menos el 0,01% al 10% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

En otra modalidad, el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococo. En ciertas modalidades, el uno o más polisacáridos de neumococo son un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae*.

En ciertas otras modalidades, la proteína de la formulación de conjugado de polisacárido-proteína se selec-

cionado a partir del grupo que consiste en CRM₁₉₇, un toxoide del tétano, un toxoide de la tos ferina, un toxoide lábil al calor *E. coli* (LT), un toxoide de neumolisina, proteína superficial de neumococo A (PspA), proteína de adhesina de neumococo (PsaA), una peptidasa C5a proveniente de *Streptococo*, proteína D *Haemophilus influenzae*, ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

En una modalidad particular, la formulación del conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 7 (7vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇ y un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇.

En otra modalidad específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es un conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,

un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇,, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇.

Todavía en otras modificaciones, la formulación comprende además uno o más polisacáridos de meningococo, una o más proteínas antigénicas de meningococo o una combinación de las mismas.

En otra modalidad, la formulación comprende además uno o más polisacáridos de estreptococo, una o más proteínas antigénicas de estreptococo o una combinación de las mismas.

En ciertas otras modalidades, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se descri-

ben ejemplos de adyuvantes adecuados.

En otras modalidades, la presente invención trata de formulaciones que inhiben la precipitación inducida por silicona de una composición de peptidasa C5a de estreptococo (SCP) comprendida en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 6,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) una peptidasa de estreptococo C5a. En ciertas modalidades, se selecciona el recipiente a partir de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma desechable.

En otra modalidad, la solución salina tamponada de pH de la formulación tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón es succinato, histidina, fosfato o citrato. En ciertas modalidades, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM hasta 10 mM y pH 5,8 a 6,0. En otra modalidad, la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

En ciertas otras modalidades, la formulación comprende además polisorbato 80 (TweenTM80). En una modalidad es-

pecífica, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,01% al 10% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

Todavía en otras modalidades, la composición SCP comprende además uno o más polipéptidos seleccionados a partir del grupo que consiste en polipéptido de estreptococo, polipéptido de neumococo, polipéptido de meningococo y polipéptido de estafilococo.

En ciertas otras modalidades, la composición SCP comprende además uno o más polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en un polisacárido de estreptococo, un polisacárido de neumococo, polisacárido de meningococo y un polisacárido de estafilococo.

Todavía en otra modalidad, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se describen ejemplos de adyuvantes adecuados.

En otras modalidades, la invención trata de formulaciones que estabilizan una composición de proteína de *N. meningitidis* 2086, la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 6,5, (ii) un surfactante y (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086. A continuación se describen proteínas de *N. meningitidis* 2086. En una modalidad específica, la formulación de proteína de *N. meningitidis* 2086 va comprendida en un recipiente. En ciertas modalidades, el recipiente se selec-

ciona de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma desechable.

En otras modalidades, la solución salina tamponada de pH tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón es succinato, histidina, fosfato o citrato. En una modalidad específica, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0. En otra modalidad específica, la concentración final del tampón de succinato es 5 mM. Todavía en otras modalidades, la sal de la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, el surfactante de las formulaciones se selecciona a partir del grupo que consiste en polisorbato 20 (TweenTM20), polisorbato 40 (TweenTM40), polisorbato 60 (TweenTM60), polisorbato 65 (TweenTM65), polisorbato 80 (TweenTM80), polisorbato 85 (TweenTM85), TritonTM N-101, TritonTM X-100, octoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, trietanolamina polipéptido oleato, polioxietileno-660 hidroxistearato (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor ELTM), lecitina de soya y un poloxámero. En una modalidad específica, el sur-

factante es polisorbato 80. En ciertas modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 0,01% al 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es el 0,01% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 0,05% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otras modalidades, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 0,1% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. En otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 1,0% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación. Todavía en otra modalidad, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 10,0% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

En ciertas otras modalidades, la composición de proteína *N. meningitidis* 2006 comprende además uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido de estreptococo, un polipéptido de neumococo, un polipéptido de meningococo y un polipéptido de estafilococo. Todavía en otras modalidades, la composición de proteína *N. meningitidis* 2086 comprende además uno o más polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en un polisacárido de estreptococo, un polisacárido de neumococo,

un polisacárido de meningococo y un polisacárido de estafilococo.

Todavía en otra modalidad, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se describen ejemplos de adyuvantes adecuados.

En otras modalidades, la presente invención trata de formulaciones que inhiben la precipitación inducida por silicona de una composición de proteína *N. meningitidis* 2086 comprendida en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 6,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086. En ciertas modalidades, el recipiente se selecciona a partir de uno o más del grupo que consiste en un frasco, tapón de frasco, cierre de frasco, cierre de vidrio, vidrio de caucho, cierre plástico, una jeringa, tapón de jeringa, émbolo de jeringa, un frasco, cubilete, cilindro graduado, fermentador, biorreactor, tubería, tubo, bolsa, jarra, ampolla, cartucho y pluma

Todavía en otra modalidad, la solución salina tamponada de pH de la formulación tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras modalidades, el tampón es succinato, histidina, fosfato o citrato. En ciertas modalidades, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0. En otra modalidad, la sal de la solución salina

tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

En ciertas otras modalidades, la formulación comprende además polisorbato 80 (TweenTM80). En una modalidad específica, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 0,01% al 10% polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

Todavía en otras modalidades, la composición de proteína *N. meningitidis* 2086 comprende además uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido de estreptococo, un polipéptido de neumococo, un polipéptido de meningococo y un polipéptido de estafilococo.

En ciertas otras modalidades, la composición de proteína *N. meningitidis* 2086 comprende además uno o más polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en un polisacárido de estreptococo, un polisacárido de neumococo, un polisacárido de meningococo y un polisacárido de estafilococo.

Todavía en otra modalidad, la formulación comprende además uno o más adyuvantes. A continuación se describen ejemplos de adyuvantes adecuados.

Otras características y ventajas de la invención resultarán aparentes de la siguiente descripción detallada, a partir de sus modalidades y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estabilidad de las formulaciones de peptidasa C5a de estreptococo (SCP) (llenadas en jeringas) antes y después de dos días de agitación suave (60 cpm) en un agitador orbital horizontal. Los datos presentados en la FIG. 1A es la estabilidad de dos días de la SCP formulada sin cualquier TweenTM80 (es decir, el 0%), por cuanto los datos de la FIG. 1B es la estabilidad de dos días de la SCP formulada con el 0,025% TweenTM80. Los tampones usados en las formulaciones mostradas en la FIG. 1A y 1B son salina tamponada de succinato (SBS), salina tamponada de fosfato (PBS) y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

La Figura 2 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en una jeringa BD Hypak, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

La Figura 3 muestra la pérdida de antigenicidad total en el 13vPnC formulado con AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en una jeringa sin siliconar, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

La Figura 4 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en una jeringa Vetter, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

La Figura 5 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en

una jeringa Schott TopPac, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

La Figura 6 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con (FIG. 6A) y sin (FIG. 6B) AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en una jeringa BD Estufada, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

La Figura 7 muestra la antigenicidad total del 13vPnC formulado con (FIG. 7A) y sin (FIG. 7B) AlPO_4 (0,25 mg/ml) y llenado en una jeringa BänderGlas PS2, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8°C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención trata de una necesidad existente en el arte de mejorar la estabilidad de composiciones inmunogénicas tales como conjugados de polisacárido-proteína e inmunógenos de proteína. De este modo, la presente invención trata ampliamente de formulaciones surfactantes novedosas y/o formulaciones de sal de aluminio novedosas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas incluyendo, pero sin limitación, estabilidad química de la composición inmunogénica, estabilidad física/térmica de la composición inmunogénica, compatibilidad de la composición inmunogénica con el sistema de recipiente/cierre, interacciones entre la composición inmunogénica y los ingredientes inactivos (verbigra-

cia, tampones, sales, excipientes, crioprotectores), procesos de manufactura, forma de dosificación, condiciones ambientales encontradas durante el envío, almacenamiento y manejo (verbigracia, temperatura, humedad, esfuerzos corrientes) y el tiempo de duración entre la manufactura y el uso.

La estabilidad de una composición inmunogénica de la invención es fácilmente determinada utilizando técnicas estándares, que son bien conocidas y rutinarias para aquellos que tienen conocimiento en el arte. Por ejemplo, se evalúa una composición inmunogénica con respecto a su estabilidad, agregación, inmunogenicidad, formación de particulado, pérdida de proteína (concentración) y similar, mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, dispersión de luz, densidad óptica, centrifugación de la velocidad de sedimentación, centrifugación del equilibrio de sedimentación, dicroísmo circular (CD), ensayo de Lowry, ensayo con ácido bicinconínico (BCA), aglutinación de anticuerpos y similar.

Conforme se indica detalladamente aquí, la presente invención trata de los resultados inesperados y sorprendentes de que la formulación de una composición inmunogénica con un surfactante tal como TweenTM80 mejora significativamente la estabilidad e inhibe la precipitación de una composición inmunogénica. Por ejemplo, se observó en la presente invención (verbigracia, véanse el Ejemplo 2),

que un conjugado de neumococo de valencia trece (13vPnC) formulado en salina tamponada y llenado en una jeringa de dosis única, comenzaría a precipitarse de la solución dentro de diez minutos a 2-8°C previa agitación suave por medio de un agitador orbital horizontal. (Se utilizó el agitador orbital horizontal para simular condiciones típicas del proceso, envío y almacenamiento de una composición inmunogénica de 13vPnC). Sin embargo, se observó sorprendentemente que el 13vPnC, formulado en salina tamponada y el 0,001% TweenTM80, llenado en una jeringa de dosis única y agitado suavemente a 2-8°C, fue estable durante veinticinco días sin señales visibles de precipitación (datos no mostrados). De este modo, estos datos demostraron que la adición de un surfactante (verbigracia, TweenTM80) a una formulación de composición inmunogénica mejora la estabilidad de la composición inmunogénica.

Un segundo estudio de estabilidad del 13vPnC confirmó adicionalmente que la adición de un surfactante a la formulación mejoró significativamente la estabilidad del 13vPnC. Por ejemplo, se analizó la estabilidad (es decir, ensayada mediante medición del cambio en la antigenicidad del 13vPnC) de una formulación de 13vPnC con el 0,05% TweenTM80 (Tabla 19 y sin TweenTM80 (0,0%, Tabla 1) en un período de dos horas. Conforme se muestra en la Tabla 1, hubo una disminución significativa de la antigenicidad de los 13 polisacáridos serotipos (formulados sin TweenTM80)

dentro del ensayo de dos horas. Bastante dramáticamente, sin embargo, la formulación de 13vPnC que comprende el 0,05% TweenTM80 (Tabla 1) demostró estabilidad robusta durante todo el ensayo de antigenicidad de dos horas. También se observó que el 13vPnC formulado en botellas de vidrio de 250 mL o bien con el 0,01% TweenTM80 ó 0,05% TweenTM80 podía soportar esfuerzos cortantes significativos inducidos por medio de formación de torbellino con las formulaciones durante treinta minutos a 2-8°C con poca o ninguna o pérdida de antigenicidad (verbigracia, véase el Ejemplo 2, Tabla 2).

En otros experimentos (Ejemplo 3), se demostró que la estabilidad de una composición de peptidasa inmunogénica de estreptococo C5a (SCP) se vio enormemente mejorada cuando se formuló con un surfactante tal como TweenTM80. Por ejemplo, conforme se muestra en la FIG. 1A, después de dos días de formación de torbellino con una SCP (55 µg/mL) formulada o bien en 5 mM tampón de succinato (pH 6,0), un tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0) o un tampón Tris 10 mM (pH 7,5), hubo una disminución significativa (verbigracia, superior al 90%) en la concentración de SCP. Sin embargo, conforme se muestra en la FIG. 1B, la adición del 0,025% TweenTM80 a las formulaciones de succinato de SCP, fosfato de SCP y Tris SCP, antes de la formación de torbellino durante dos días, inhibió totalmente la pérdida de SCP que fuera observada en la FIG. 1A.

También podrá formularse una composición inmunogénica de 13vPnC con o sin un adyuvante, tal como fosfato de aluminio (AlPO_4). De este modo, en una serie por separado de experimentos (Ejemplo 4), se formularon composiciones inmunogénicas de 13vPnC en un tampón de succinato 5 mM (pH 5,8), 0,85% NaCl y AlPO_4 (0,25 mg de aluminio/ml), sin la adición de un surfactante (verbigracia, no se incluyó TweenTM80 en la formulación).

En estos experimentos, la composición inmunogénica de 13vPnC (formulada en la presencia de AlPO_4) se llenó en varios recipientes siliconados y no-siliconados (verbigracia, véase la Tabla 3) y se sometieron a condiciones simuladas de envío y manejo por medio de agitación a 2-8°C. Se observó en estos experimentos (Ejemplo 4) que el recipiente con mayor contenido de silicona presentó un mayor grado de formación de particulado del 13vPnC y mayor porcentaje de pérdida de antigenicidad del 13vPnC. Un análisis FTIR de los particulados indicó que los particulados consistieron en proteína y silicona (datos no mostrados) y que aproximadamente el 85% del 13vPnC se aglutina con AlPO_4 , donde el restante 15% quedó como 13vPnC libre (no aglutinado al AlPO_4) en la solución.

En otro experimento comparando las composiciones inmunogénicas de 13vPnC formuladas con y sin AlPO_4 , que fueron luego llenadas en jeringas idénticas, se observó que el 13vPnC formulado sin AlPO_4 sostuvo mayores pérdidas de

antigenicidad que el 13vPnC con AlPO_4 en las jeringas ensayadas (véanse, verbigracia, la FIG. 6 y la FIG. 7).

De este modo, la invención conforme se indica aquí, está dirigida a formulaciones novedosas que estabilizan e inhiben la agregación o precipitación de composiciones inmunogénicas tales como conjugados de polisacárido-proteína (verbigracia, un 13vPnC) e inmunógenos de proteína (verbigracia, peptidasa C5a de estreptococo, una proteína *N. meningitidis* ORF 2086), contra los varios factores que influyen sobre la estabilidad de composiciones inmunogénicas (verbigracia, esfuerzos cortantes, agitación del envío, interacciones con el aceite de silicona, absorción, procesos de manufactura, temperatura, humedad, tiempo entre la manufactura y el uso, etc.)

En ciertas modalidades, la invención trata de una formulación que estabiliza un conjugado de polisacárido-proteína, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 a 7,5, un surfactante y uno o más conjugados de polisacárido-proteína. En otras modalidades, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína va comprendida en recipientes. En otra modalidad, la invención trata de una formulación que estabiliza una composición de estreptococo C5a peptidasa (SCP), la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a

6,5, un surfactante y una peptidasa C5a de estreptococo. En ciertas modalidades, un surfactante y una peptidasa C5a de estreptococo. En otra modalidad, la invención trata de una formulación que estabiliza una composición de proteína *N. meningitidis* 2086, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, un surfactante y una proteína de *N. meningitidis* 2086. En ciertas modalidades, la formulación de meningococo 2086 va comprendida en un recipiente.

En ciertas otras modalidades, la invención trata de una formulación que inhibe la precipitación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína comprendido en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, una sal de aluminio y uno o más conjugados de polisacárido-proteína. En otra modalidad, la invención trata de una formulación que inhibe precipitación inducida por silicona de una composición de estreptococo C5a peptidasa (SCP) comprendida en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 6,5, una sal de aluminio y una peptidasa C5a de estreptococo. En ciertas otras modalidades, la invención trata de una formulación que inhibe la precipita-

ción inducida por silicona de una composición de proteína *N. meningitidis* 2086 comprendida en un recipiente siliconado, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, una sal de aluminio y una proteína de *N. meningitidis* 2086.

Todavía en otras modalidades, la invención trata de una formulación que optimiza la estabilidad de antígeno y el porcentaje de aglutinación con un adyuvante de sal de aluminio (verbigracia, $AlPO_4$) de una proteína de *N. meningitidis* 2086, la formulación comprendiendo una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, un surfactante, una sal de aluminio y una proteína de *N. meningitidis* 2086. En ciertas modalidades, la formulación está en un recipiente.

Conforme se define en lo sucesivo, los términos "precipitación", "precipitado", "formación de particulado", "turbidez" y "agregación" podrán ser utilizados intercambiablemente y tienen por objeto referirse a cualquier interacción física o reacción química que resulte en la "agregación" de un conjugado de polisacárido-proteína o un inmunógeno de proteína (o polipéptido). El proceso de agregación (verbigracia, agregación de proteína) es bien conocido (pero no bien entendido) y descrito en el arte y a menudo es influenciado por numerosas tensiones fisico-

químicas incluyendo el calor, presión, pH, agitación, esfuerzos cortantes, congelamiento-descongelamiento, deshidratación, metales pesados, compuestos fenólicos, aceite de silicona, desnaturalizantes y similares.

Conforme se define en lo sucesivo, un "conjugado de polisacárido-proteína", un "conjugado de neumococo", un "conjugado de neumococo de valencia 7 (7vPnC)", un "conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC)", una "composición inmunogénica de estreptococo C5a peptidasa (SCP)" y una "composición de proteína *N. meningitidis* 2086" de la invención incluye formulaciones líquidas, formulaciones líquidas congeladas y formulaciones sólidas (verbigracia, secadas por congelamiento o liofilizadas).

A. SURFACTANTES

Conforme se indica anteriormente, la invención trata de formulaciones que estabilizan e inhiben la agregación de composiciones inmunogénicas contra los varios factores que influyen la estabilidad de las composiciones inmunogénicas (verbigracia, esfuerzos cortantes, agitación del envío, interacciones del aceite de silicona, absorción, procesos de manufactura, temperatura, humedad, tiempo entre la manufactura y el uso, etc.). En ciertas modalidades, la invención trata de formulaciones que comprenden un surfactante.

Un surfactante (o agente activo en superficie) generalmente se define como (a) una molécula o compuesto que

comprende un grupo o mitad hidrofílico y un grupo o mitad lipofílico (hidrofóbico) y/o (b) una molécula, sustancia o compuesto que baje o reduzca la tensión superficial de una solución. Conforme se define aquí, un "surfactante" d" la presente invención es cualquier molécula o compuesto que baje la tensión superficial de una formulación de composición inmunogénica.

Un surfactante usado en una formulación de la presente invención comprende cualquier surfactante o cualquier combinación de surfactantes que estabilice e inhiba la agregación de una composición inmunogénica descrita aquí. De este modo, un surfactante de la invención incluye, pero sin limitación, polisorbato 20 (TweenTM20), polisorbato 40 (TweenTM40), polisorbato 60 (TweenTM60), polisorbato 65 (TweenTM65), polisorbato 80 (TweenTM80), polisorbato 85 (TweenTM85), TritonTM N-101, TritonTM X-100, octoxinol 40, nonoxinil-9, trietanolamina, trietanolamina polipéptido oleato, polioxetileno-660 hidroxistearato (PEG-15, Solutol H15), polioxetileno-35-ricinoleato (Cremophor ELTM), lecitina de soya, poloxámero, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de octadecil aminoácido, lisolecitina, bromuro de dimetil-dioctadecilaminio, metoxihexadeciglicerol, polioles plurónicos, poliaminas (verbigracia, pirano, dextran-sulfato, poli IC, carbopol), péptidos (verbigracia, péptido de muramilo y dipéptido, dimetilglicina, tuftsina), emulsiones de aceite, geles minerales (verbigracia, fosfa-

to de aluminio) y complejos estimulantes inmunes (ISCOMS).

Una persona versada en el arte podrá determinar fácilmente un surfactante adecuado o combinación de surfactante midiendo la tensión superficial de una formulación de composición inmunogénica particular en la presencia o ausencia del o de los surfactante(es). Alternativamente, se evalúa un surfactante cualitativamente (verbigracia, inspección visual de la formación del particulado) o cuantitativamente (verbigracia, dispersión de luz, centrifugación de la velocidad de sedimentación, densidad óptica, antigenicidad) con respecto a su capacidad para reducir, inhibir o prevenir la agregación de una composición inmunogénica.

B. RECIPIENTES

En ciertas modalidades, la invención trata de formulaciones de composiciones inmunogénicas comprendidas en un recipiente. Conforme se define aquí, "recipiente" de la presente invención incluye cualquier composición que sea utilizada para "contener", "sujetar", "mezclar", "mixturar", "surtir", "inyectar", "transferir", "nebulizar", etc. una composición inmunogénica durante investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, manufactura, almacenamiento y/o administración. Por ejemplo, un recipiente de la presente invención incluye, pero sin limitación, cristalería general de laboratorio, frascos, cubiletes, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos,

tuberías, bolsas, jarras, frascos, cierres de frasco (verbigracia, tapón de caucho, tornillo en la tapa), ampollas, jeringas, tapones de jeringas, émbolos de jeringas, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio y similares. Un recipiente de la presente invención no está limitado por material de fabricación e incluye materiales tales como vidrio, metales (verbigracia, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (verbigracia, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos).

El técnico versado apreciará que la enumeración de recipientes que antecede no es exhaustiva de manera alguna sino que meramente sirve como orientación para el técnico con respecto a la variedad de recipientes que se utilizan para contener, sostener, mixturar, mezclar, surtir, inyectar, transferir, nebulizar, etc. un inmunógeno o composición inmunogénica durante la investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, manufactura, almacenamiento y/o administración de la composición. Los recipientes adicionales contemplados para su uso en la presente invención podrán ser encontrados en catálogos publicados por vendedores y fabricantes de equipos para laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWRTM (West Chester, PA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Fisher Scientific International, Inc. (Hampton, NY) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

De este modo, las formulaciones novedosas de la pre-

sente invención son particularmente ventajosas en que estabilizan e inhiben la precipitación de formulaciones inmunogénicas comprendidas en un recipiente en todas las varias etapas de la investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, manufactura, almacenamiento y/o administración de la composición. Las formulaciones novedosas de la invención no solamente estabilizan las composiciones inmunogénicas contra tensiones físicas/térmicas (verbigracia, temperatura, humedad, esfuerzos cortantes, etc.), sino que también mejoran la estabilidad e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas contra factores o influencias negativas tales como incompatibilidad de la composición inmunogénica con el sistema de recipiente/cierre (verbigracia, un recipiente siliconado).

De este modo, las formulaciones novedosas de la presente invención son particularmente útiles en la estabilización del inmunógeno (es decir, un conjugado de polisacárido-proteína, una o antígeno de polipéptido) contra un antígeno de polipéptido) contra la precipitación inducida por el aceite de silicona y la precipitación descrita anteriormente. Por ejemplo, la Solicitud americana copendiente No. 60/795.098, presentada el 26 de abril de 2006, incorporada específicamente aquí, por referencia, describe la agregación de composiciones inmunogénicas en la presencia de aceite de silicona encontrado en recipientes tales como jeringa, frascos de vidrio, tapones de caucho y simi-

lares, donde la adición de un surfactante al recipiente evitó la agregación inducida por el aceite de silicona de estas composiciones inmunogénicas.

C. ADYUVANTES Y VEHÍCULOS/EXCIPIENTES FARMACÉUTICOS

En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas de la invención son formuladas adicionalmente con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que mejora la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se han demostrado que varias citocinas o linfocinas tienen actividad moduladora inmune y de este modo podrán ser utilizadas como adyuvantes incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, verbigracia, la Patente americana No. 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), las interferonas- α , β y γ , el factor estimulante de la colonia de granulocito-macrófago (GMCSF, véase, verbigracia, la Patente americana No. 5.078.996 y el Número de Acceso ATCC 39900), factor estimulante de colonia de macrófago (MCSF), factor estimulante de colonia de granulocito (GCSF) y los factores de necrosis de tumor α y β (TNF). Todavía otros adyuvantes útiles en la presente invención incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES.

En ciertas modalidades, un adyuvante utilizado para mejorar una respuesta inmune de una formulación de compo-

sición inmunogénica incluye, sin limitación, MPLTM (3-O-lípido de monofosforil desacilado A; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente americana No. 4.912.094, la cual queda incorporada aquí por referencia. Igualmente adecuados para usarse como adyuvantes son los análogos de lípido A sintéticos o compuestos de aminoalquilo glucosamina fosfato (AGP) o sus derivados o análogos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente americana No. 6.113.918, la cual queda incorporada aquí por referencia. Uno de esos AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-β-D-glucopiranosida, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 es formulado como una forma acuosa o una emulsión estable (RC529-SE).

Todavía otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de aluminio (alum), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridine, L121/escualeno, D-láctido-poliláctido/glucosida, polioles plurónicos, dipéptido de muramilo, *Bordetella* destruida, saponinas, tal como StimulonTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descritos en la Patente americana No. 5.057.540, la cual queda incorporada aquí por referencia y partículas generadas de

allí tales como ISCOMS (complejos inmunoestimulantes), ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descritas en la Patente americana No. 5.524.339, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacteriales, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (Patente americana No. 6.207.64, la cual queda incorporada aquí por referencia), IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), descritos en las Patentes europeas Nos. 1.296.713 y 1.326.634, una toxina de tos ferina (PT) o un toxina lábil al calor *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; véase, verbigracia, la Publicación de Patente Internacional Nos. WO 93/13302 y WO 92/19265, incorporadas aquí por referencia.

Igualmente útiles como adyuvantes (y proteínas portadoras) son toxinas del cólera y sus mutantes, incluyendo aquellas descritas en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 00/18434 (donde el ácido glutámico en la posición 29 es reemplazado por otro aminoácido (distinto al ácido aspártico), preferiblemente una histidina). Toxinas CT o mutantes similares se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098368 (donde la isoleucina en el aminoácido posición 16 es reemplazada por otro aminoácido, o bien solo o en combinación con el reemplazo de la serina en la posición 68 mediante otro aminoácido; y/o donde la valina en la posición 72 del aminoácido es reemplazada por otro aminoácido). Otras to-

xinas CT son descritas en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098369 (donde la arginina en la posición 25 del aminoácido es reemplazada por otro aminoácido; y/o se inserta un aminoácido en la posición 49 del aminoácido; y/o se insertan dos aminoácidos en las posiciones 35 y 36 de aminoácido).

En ciertas modalidades, las formulaciones de composición inmunogénica comprenden un diluyente de aceptación farmacéutica, excipiente o un vehículo de aceptación farmacéutica. En una modalidad, el diluyente de aceptación farmacéutica es agua estéril, agua para inyección, salina isotónica estéril o un tampón biológico. Los conjugados de polisacárido-proteína y/o inmunogénicos de proteína se mezclan con esos diluentes o vehículos de forma convencional. Conforme se utiliza aquí, la terminología "vehículo de aceptación farmacéutica" está destinada a incluir todos y cualesquiera disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacteriales y antihongos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración a humanos u otros huéspedes vertebrados. El vehículo apropiado es evidente para aquellos versados en el arte y dependerán en gran parte de la vía de administración.

Por ejemplo, los excipientes que podrán estar presentes en la formulación de la composición inmunogénica son preservativos, estabilizadores químicos y agentes de sus-

pensión o dispersión. Típicamente, los estabilizadores, preservativos y similares son optimizados para determinar la mejor formulación para su eficacia en el recipiente blanco (verbigracia, sujeto humano). Ejemplos de preservativos incluyen clorbutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenes, vanilina de etilo, glicerina, fenol y paraclorfenol. Ejemplos de ingredientes estabilizadores incluyendo ácidos de casamino, sucrosa, gelatina, rojo de fenol, amina N-Z, difosfato de monopotasio, lactosa, hidrolisato de lactalbúmina y leche seca.

En ciertas modalidades, se prepara una formulación de composición inmunogénica para su administración a sujetos humanos en la forma, por ejemplo, de líquidos, polvos, aerosoles, tabletas, cápsulas, tabletas o cápsulas revestidas con entérico o supositorios. De este modo, las formulaciones de composición inmunogénica también podrán incluir, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención no son limitadas por la selección de los vehículos, diluentes y excipientes convencionales y de aceptación farmacéutica tales como disolventes, tampones, adyuvantes u otros ingredientes útiles en las preparaciones

farmacéuticas de los tipos descritos anteriormente. La preparación de estas composiciones de aceptación farmacéutica, a partir de los componentes descritos anteriormente, que tienen isotonicidad de pH, estabilidad y otras características convencionales adecuadas está dentro del conocimiento del arte.

D. INMUNÓGENOS

En ciertas modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende uno o más polisacáridos de neumococo. En otras modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-neumococo de la invención comprende uno o más polisacáridos de estreptococo. Todavía en otras modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende uno o más polisacáridos de meningococo. Todavía en otras modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende una combinación de uno o más polisacáridos de neumococo, uno o más polipéptidos de neumococo, uno o más polisacáridos de estreptococo, uno o más polipéptidos de estreptococo, uno o más polisacáridos de meningococo y/o uno o más polipéptidos de meningococo.

Conforme se define en lo sucesivo, el término "polisacárido" está destinado a incluir cualquier elemento de sacárido antigénico (o unidad antigénica) comúnmente utilizado en las artes de vacunas inmunológicas y bacteriales

incluyendo, pero sin limitación, un "sacárido", un "oligosacárido", un "polisacárido", un "liposacárido", un "lipo-oligosacárido (LOS)", un "lipopolisacárido LPS)", un "glicosilato", un "glicoconjugado" y similares.

En una modalidad en particular de la invención, el uno o más polisacáridos de neumococo son un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae*.

En ciertas modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 7 (7vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇ y un po-

lisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

En ciertas modalidades, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

Los polisacáridos son preparados mediante técnicas estándares conocidas por aquellos versados en el arte. Por ejemplo, los polisacáridos capsulares contemplados en la

presente invención son preparados a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F. y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, donde se desarrolla cada serotipo en un medio basado en soya y los polisacáridos individuales son luego purificados a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía por columna. Igualmente, los polisacáridos de estreptococo (verbigracia, uno o más polisacáridos (u oligosacáridos) provenientes de *Streptococcus* β -hemolítico tal como *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus* del grupo C y *Streptococcus* del grupo G) y los sacáridos de meningococo (verbigracia, oligo-sacárido de *N. meningitidis* (LOS) o lipo-polisacárido (LPS)) son preparados a partir de serotipos o serogrupos clínicamente relevantes, utilizando técnicas y métodos generales conocidos por la persona versado en el arte. Los polisacáridos purificados son luego activados químicamente (verbigracia, por medio de aminación reductora) para hacer los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína transportadora. Una vez activado, el polisacárido capsular es conjugado por separado con una proteína transportadora (verbigracia, CRM₁₉₇) para formar un glicoconjugado (o alternativamente, cada polisacárido capsular se conjuga con la misma proteína transportadora) y se formula en formulación de dosificación única.

La activación química de los polisacáridos y la subsiguiente conjugación con la proteína transportadora (es

decir, un conjugado de polisacárido-proteína) se logran mediante medios convencionales. Véase, por ejemplo, las Patentes americanas 4.673.574 y 4.902.506.

Las proteínas transportadoras son preferiblemente proteínas que son no-tóxicas y no-reactogénicas y obtenibles en suficiente cantidad y pureza. Las proteínas transportadoras deben ser susceptibles de procedimientos de conjugación estándares. En una modalidad particular de la presente invención, se utiliza CRM₁₉₇ como la proteína transportadora.

CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no-tóxica (es decir, toxoide) de la toxina de difteria aislada de los cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium* (β 197) desarrollada en ácidos de casamino y medio basado en extracto de levadura. Se purifica CRM₁₉₇ a través de ultrafiltración, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio de iones. Alternativamente, se prepara CRM₁₉₇ en forma recombinante de conformidad con la Patente americana No. 5.614.382, la cual queda por este medio incorporada por referencia. Otros toxoides de difteria también son adecuados para usarse como proteínas transportadoras.

En otras modalidades, una proteína transportadora de la invención es una peptidasa C5a de estreptococo (SCP) (verbigracia, una o más de las variantes de la SCP descritas en la Patente americana No. 6.951.643, Patente ameri-

cana No. 6.355.255 y la Patente americana No. 6.270.775).

Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacteriales inactivadas tales como toxoide del tétano, toxoide la tos ferina, toxoide del cólera (verbigracia, CT E29H, descrito en la Solicitud de Patente Internacional W02004/083251), LT *E. coli*, ST *E. coli*, y exotoxina A proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse las proteínas de membrana externa bacterial tales como complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas aglutinantes con transferrina, neumolisina, proteína superficial de neumococo A (PsPA), proteína de adhesión a neumococo (PsaA), o proteína D de *Haemophilus influenzae*. También pueden usarse como proteínas transportadoras, otras proteínas tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) o derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína transportadora, los conjugados de polisacárido-proteína son purificados (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/levigación, cromatografía por columna y filtración profunda.

Después de purificarse los glicoconjugados individuales, son transformados en compuestos para formular la com-

posición inmunogénica de la presente invención. La formulación de los conjugados de polisacárido-proteína de la presente invención puede ser lograda utilizando los métodos reconocidos en el arte. Por ejemplo, los 13 conjugados de neumococo individuales con un vehículo de aceptación fisiológica para preparar la composición. Ejemplos de esos vehículos incluyen, pero sin limitación, agua, salina tamponada, polioles (verbigracia, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En otras modalidades, la invención trata de formulaciones que estabilizan una composición inmunogénica de peptidasa C5a de estreptococo (SCP), donde las formulaciones comprenden una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 6,5, un surfactante y una peptidasa de estreptococo C5a. La peptidasa C5a es una proteasa de serina altamente conservada y se expresa en todos los Estreptococos β -hemolíticos (verbigracia, Grupos de estreptococo A, B, C y G). Por ejemplo, la secuencia de nucleótido que codifica una peptidasa C5a de estreptococo (GBS) del Grupo B es el 98% idéntica a la secuencia de nucleótido que codifica una peptidasa C5a de estreptococos del Grupo A. De este modo, en ciertas modalidades de la invención, una composición inmunogénica contra infección causada por Estreptococos β -hemolíticos comprende un inmunógeno (o antígeno) de pepti-

dasa.

En una modalidad particular, una peptidasa C5a de la invención es una peptidasa C5a de estreptococo enzimáticamente inactiva (verbigracia, una o más de las variantes SCP descritas en la Patente americana No. 6.951.653, Patente americana No. 6.355.255 y Patente americana No. 6.270.775, cada una específicamente incorporada aquí por referencia). En otra modalidad específica, la SCP utilizada en las formulaciones novedosas de composición inmunogénica de la invención es clonada a partir de un estreptococo del Grupo B. En otra modalidad, la secuencia de SCP de estreptococos del Grupo B ha sido genéticamente mutada para hacerla proteolíticamente inactiva (verbigracia, véanse las Patentes americanas Nos. 6.951.653; 6.355.255 y 6.270.775) y se expresa como una proteína recombinante en *E. coli*.

En otra modalidad, la invención trata de formulaciones que estabilizan una composición inmunogénica de proteína de *N. meningitidis* 2086, donde las formulaciones comprenden una solución salina tamponada de pH, en la cual el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 7,5, un surfactante y una proteína de *N. meningitidis* 2086. Las proteínas de *N. meningitidis* 2086 son codificadas mediante un marco de lectura abierta de secuencia de ácido nucleico (ORF) identificada como "ORF 2086" (verbigracia, véase la Publicación Internacional No. WO

03/063766 (Solicitud Internacional No. PCT/US02/32369),
Publicación Internacional No. WO 04/094596 A2 (Solicitud
Internacional No. PCT/US04/11901), y Publicación Interna-
cional No. WO 04/065603 A2 (Publicación Internacional No.
PCT/US04/000800), cada una específicamente incorporada
aquí por referencia). En una modalidad adicional, la in-
vención trata de formulaciones que optimizan la estabili-
dad de antígeno y el porcentaje de aglutinación con un ad-
yuvante de sal de aluminio (verbigracia, AlPO_4) de una pro-
teína de *N. meningitidis* 2086, donde las formulaciones
comprenden una solución salina tamponada de pH, en la cual
el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 hasta apro-
ximadamente 7,5, un surfactante, una sal de aluminio y una
proteína de *N. meningitidis* 2086.

Todas las patentes y publicaciones citadas aquí que-
dan por este medio incorporadas por referencia.

E. EJEMPLOS

Se llevan a cabo los siguientes ejemplos utilizando
técnicas estándares, que son bien conocidas y de rutina
para aquellos versados en el arte, salvo los casos que lo
contrario se describen detalladamente. Se presentan los
siguientes ejemplos para fines ilustrativos y no deben ser
interpretados de manera alguna como limitantes del alcance
de la presente invención.

EJEMPLO 1

FORMULACIONES INMUNOGÉNICAS QUE COMPRENDEN EL 0,001%-0,05%

TWEENTM80 ESTABILIZAN Y PREVIENEN LA AGREGACIÓN DEL INMUNÓGENO

El conjugado de polisacárido-proteína utilizado en este ejemplo fue un conjugado de polisacárido de neumococo de valencia trece (13vPnC) que comprende polisacáridos capsulares provenientes de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 18C, 19F, 14, 23F, 1,3, 5, 6A, 7F y 19A, cada uno de ellos conjugado con CRM₁₉₇. Los polisacáridos capsulares fueron preparados mediante técnicas estándares conocidas por aquellos versados en el arte. En resumen, se desarrolló cada serotipo de polisacárido de neumococo en un medio basado en soya, los polisacáridos individuales fueron luego purificados a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía por columna. Los polisacáridos fueron activados químicamente para su conjugación y cada polisacárido fue conjugado separadamente con una proteína transportadora CRM₁₉₇ para formar un glicoconjugado y se formularse en una formulación de dosis única.

La activación química de los polisacáridos y subsiguiente conjugación con la proteína transportadora se lograron a través de medios convencionales (verbigracia, véase las Patentes americanas Nos. 4.673.574 y 4.902.506). CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no-tóxica (es decir, toxoide) de la toxina de difteria aislada de los cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (β197)

desarrollados en ácidos de casamino y medio basado en extracto de levadura. Se purifica CRM₁₉₇ a través de la ultrafiltración, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio de iones.

Los experimentos de antigenicidad descritos a continuación fueron realizados mezclando las muestras de 13vPnC con uno de trece antisueros (ab) específicos para cada uno de los serotipos de polisacárido y detectando los complejos inmunes por medio de mediciones de dispersión de luz en un sistema Array® 360 (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). Las mediciones de dispersión de luz detectadas para cada uno de los trece serotipos fueron luego comparadas con una curva estándar y reportadas como antigenicidad (µg/mL).

Las jeringas (BD Hypak SCF™) y tapones de jeringa (BD Hypak SCF™) fueron comprados en BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Los frascos de borosilicato claros (VWR Trace-Clean™, 40 mL) con cierres forrados con Teflon® fueron comprados en VWR™ (West Chester, PA). El polisorbato 80 (Tween™80) fue comprado en J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc.; Phillipsburg, NJ). La salina tamponada fue succinato (5 mM) y NaCl (0,85%) a pH 5,8.

Se formuló el 13vPnC (500 mL de volumen total) a diferentes concentraciones de surfactante (Tween™80; 0,001%, 0,005%, 0,01% y 0,05%, peso/volumen) de la manera siguien-

te; se añadió el 0,85% salina (150 mM NaCl) a un cubilete de vidrio Pyrex® de un litro, seguida de 50 mM tampón de succinato (concentración final 5 mM) y el 13vPnC. La concentración final de cada conjugado serotipo fue 4,4 µg/mL (salvo para el serotipo 6B, que fue de 8,8 µg/mL). La formulación de 13vPnC fue luego dividida en cinco frascos de vidrio por separado (50 mL por frasco), donde se añadió o bien el 0,0%, 0,001%, 0,005%, 0,01% ó 0,05% TweenTM80 (p/v) a uno de los cinco frascos y cada solución fue filtrada a través de un filtro Ducapor® de 0,22 µm (Millipore; Billerica, MA). En lo subsiguiente, se llenó 0,65 mL de cada solución en una jeringa de vidrio de 3 mL BD HYPACKTM SCFTM con tapones grises w4432 (BD Medical Pharmaceutical Systems; Franklin Lakes, NJ) y se colocaron las jeringas en un agitador orbital horizontal (60 cpm) durante 100 horas de 2°C a 8°C.

Se observó mediante inspección visual (datos no mostrados) que el 13vPnC formulado en la ausencia de TweenTM80 (es decir, el 0,0%) comenzaría a precipitarse de la solución dentro de diez minutos a 2-8°C previa agitación suave por medio de un agitador orbital horizontal. En contraste, el 13vPnC, formulado en el 0,001%, 0,005%, 0,01% ó 0,05% TweenTM80 y agitado suavemente a 2-8°C, resultó estable durante hasta veinticinco días sin señales visibles de precipitación (datos no mostrados). De este modo, estos datos

demonstraron que la adición de un surfactante (verbigracia, TweenTM80) a una formulación de composición inmunogénica mejora la estabilidad de la misma.

Un segundo experimento de estabilidad del 13vPnC confirmó adicionalmente que la adición del surfactante a la formulación mejoró significativamente la estabilidad del 13vPnC. En este experimento, se formuló el 13vPnC con y sin el 0,05% TweenTM80. El 13vPnC formulado sin TweenTM80 (es decir, 0,0%) fue preparado de la manera siguiente: se añadió el 0,85% salina (150 mM NaCl) a un cubilete de vidrio Pyrex® de un litro, seguido de 50 mM tampón de succinato (concentración final 5 mM) y el 13vPnC, a un volumen total de 500 mL. La formulación de 13vPnC con el 0,05% TweenTM80 fue preparada de la manera siguiente: se añadió el 0,85% salina (150 mM NaCl) a un cubilete de vidrio Pyrex® de un litro, seguida de 50 mM tampón de succinato (concentración final 5 mM), el 0,05% TweenTM80 y el 13vPnC, a un volumen total de 500 mL. La concentración final de cada conjugado de serotipo en las formulaciones de 500 mL fue 4,4 µg/mL (salvo el serotipo 6B, que fue 8,8 µg/mL). Las formulaciones de 500 mL fueron homogeneizadas por medio de un homogeneizador de rotor/estator a 6.000 rpm (2-8°C) durante 120 minutos. El proceso de homogeneización creó una interfaz de aire-líquido (con burbujas de aire).

La estabilidad de la formulación de 13vPnC con (Tabla

1) y sin (Tabla 1) el 0,05% TweenTM80 fue analizada en un período de dos horas de la manera siguiente: Se removieron muestras (20-30 mL) a cero, treinta y ciento veinte minutos a partir del 0,0% y 0,05% de las formulaciones de TweenTM80, las muestras fueron diluidas 1:1 en diluyente de proteína (diluyente de proteína Array® 360 (Cat. No. 663630); Beckman Coulter Inc.; Fullerton, CA) y se analizó la antigenicidad de todos los trece serotipos del 13vPnC (véase la Tabla 1) en el sistema de Array® 360.

TABLA 1

**ENSAYO DE ESTABILIDAD DE 13vPnC FORMULADO CON Y SIN
TWEENTM80**

13vPnC sin Tween80

Serotipo	Antigenicidad 0 min	Antigenicidad 30 min	Antigenicidad 120 min
1	4.8 µg/ml	4.2 µg/ml	2.4 µg/ml
3	4.8 µg/ml	4.1 µg/ml	1.7 µg/ml
4	5.8 µg/ml	5.0 µg/ml	3.1 µg/ml
5	3.4 µg/ml	3.0 µg/ml	2.0 µg/ml
6A	4.9 µg/ml	3.8 µg/ml	1.3 µg/ml
6B	10.0 µg/ml	5.6 µg/ml	1.4 µg/ml
7F	4.7 µg/ml	3.4 µg/ml	1.0 µg/ml
9V	5.6 µg/ml	4.7 µg/ml	2.5 µg/ml
14	7.6 µg/ml	6.4 µg/ml	3.0 µg/ml
18C	5.6 µg/ml	4.4 µg/ml	1.7 µg/ml
19A	6.4 µg/ml	4.5 µg/ml	1.9 µg/ml
19F	5.4 µg/ml	2.6 µg/ml	0.0 µg/ml
23F	4.5 µg/ml	2.8 µg/ml	0.9 µg/ml

13vPnC con el 0,05% Tween80

Serotipo	Antigenicidad 0 min	Antigenicidad 30 min	Antigenicidad 120 min
1	5.1 µg/ml	5.0 µg/ml	5.2 µg/ml
3	5.0 µg/ml	5.0 µg/ml	5.2 µg/ml
4	6.1 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
5	3.6 µg/ml	3.6 µg/ml	3.7 µg/ml
6A	5.4 µg/ml	5.4 µg/ml	5.6 µg/ml
6B	10.6 µg/ml	10.6 µg/ml	10.5 µg/ml
7F	5.3 µg/ml	5.2 µg/ml	5.3 µg/ml
9V	6.1 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
14	8.2 µg/ml	8.3 µg/ml	8.3 µg/ml
18C	6.2 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
19A	6.8 µg/ml	6.8 µg/ml	6.8 µg/ml
19F	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml	6.0 µg/ml
23F	5.2 µg/ml	5.2 µg/ml	5.2 µg/ml

La formulación de 13vPnC/TweenTM80 fue ensayada adicionalmente con respecto a la estabilidad con esfuerzos cortantes elevados. En este experimento, se añadió una composición de 100 mL de 13vPnC (4,4 µg/mL serotipos 1, 3,

4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 8,8 µg/mL serotipo 6B, 5 mM tampón de succinato, 150 mM NaCl y 0,25 mg/mL AlPO_4) a tres botellas de vidrio de 250 mL que comprenden o bien el 0,0%, 0,01% o el 0,05% TweenTM80. Las tres botellas fueron luego sometidas a torbellino durante treinta minutos (2-8°C) en un torbellinador (Vortex-Genie® 2; Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) y se creó una interfaz de aire-líquido al ajuste de máxima velocidad. Después de treinta minutos, se tomaron muestras de 10-30 mL de cada botella, diluyeron 1:2 en diluyente de proteína Array® 360 y se analizó la antigenicidad de los trece serotipos en un sistema Array® 360.

Conforme se ve en la Tabla 2 que sigue, el 13vPnC formulado sin TweenTM80 (0,0%) presentó en promedio una disminución del 20% en antigenicidad después de someterse a torbellino. El 13vPnC formulado con el 0,01% TweenTM80 presentó una disminución de antigenicidad que oscila del 2-10% (promedio 8%) y el 13vPnC formulado con el 0,05% TweenTM80 presentó una disminución de antigenicidad que oscila del 0-8% (promedio 3%). De este modo, los datos presentados en la Tabla 2 demuestran que el 13vPnC formulado o bien con el 0,01% ó 0,055 TweenTM80 fueron significativamente estabilizados contra esfuerzos cortantes, con relación al 13vPnC formulado en la ausencia de TweenTM80.

TABLA 2

EFFECTO ESTABILIZADOR DE TWEEN™80 CONTRA ESFUERZOS CORTANTES

Serotipo	Antigenicidad 0,0% tw80	Antigenicidad 0,0% tw80 + torbellino	Antigenicidad 0,01% tw80	Antigenicidad 0,01% tw80 + torbellino	Antigenicidad 0,05% tw80	Antigenicidad 0,05% tw80 + torbellino
1	4.7 µg/mL	3.6 µg/mL	4.8 µg/mL	4.3 µg/mL	4.7 µg/mL	4.6 µg/mL
3	4.6 µg/mL	3.4 µg/mL	4.7 µg/mL	4.2 µg/mL	4.7 µg/mL	4.4 µg/mL
4	5.5 µg/mL	4.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.6 µg/mL
5	3.2 µg/mL	2.5 µg/mL	3.5 µg/mL	3.2 µg/mL	3.3 µg/mL	3.3 µg/mL
6A	4.3 µg/mL	3.6 µg/mL	4.6 µg/mL	4.5 µg/mL	4.7 µg/mL	4.8 µg/mL
6B	9.7 µg/mL	7.7 µg/mL	10.2 µg/mL	9.6 µg/mL	10.2 µg/mL	10.1 µg/mL
7F	4.6 µg/mL	3.5 µg/mL	5.4 µg/mL	5.0 µg/mL	5.4 µg/mL	5.3 µg/mL
9V	5.3 µg/mL	4.1 µg/mL	5.7 µg/mL	5.1 µg/mL	5.6 µg/mL	5.3 µg/mL
14	6.8 µg/mL	5.4 µg/mL	7.3 µg/mL	6.7 µg/mL	7.4 µg/mL	6.8 µg/mL
18C	4.1 µg/mL	3.4 µg/mL	4.5 µg/mL	4.3 µg/mL	4.5 µg/mL	4.5 µg/mL
19A	5.1 µg/mL	4.2 µg/mL	5.5 µg/mL	5.3 µg/mL	5.6 µg/mL	5.4 µg/mL
19F	4.8 µg/mL	3.6 µg/mL	5.2 µg/mL	4.9 µg/mL	5.2 µg/mL	5.1 µg/mL
23F	3.0 µg/mL	2.4 µg/mL	3.4 µg/mL	3.3 µg/mL	3.5 µg/mL	3.4 µg/mL

EJEMPLO 2

FORMULACIONES QUE COMPRENDEN SURFACTANTE ESTABILIZAN Y PREVIENEN LA AGREGACIÓN DE PEPTIDASA C5A DE ESTREPTOCOCO

La peptidasa C5a de estreptococo (SCP) utilizada en este ejemplo fue expresada y purificada de la manera siguiente. Se expresó la SCP recombinantemente en *E. coli* utilizando un sistema inducible de arabinosa. Se siguieron los protocolos estándares de fermentación para *E. coli* utilizando medio definido libre de animal y subsiguiente lisis celular. Se purificó la SCP recombinante a partir de la fracción soluble del lisato celular mediante saturación hasta el 60% (aproximadamente 3 M) de sulfato de amonio

mientras se agita durante 12-24 horas. El lisato saturado fue centrifugado, el supernatante retenido y cargado en una columna de interacción hidrofóbica de Se-pharosa fenilo. Luego se levigó el material aglutinado con 1 M sulfato de amonio, 20mM Tris-Cl, pH 7,5, concentró y diafiltró contra PBS, pH 7,4. La SCP recombinante purificado (rSCP) fue diluida hasta ~10 mg/mL con PBS, pH 7,4 y pasada a través de un filtro Posidyne para remover la endotoxina, seguido de una filtración final (0,2 mM) con respecto a esterilidad y se almacenó congelada (-25°C).

La SCP purificada (55 µg/mL) fue luego formulada con el 0,025% TweenTM80 o sin TweenTM80 (0,0%) en los siguientes tampones: 5 mM tampón de succinato a pH 6,0, 10 mM tampón de fosfato a pH 7,0, 10 mM tampón de fosfato a 7,4 ó 10 mM tampón Tris a pH 7,5 y se llevó en jeringas BD Hypak SCFTM. Las jeringas fueron luego colocadas en un agitador orbital horizontal a 2-8°C, agitada a 180 cpm durante 2 días y la concentración de proteína SCP determinada mediante el ensayo Lowry modificado.

Conforme se muestra en la Fig. 1, la estabilidad de la SCP fue enormemente mejorada cuando se formuló con TweenTM80. Por ejemplo, después de dos días en el agitador orbital, la SCP formulada sin TweenTM80 (FIG. 1A) demostró una disminución significativa (verbigracia, más del 90%) en la concentración de SCP de cada uno de los tampones ensayados. Sin embargo, conforme se muestra en la Fig. 1B,

la adición de 0,025% TweenTM80 a las formulaciones tampones de SCP, antes de colocarse en el agitador orbital durante dos días, inhibió totalmente la pérdida de SCP que fue observada en la FIG. 1A.

La estabilidad en almacenamiento de la formulación de SCP/TweenTM80 (0,025%) también fue analizada a 25°C y 37°C durante ocho semanas y seis semanas, respectivamente (datos no mostrados). En resumen, la SCP (200 µg) fue formulada o bien en tampón de succinato o tampón de fosfato de la manera siguiente: tampón de succinato (5 mM, pH 6,0) o tampón de fosfato (15 mM, pH 7,4), 0,9% NaCl y el 0,025% TweenTM80. La estabilidad de las formulaciones de SCP/TweenTM80 fue analizada mediante tamaño-exclusión-HPLC, ensayo de proteína total Lowry modificado e inspección visual con respecto a la precipitación. Se observó en este estudio que las formulaciones de SCP/TweenTM80 (o bien tampón) fueron totalmente estables a 25°C y 37°C durante todo el estudio de estabilidad (es decir, hasta ocho semanas y seis semanas, respectivamente).

EJEMPLO 3

LA INFLUENCIA DE RECIPIENTES SILICONADOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE 13vPnC

Los experimentos anteriores indicaron (datos no mostrados) que las composiciones inmunogénicas de 13vPnC se

precipitaron y/o agregaron cuando se llenaron en jeringas de vidrio de borosilato (dosis única) Becton Dickinson® (BD) Hypak Tipo 1 tratadas con silicona Dow Corning® grado médico DC 360 y tapadas con tapones (clorbutilo) libres de látex West 4432/50 y protector de aguja EZ West 7025/65 (Mezcla de Isopreno Bromobutilo Sintético; West Pharmaceutical®, Lionville, PA). En estos experimentos, se formuló el 13vPnC en 5 mM tampón de succinato que contiene el 0,85% NaCl y 4,4 µg/ml de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F y 8,8 µg/ml de serotipo 6B *S. pneumoniae*, con y sin 0.25 mg/mL de fosfato de aluminio como un adyuvante. Se observó que, en la ausencia de AlPO_4 , los particulados de 13vPnC fueron fácilmente observables por cuanto en la presencia de AlPO_4 , los particulados de 13vPnC fueron significativamente disminuidos y más difíciles de detectarse.

En el presente ejemplo, se examinó una serie de componentes de recipiente y cierre (es decir, recipientes) para identificar cuáles componentes estaban induciendo o contribuyendo con la formación de particulado de 13vPnC. Los recipientes ensayados comprendieron jeringas, tapones y frascos y se enumeran en la Tabla 3. Los tapones BD y West enumerados en la Tabla 3 fueron siliconados, utilizando o bien el proceso Huber o Jar. El proceso Huber de siliconación es más controlado y rindió 30 a 60 µg/cm² de

silicona en la superficie del tapón, mientras el proceso Jar de siliconación resultó en 150 a 300 µg/cm² de silicona en la superficie del tapón. En base a los cálculos teóricos, se expone cerca del 15% del área superficial del tapón al producto en la jeringa, sugiriendo que para el proceso Huber y Har entre 4,5 a 9 g y 22,5 a 45 µg de silicona es extraíble de los tapones, respectivamente.

Materiales

La silicona fue Fluido Médico Dow Corning® 360 1000 centistokes (lote No. 0001846266). Se formuló el 7vPnC en 5 mM tampón de succinato contentivo del 0,85% NaCl y 4,4 µg/ml de serotipos 4, 9, 14, 18C, 19F y 23F *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml de serotipo 6B *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. Se formuló el 13vPnC en 5 mM de tampón de succinato contentivo del 0,85% NaCl y 4,4 g/ml de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F y 8,8 µg/ml de serotipo 6B *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. Se formuló el serotipo *S. pneumoniae* monovalente (5 mM de tampón de succinato contentivo del 0.85% NaCl, sin fosfato de aluminio) a una concentración de 61 µg/ml para simular la concentración de sacárido total de las formulaciones de 13vPnC.

Métodos

Se formularon el 7vPnC y 13vPnC de la forma descrita anteriormente y se añadieron 35 ml de una formulación dada a una botella clara de 250 ml Nalgene®. A cada botella

Nalgene®, se añadieron los componentes de los recipientes enumerados en la Tabla 3. Las botellas Nalgene® fueron luego colocadas en un Agitador de Órbita Labline® y remolinadas durante la noche a 50 rpm. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Apariencia Visual. Las botellas Nalgene®, cada una contentiva de los componentes de recipiente, fueron mantenidas a una luz de fluorescencia en el laboratorio. Un rayo de luz (efecto Tindal) que pasa por las muestras permitió la detección de particulados.

Ensayo de Proteína. La proteína total y proteína aglutinadas con el aluminio fue determinada midiendo la concentración de proteína total en la composición inmunogénica formulada y la proteína asociada con la pastilla de aluminio (respectivamente) una alícuota de la composición inmunogénica fue centrifugada y la pastilla fue resuspendida en salina). Se realizaron ensayos utilizando el ensayo de proteína Pierce Modified Lowry (catálogo #23240) con albúmina de suero bovino como un estándar.

RESULTADOS

En la primera serie de experimentos, se formularon las composiciones inmunogénicas sin AlPO_4 y expusieron a una serie de recipientes enumerados a continuación en la Tabla 3. Resultó claramente evidente de los datos (Tabla 3) que los componentes de recipientes que fueron tratados

con aceite de silicona indujo la formación de partículas blancas. En contraste, no se detectaron particulados en la presencia de los tapones Daikyo® no-siliconados (Daikyo Seiko, Ltd., Japón) y frascos Schott (Schott North America Inc., Lebanon, PA).

TABLA 3

**EFFECTO DE DIFERENTES COMPONENTES DE LOS RECIPIENTES SOBRE
13vPnC FORMULADO SIN AIPO₄**

Componentes de los Recipientes	Número de Componen- tes de Recipien- tes Añadidos	Apariencia (Inspección Visual)
Control-13vPnC sin AIPO ₄	Ninguno	Sin Particula- do
Tapones BD Hypak BSCF 1-3 ml 4432/50 Grey Si WWD	10	Particulados
Tapones Procesados BD Hypak 1-3 ml 3332/59 Grey Si Huber	10	Particulados
Tapones West 890 Listos para Esteri- lizarse	10	Particulados
Tapones BD Hypak BSCF 1-3 ML w4416/50 Grey Si 1000 WWD	10	Particulados
Tapones Helvoet 6213	10	Particulados
Tapones de Frasco Daikyo (tapo- nes de plug D777-1 B2-40 F451)	10	Sin Particu- lado
Tampones para Jeringas BD Hypak BSCF 1-3 ml LLA EZGTC W7025/65	4	Particulados
Tapones Hypak NSCF 1-3 ml 4023/50 B2-40 Daikyo	10	Sin Particu- lado
Tapa con Punta para Agarre E-Z para Jeringa W7025/65 EZ IITC	10	Sin Particu- lado
Frascos de Vidrio de 2 ml, 13 mm Schott Type 1	4	Sin Particu- lado

Aceite de Silicona (grado 360 de Dow Chemical Medical	500 µL (1,43%)	Particulados
Jeringas Schott TopPac	4	Sin Particu- Lado

Se seleccionó el serotipo 6B *S. pneumoniae* monovalente como un modelo para el 13vPnC y se formuló a 61,6 µg/ml (sin AlPO_4) para simular la concentración d sacárido total en la formulación 13vPnC. Se añadió silicona (Fluido Médico Dow Corning 360) a alícuotas del monovalente 6B formulado, oscilando de 2 ppm a 100 ppm. Las mezclas fueron colocadas en un Agitador de Órbita Labline® durante 2 horas a 50 rpm. Conforme se indica a continuación en la Tabla 4, se observaron particulados blancos como fibras a todas las concentraciones de silicona (Si).

TABLA 4

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SILICONA SOBRE LA FORMACIÓN
DE PARTICULADOS**

Concentración de Silicona	Apariencia (Inspección Visual
2 ppm (1 µl de Si en 500 mL de La Formulación	Particulados blancos como fibra
5 ppm (2,5 µl de Si en 500 mL de La Formulación	Particulados blancos como fibra
10 ppm (5 µl de Si en 500 mL de La Formulación	Particulados blancos como fibra
15 ppm (7,5 µl de Si en 500 mL de La Formulación	Particulados blancos como fibra
20 ppm (10 µl de Si en 599 mL de La Formulación)	Particulados blancos como fibra
100 ppm (2 µl de Si en 20 mL de La Formulación)	Particulados blancos como fibra

También se examinó la cantidad de silicona en las formulaciones de 13vPnC (sin AlPO_4). Se determinó la concentración de silicona mediante Espectroscopia de Emisión de Plasma DC (datos no mostrados). En este método, se combinó el contenido de 25 jeringas y extrajo con dos porciones de 50 ml de mezcla de ciclohexano/isopropilo. Los extractos fueron combinados y evaporados. El residuo fue solubilizado y ensayado según los métodos existente para la determinación de silicona en tapones de caucho. Los resultados indicaron

que entre 15,8 a 19,0 μg de silicona es extraíble de cada jeringa. Esta cantidad corresponde del 2,7% al 3,3% de silicona.

En una serie por separado de experimentos, en los cuales se formuló el 13vPnC en la presencia de AlPO_4 y se sometió al mismo recipiente indicado en la Tabla 3, se elucidó que la silicona y la proteína "libre" (13vPnC) en la solución fue responsable de la formación de los particulados (datos no mostrados). El análisis FTIR de los particulados también indicó que los particulados consistieron en proteína y silicona (datos no mostrados). Se determinó en estos experimentos que aproximadamente el 85% del 13vPnC se aglutina con el AlPO_4 , donde el restante 15% resultó ser 13vPnC libre (no aglutinando al AlPO_4) en solución. En contraste, se observó que el 7vPnC formulado con AlPO_4 se aglutinó al 100% con el AlPO_4 (datos no mostrados).

Para elucidar el efecto de la proteína-polisacárido libre sobre la formación de los particulados, se hicieron alícuotas con 25 ml tanto de 7vPnC como 13vPnC y transfirieron a un tubo centrífugo de 50 ml. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm y el supernatante fue extraído cuidadosamente y transferido a una botella Nalgene®. Se añadieron diez tapones siliconados (Tapones 4432) a cada botella y se colocaron en agitador orbital a 50 rpm. Previa inspección visual cuidadosa, se ob-

servó que el supernatante 7vPnC no presentó formación de particulados, quedando así claro e incoloro. Sin embargo, el supernatante 13vPnC comenzó a mostrar bajos niveles de particulado en la cuarta hora de observación (datos no mostrados). Este resultado sugirió que la proteína-polisacárido libre en solución, junto con la silicona, es responsable de la formación de los particulados.

Para elucidar adicionalmente la contribución de la proteína-polisacárido libre en solución a la formación de particulados, se seleccionaron serotipos 4 y 6B *S. pneumoniae* monovalentes por su elevada y baja aglutinación al aluminio, respectivamente. Estos dos monovalentes fueron formulados a una concentración de proteína que oscila de 25 µg/ml a 200 µg/ml en la ausencia y presencia de AlPO_4 . Se colocaron diez tapones siliconados (tapones 4432) en cada formulación, los cuales fueron luego colocados en el agitador de órbita a 50 rpm. Conforme se indica a continuación en la Tabla 5, se observaron los particulados blancos como fibra para ambos serotipos monovalentes a todas las concentraciones de proteína en la ausencia de AlPO_4 . Sin embargo, en la presencia de AlPO_4 , se detectaron particulados a concentraciones más bajas para el serotipo 4 (100 µg/ml) versus serotipo 6B (200 µg/ml), datos no mostrados.

TABLA 5

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOBRE LA FORMACIÓN

DE PARTICULADOS

	Apariencia (Inspección Visual)	
	Sin AlPO_4	Con AlPO_4
25 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
50 $\mu\text{g/mL}$ d 6B	Particulados blancos como fibra	Sin particulados
75 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
100 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
200 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados blancos como fibra	Particulados blancos como fibra
25 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
50 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
75 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
100 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Particulados blan- cos como fibra
200 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Particulados blan- cos como fibra

EJEMPLO 4

LOS ADYUVANTES DE ALUMINIO INHIBEN LA FORMACIÓN DE PARTI- CULADOS 13vPnC EN LA PRESENCIA DE RECIPIENTES SILICONADOS

Conforme se indica anteriormente en el Ejemplo 3, una

composición inmunogénica 13vPnC es una formación líquida que comprende 4,4 µg/mL de serotipos 1, 3, 4, 5, 6^a, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 8,8 *S. pneumoniae* y 8 µg/mL del tipo 6B en 5 mM de tampón de succinato (pH 5,8) y 0,85% NaCl, que también podrá formularse con o sin un adyuvante (verbigracia, un adyuvante de aluminio). También podrá formularse el 13vPnC con o sin un adyuvante, tal como 0,25 mg de aluminio/ml fosfato de aluminio (AlPO₄). Se observó en el Ejemplo 3 que el 13vPnC formulado sin AlPO₄ y llenado en jeringas BD Hypak SCFTM (tapadas con émbolos Hypak) no aprobaron la inspección visual debido a la observación de particulados, donde estudios adicionales revelaron que los particulados fueron en parte como resultado de interacciones de proteína-polisacárido con la silicona. En el siguiente ejemplo, se evaluaron jeringas (y émbolos) de varios vendedores con formulaciones de 13vPnC, donde se simulaban por medio de agitación condiciones de envío y manejo (descritas a continuación).

Materiales

Se formuló el 13vPnC en 5 mM tampón de succinato que contiene 0,85% NaCl y 4,4 µg/ml de los serotipos *S. pneumoniae*, 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F y 8,8 µg/ml de serotipo 6B *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. Los medios de recipientes

ensayados se enumeran a continuación en la Tabla 6.

TABLA 6

RECIPIENTES

	Recipientes	Descripción
1	Jeringas Vetter Tipo 1 vidrio sin tratar	Formato a granel 1 ml de largo
2	Jeringas Schott TopPac®	Jeringas plásticas
3	Jeringas BD Estufadas Tipo 1 vidrio sin tratar	0,1 mg silicona/ Tambor
4	Jeringas BD Estufadas Tipo 1 vidrio sin tratar	0,04 mg silicona/ Tambor
5	Jeringas con viscosidad BD Tipo 1 vidrio sin tratar	Jeringas de 2,25 ml 12599 cst silicona
6	Jeringas con viscosidad Elevada BD Tipo 1 vidrio sin tratar	Jeringas de 1,0 ml 12500 cst silicona
7	Jeringas BänderGlas, PS2 Tipo 1 vidrio sin tratar	0,056 mg silicona/ Tambor
8	Jeringas BänderGlas, PS4 Tipo 1 vidrio sin tratar	0,14 mg silicona/ Tambor
1	Émbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Émbolos Flurotec®
2	Émbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Émbolos Flurotec®
1	13vPnC con AIPO ₄ en jeringas BD Hypak con émbolos West 4432 listos para se usados y protectores de tapas 7025/65 EZ	Control positivo, elevado contenido de silicona
2	13vPnC con AIPO ₄ en jeringas sin silicona con émbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Control negativo, sin tratamiento con silicona

Métodos

Formulación y Procedimiento de Llenado. A continuación se enumera en la Tabla 7 la receta para una formulación de 2 litros de 13vPnC. En resumen, primero se añadió el 0,85% salina a un cubilete de vidrio, seguido de 5 mM tampón de succinato (pH 5,8) y luego en secuencia cada uno de los conjugados de serotipos *S. pneumoniae*. La formulación fue luego mezclada suavemente en una placa agitadora y filtrada en una unidad de filtro de 0,22 µm Millipore®. Para la formulación que comprende AIPO₄, el AIPO₄ (0,25 mg/ml de concentración final) fue luego añadido

y se mezcló la formulación suavemente. Luego se llenaron las jeringas de prueba (0,58 ml/jeringa) y taparon con los émbolos.

Simulación de Envío con Agitación. Se utilizó un torbellinador Digital Multitubefirma VWR® (Catálogo No. 14005-826) para agitar las muestra. Las jeringas llenadas con 13vPnC fueron colocadas horizontalmente y fijadas por dos placas de soporte del torbellinador. Se mantuvieron muestras en la posición horizontal y agitaron a 500 rpm con modo de pausa a 2-8°C durante veinticuatro horas.

Nefelometría. Se determinaron las antigenicidades específicas del serotipo mediante en ensayo de nefelometría de ritmo utilizando anticuerpos específicos del tipo. Para el 13vPnC con AlPO_4 , se solubilizó el fosfato de aluminio añadiendo 1N NaOH. La solución fue inmediatamente neutralizada añadiendo M ácido cítrico. Para el 13vPnC sin AlPO_4 , no se realizaron procedimientos de solubilización y neutralización. El ensayo mide la tasa de cambio de la intensidad de dispersión de la luz derivada del complejo de anticuerpo-antígeno formado en la muestra utilizando nefelómetro Beckman Array 360.

TABLA 7

TABLA DE FORMULACIÓN DEL 13vPnC

Componente	Tamaño	Conc.	Conc.	13vPnC con	13vPnC sin
	Lote	Lote	Requer.	AlPO_4	AlPO_4
	(L)	(ng/mL)	(µg/mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)

serotipo 1	2.000	0,506	4,4	17,39	17,39
serotipo 3	2.000	0.256	4,4	34,38	34,38
serotipo 4	2.000	0.530	4,4	16,60	16,60
serotipo 5	2.000	0,515	4,4	17,09	17,09
serotipo 6A	2.000	0,519	4,4	16,96	16,96
serotipo 6B	2.000	9,489	8,8	35,99	35,99
serotipo 7F	2.000	0,500	4,4	17,60	17,60
serotipo 9V	2.000	0,521	4,4	16,89	16,89
serotipo 14	2.000	0,518	4,4	16,99	16,99
serotipo 18C	2.000	0,509	4,4	17,29	17,29
serotipo 19A	2.000	0,511	4,4	17,22	17,22
serotipo 19F	2.000	0,520	4,4	16,92	16,92
serotipo 23F	2.000	0,511	4,4	17,22	17,22
Tampón de Succinato en 0.85% Salina, pH 5,8	2.000	50,0	5000	200,0	200,0
AIPO ₄	2.000	3,250	250	153,85	ND
Salina	2.000	ND	ND	1387,62	1541,46

RESULTADOS

En este estudio, las jeringas de diferentes vendedores, que tienen diferentes niveles de silicona (Tabla 6), fueron sometidas a condiciones de agitación controladas. La antigenicidad total de cada serotipo fue medida mediante ensayo de Nefelometría tanto para las muestras pre-agitación como postagitación. Se calculó la pérdida de antigenicidad siguiente a la agitación (porcentaje) y se muestra en la FIG. 2 a FIG. 7.

Antes del estudio, se optimizaron las condiciones de agitación basadas en la pérdida de antigenicidad de los

dos controles: (1) el control del peor caso (control positivo, elevado contenido de silicona; FIG. 2) y (2) el control del mejor caso (control negativo, sin silicona; FIG. 3). Las condiciones fueron luego optimizadas de tal modo que la pérdida de antigenicidad fue baja en el control positivo, pero detectable en el control negativo. Esto fue para asegurar que la adición no fuera ni demasiado débil para producir precipitación en las jeringas; ni demasiado fuerte de tal modo que la precipitación pudiese ser causada por factores distintos a la interacción de la silicona (verbigracia, mediante esfuerzos cortantes). De este modo, se seleccionó la agitación a 500 rpm (modo de pausa) durante veinticuatro horas como la condición de agitación más adecuada, mientras se utilizó una temperatura de 2-8°C y una posición horizontal para simular las condiciones de envío y manejo del producto en tiempo real.

De la siguiente manera se resumen los resultados del estudio: Las mayores pérdidas de antigenicidad del 13vPnC formulado con AlPO_4 ocurrieron en las jeringas con los mayores de niveles de silicona (datos no mostrados). Por ejemplo, de las jeringas enumeradas en la Tabla 6, la jeringa BD Hypak (control 1), la jeringa BD Estufada (jeringa 3; 0,1 mg de silicona), la jeringa de elevada viscosidad BD (jeringa 5) y la jeringa BänderGlas PS4 (jeringa 8, 0,14 mg de silicona), cada una tenía uno o más de los serotipos de 13vPnC con más del 10% de pérdida de antigeni-

cidad. Las pérdidas de antigenicidad más pequeñas del 13vPnC formulado con AlPO_4 ocurrieron en las jeringas con los niveles de silicona más bajos. Por ejemplo, las jeringas Vetter (FIG. 4) y las jeringas de plástico Schott Top-Pac (FIG. 5) fueron las más similares a las jeringas sin silicona (FIG. 2), demostrando ambas menos pérdidas de antigenicidad para el 13vPnC formulado con AlPO_4 .

Se analizó la influencia del fosfato de aluminio sobre la estabilización del 13vPnC y la inhibición de la formación de particulado en la presencia de jeringas siliconadas en experimentos utilizando 13vPnC formulado con y sin 0,25 mg/ml AlPO_4 , donde las jeringas utilizadas fueron las jeringas Estufadas de bajo contenido de silicona (jeringa 4 en la Tabla 6) y las jeringas PS2 de bajo contenido de silicona BündlerGlas (jeringa 7 en la Tabla 6). Las jeringas Estufadas de bajo contenido de silicona BD (0,04 mg de silicona/tambo) típicamente presentaron menos del 10% de pérdida de antigenicidad para los serotipos 13vPnC formulados con AlPO_4 (FIG. 6A), por cuanto la pérdida de antigenicidad para los serotipos 13vPnC formulados sin AlPO_4 (FIG. 6B) presentaron pérdidas de antigenicidad que oscilan del 5% (serotipo 1) hasta aproximadamente el 59% (serotipo 23F). Las jeringas PS2 de bajo contenido de silicona BündlerGlas (0,056 mg de silicona/tambor) presentaron menos del 5-8% de pérdida de antigenicidad (dependiendo del serotipo) para el 13vPnC formulado con AlPO_4 (FIG.

7A), por cuanto la pérdida de antigenicidad para los serotipos 13vPnC formulado sin AlPO_4 (FIG. 7B) presentó pérdidas de antigenicidad que oscilan aproximadamente del 5% aproximadamente al 30% (dependiendo del serotipo).

Así, estos datos tomados juntos indican que: (1) la pérdida de antigenicidad del 13vPnC fue más grande en las jeringas con los niveles más grandes de silicona y (2) el 13vPnC formulado sin AlPO_4 sostuvo las pérdidas de antigenicidad superiores al 13vPnC con AlPO_4 en todas las jeringas ensayadas.

EJEMPLO 5

LAS FORMULACIONES QUE COMPRENDEN SURFACTANTE OPTIMIZAN LA AGLUTINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE MENINGOCOCO CON LOS ADYUVANTES DE SAL DE ALUMINIO

La proteína de *N. meningitidis* 2086 lipidado recombinante (rLP2086) utilizada en este ejemplo fue expresada y purificada de la manera siguiente. Se expresó rLP2086 recombinantmente en *E. coli* utilizando una secuencia líder nativa. Se siguieron los protocolos de fermentación estándares para *E. coli* utilizando medio definido libre de animales y subsiguiente lisis celular. Se purificó la proteína de *N. meningitidis* 2086 lipidado recombinante a partir de la pastilla de membrana con 50 mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% sarcosilo pH 8. Este extracto de sarcosilo fue ajustado

hasta el 1% Zwittergent 3-14 (Z3-14) y dializó dos veces contra un exceso de 30 veces de 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Z3-14. Se precipitó el extracto de rLP2086 dializado con el 90% etanol para remover el sarcosilo restante y se solubilizó con 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Z3-14 pH 8. Se removió el material insoluble mediante centrifugación, se pasó el supernatante por encima de una columna de cromatografía por intercambio de aniones y se recolectó la rLP2086 en la fracción sin aglutinarse. El material sin aglutinarse fue dializado dos veces contra un exceso de 30 veces de 25mM NaAc/1% Z3-14 pH 4,5 y se pasó por encima de una columna de cromatografía por intercambio de cationes. Se levigó la rLP2086 con un gradiente de 0-0,3M NaCl y se almacenó congelada (-25°C).

La rLP2086 purificada fue luego formulada con 150 mM NaCl, 0,020% TweenTM80, 0,25 mg Al/mL de AlPO₄ y en los siguientes tampones: 10 mM de tampón de fosfato a pH 7,0 y 5 mM de tampón de succinato a pH 6,0. La Tabla 8 compara el porcentaje de aglutinante de la proteína con el adyuvante de AlPO₄.

TABLA 8
AGLUTINACIÓN DE LA rLP2086 CON EL ADYUVANTE

Tampón	Conc. Proteína Total (µg/mL)	Proteína Aglutinada con AlPO ₄ (%)

10 mM Tampón de Fosfato pH 7,0 contentivo 150 mM NaCl, 0,0% polisorbato 80 y 0,25 Mg Al/mL de AlPO_4	400	68
	120	82
5 mM Tampón de succinato pH 6,0 contentivo de 150 mM NaCl, 0,0% polisorbato 80 y 0,5 ng Al/mL de AlPO_4	400	81
	120	100

REFERENCIAS

- Baldwin, "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", *Diabet. Med.*, 5:789-790, 1988.
- Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces." In K.L. Mittal and P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, Nueva York, pp. 371-380, 2000.
- Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction", *Langmuir* 14:1892-1898, 1998^b.
- Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?", *Langmuir* 14:1887-1891, 1998^a.
- Bartzoka, Chan y Brook, "Protein-Silicone Synergism at Liquid/Liquid Interfaces", *Langmuir* 16:4589-4593, 2000.
- Bernstein, "Clouding and Deactivation of Clear (Regular) Human Insulin: Association with Silicone Oil from Disposable Syringes", *Diabetes Care* 10:786-787, 1987.
- Bernstein, "Clouding and deactivation of clear (regular) human insulin: Association with silicone oil from disposable syringes?", *Diabetes Care*, 10:786-787, 1987.
- Bolgiano y Bolgiano y colaboradores, "Effect of Physico-

- Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₇ Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 19:3189-3200, 2001.
- Chantelau y Berger, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", *Lancet*, 1:1459, 1985.
- Chantelau y colaboradores, "Silicone oil released from disposable insulin syringes", *Diabetes care*, 9:672-673, 1986.
- Chantelau y colaboradores, "Silicone oil contamination of insulin", *Diabet. Med.*, 6:278, 1989.
- Chantelau, Burger and Bohlken, "Silicone Oil Released from Disposable Insulin Syringes", *Diabetes Care*, 9:672-673, 1986.
- Collier and Dawson, "Insulin syringes and silicone oil", *Lancet*, 5:789-790, 1985.
- Ho y colaboradores, "Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 20:3509-3522, 2002.
- Ho y colaboradores, "Solution Stability of the Subunit Components of Meningococcal C. Oligosaccharide-CRM₁₇ Conjugate Vaccines", *Biotech. Appl. Biochem.*, 33:91-98, 2001.
- Jones y colaboradores, "Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins", *J. Pharmaceutical Sci.*, 94(4):918-927, 2005.

Kajihara y colaboradores, "Development of new drug delivery system for protein drugs using silicone", *J. Control. Rel.* 66:49-61, 2000.

Polin, "The Ins and Outs of Prefilled Syringes", *Pharmaceutical and Medical Packaging News Article Index*, Mayo 2003.

Sun y colaboradores, "Protein Denaturation Induced by Cyclic Silicone", *Biomaterials* 18:1593-1597, 1998.

REIVINDICACIONES DIVISIONAL DE LA SOLICITUD 08.125.423 A

1. Un medio de recipiente siliconado lleno con una formulación que inhibe la agregación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína comprendido en un medio de recipiente siliconado, la formulación comprende (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa de 3,5 hasta 7,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína en donde el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o mas polisacáridos de neumococo.
2. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1, en donde la solución salina tamponada de pH en la formulación tiene un pH de 5,5 a 7,5.
3. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1 o 2, en donde el tampón en la formulación es fosfato, succinato, histidina o citrato.
4. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1, en donde el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0.
5. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

6. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.

7. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

8. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la formulación comprende además polisorbato 80 (TweenTM 80).

9. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 8, en donde la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es 0,001% a 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

10. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde uno o mas polisacáridos de neumococo son un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae*.

11. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la proteína de la formulación de conjugado de polisacárido-proteína se seleccionado a partir del grupo que consiste en CRM₁₉₇, un toxoide del tétano, un toxoide de cólera, un toxoide de la tos ferina, un toxoide lábil al calor E. coli (LT), un toxoide de neumolisina, proteína superficial de neumococo A (PspA), proteína de adhesina de neumococo A (PsaA), una peptidasa C5a proveniente de Estreptococo, proteína D Haemophilus influenzae, ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

12. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 7 (7vPnC) que comprende polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

13. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es un conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido

CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇.

14. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde dicho contenedor es una jeringa.

15. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 14 donde dicho recipiente es una jeringa de vidrio.

[C5a] ANTES Y DESPUÉS DE DOS DÍAS DE AGITACIÓN
EN JERINGAS, SIN TWEENTM80

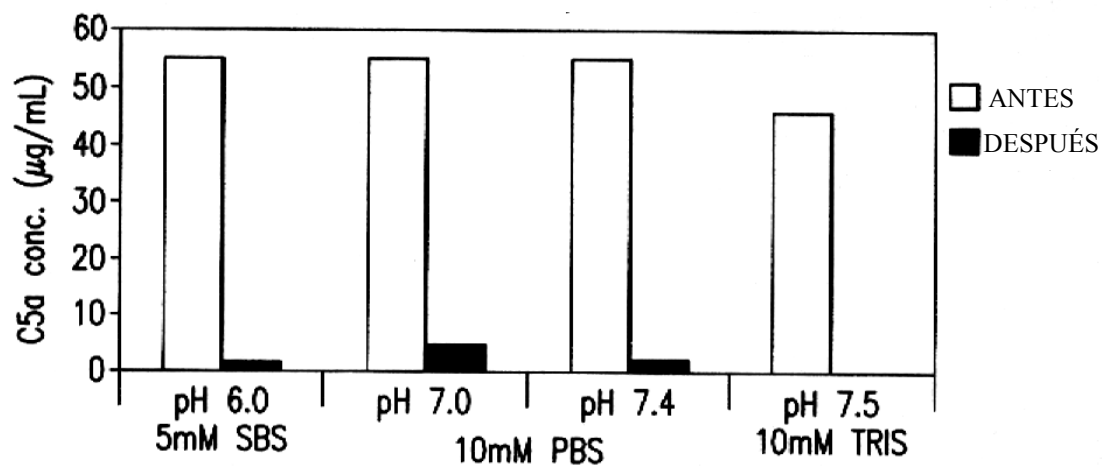


FIG.1A

C5a] ANTES Y DESPUÉS DE DOS DÍAS DE AGITACIÓN
EN JERINGAS, 0,025% TWEENTM80

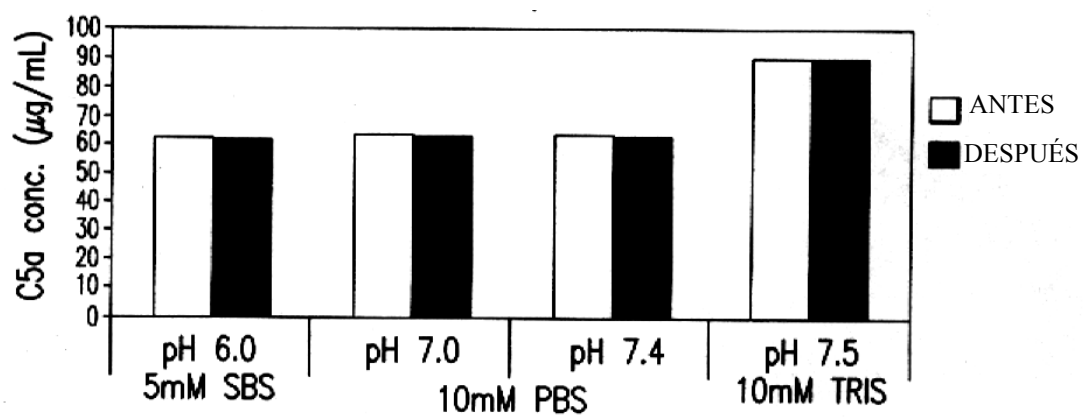


FIG.1B

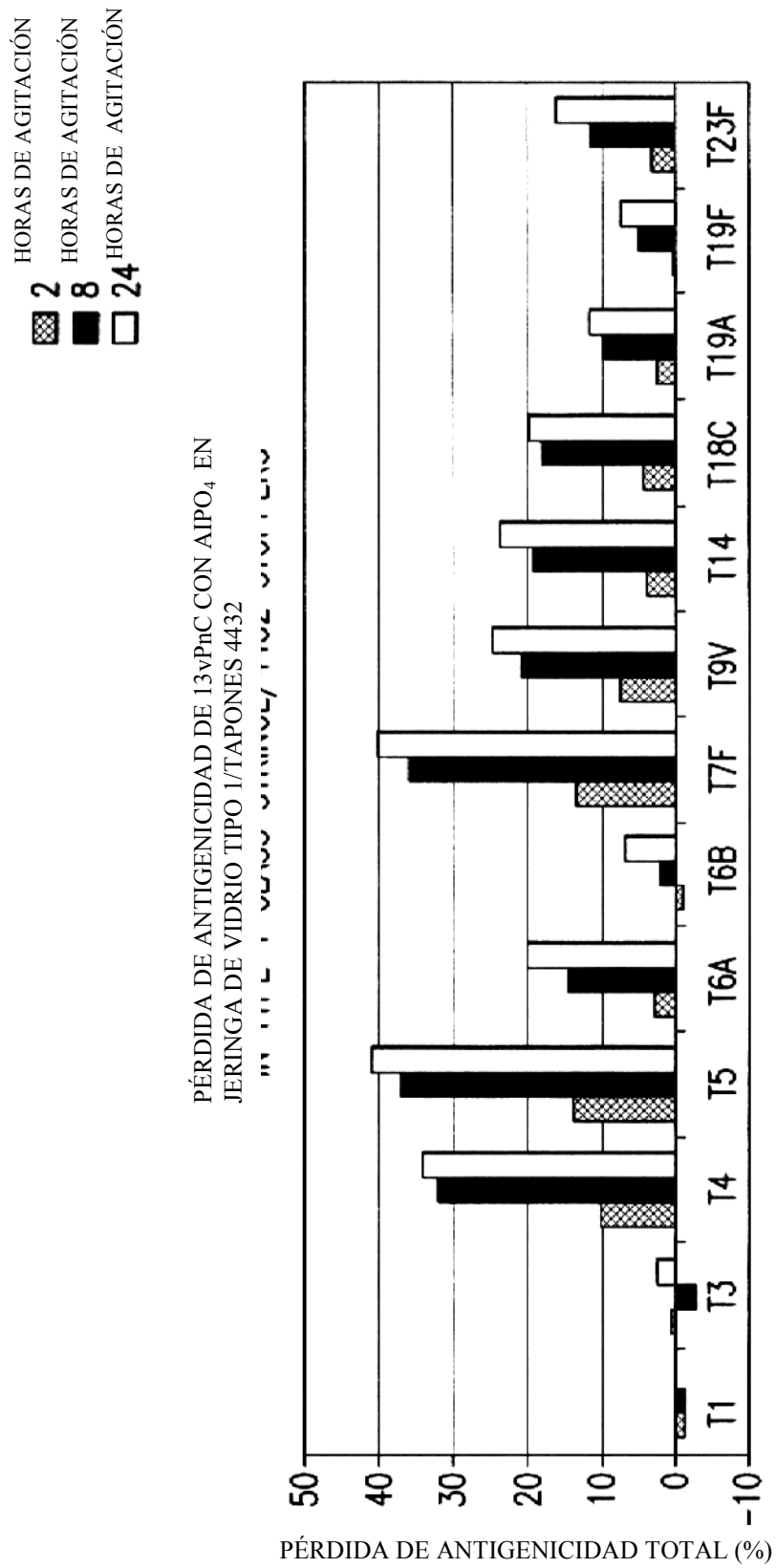


FIG. 2

HORAS DE AGITACIÓN
 2 HORAS DE AGITACIÓN
 8 HORAS DE AGITACIÓN
 24 HORAS DE AGITACIÓN

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPrC CON AlPO_4
 EN JERINGAS SIN SILICONAR

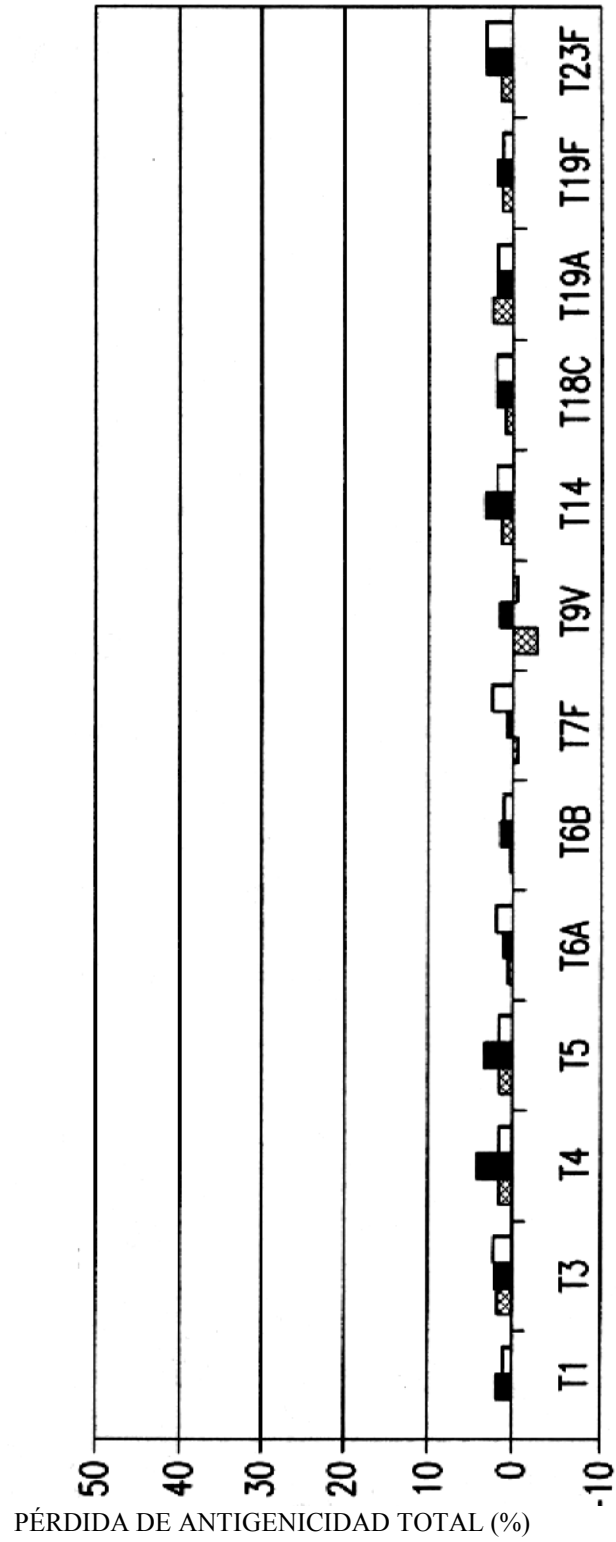


FIG.3

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPrC CON
AIPO₄ EN JERINGAS VETTER

2 HORAS DE AGITACIÓN
 8 HORAS DE AGITACIÓN
 24 HORAS DE AGITACIÓN

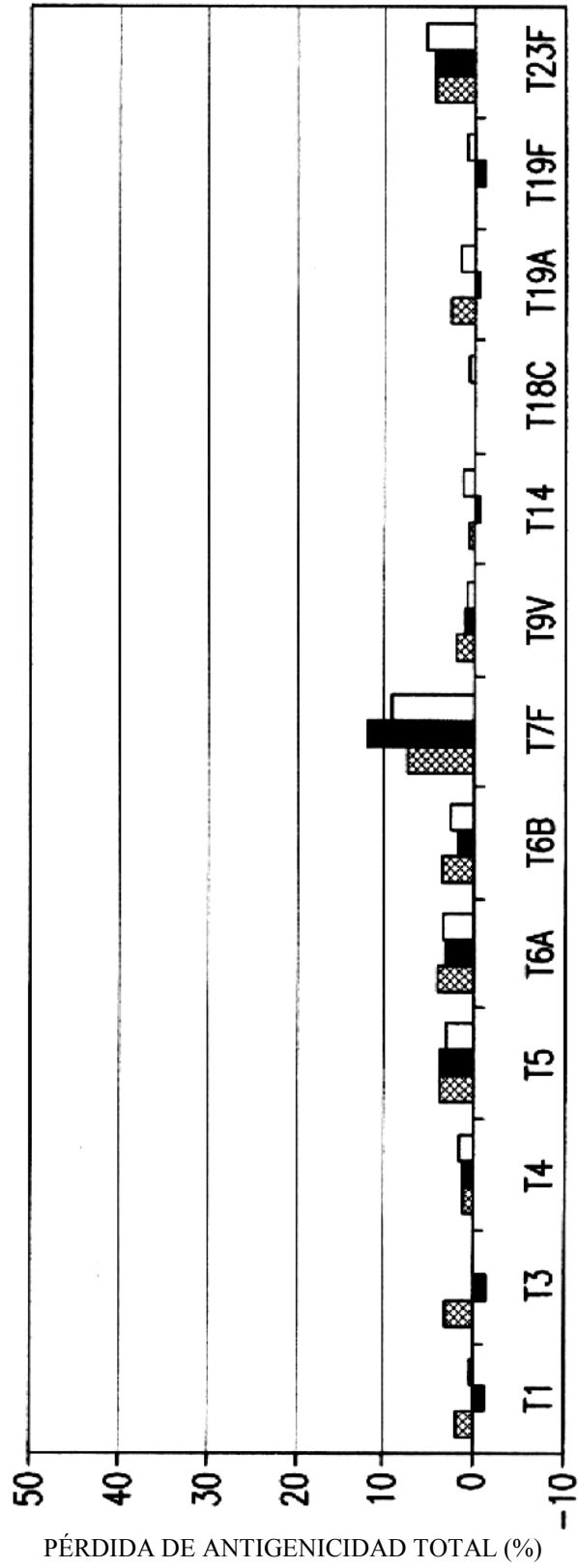


FIG.4

HORAS DE AGITACIÓN
 2 HORAS DE AGITACIÓN
 8 HORAS DE AGITACIÓN
 24 HORAS DE AGITACIÓN

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD DE 13vPhC CON AlPO_4
 EN JERINGAS SCOUT TopPac

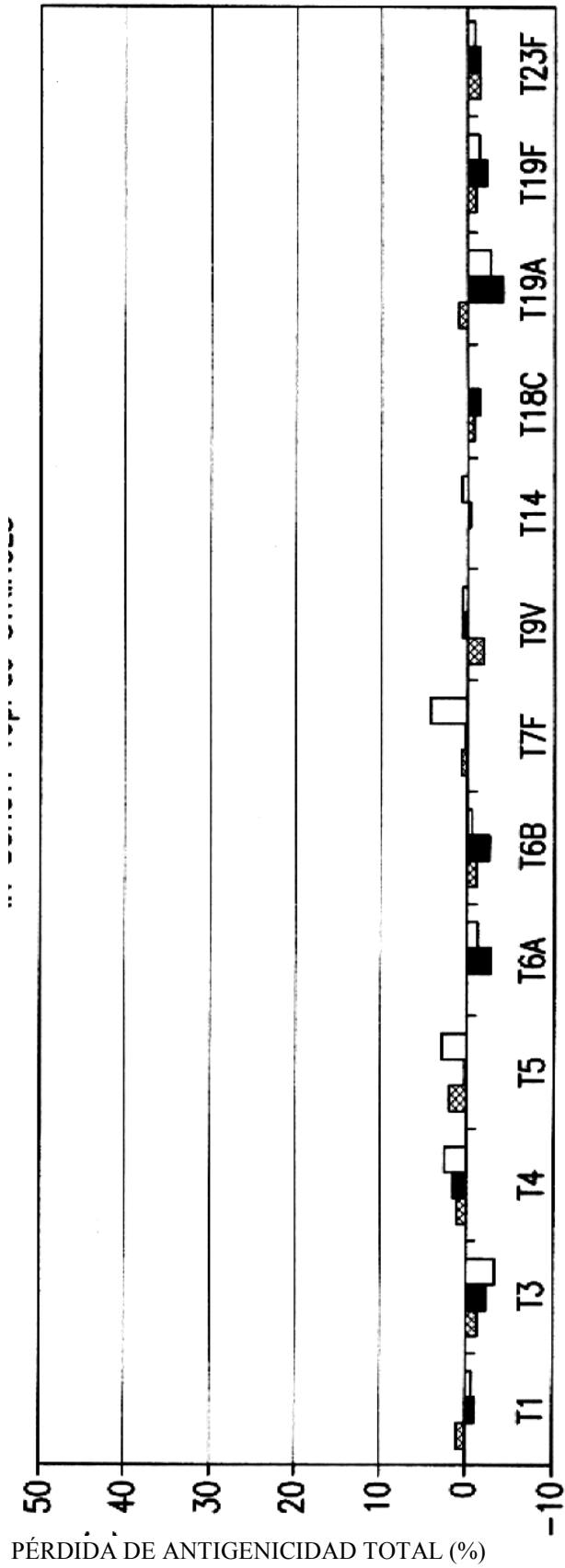


FIG.5

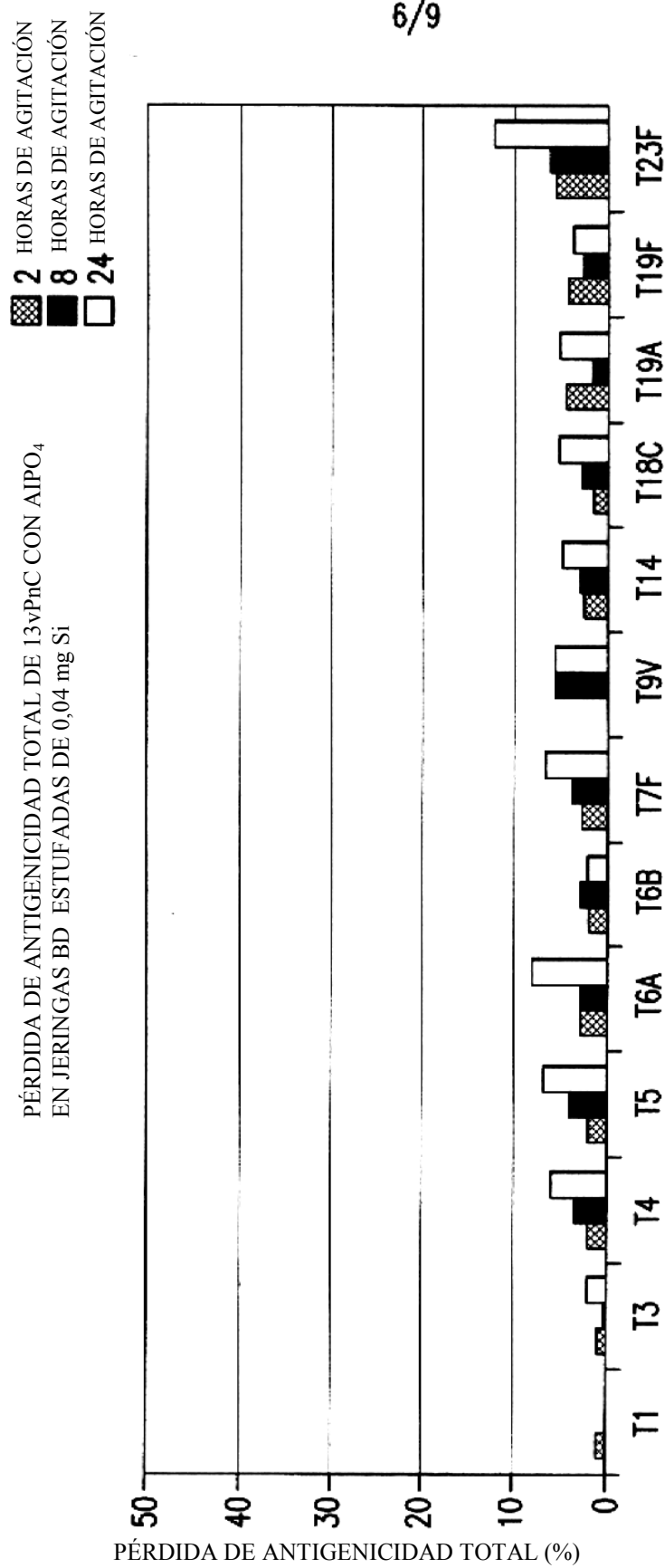


FIG.6A

2 HORAS DE AGITACIÓN
 8 HORAS DE AGITACIÓN
 24 HORAS DE AGITACIÓN
 48 HORAS DE AGITACIÓN

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD DE $^{13}\text{vPrnC}$ SIN AlPO_4 EN
 JERINGAS BD ESTUFADAS DE 0,04 mg Si

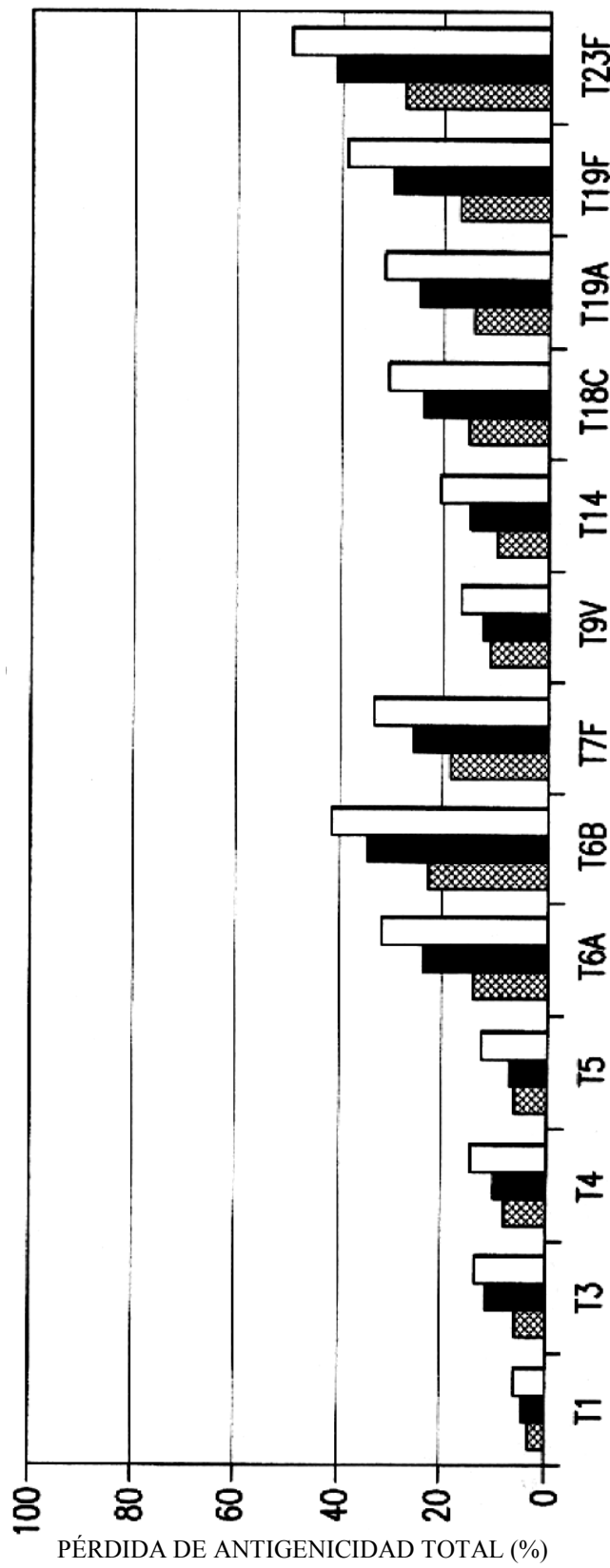


FIG.6B

HORAS DE AGITACIÓN
 2
 8
 24

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPnC CON
 AIPO₄ EN JERINGAS BÜNDERGLAS PS2 (0,056 mg)

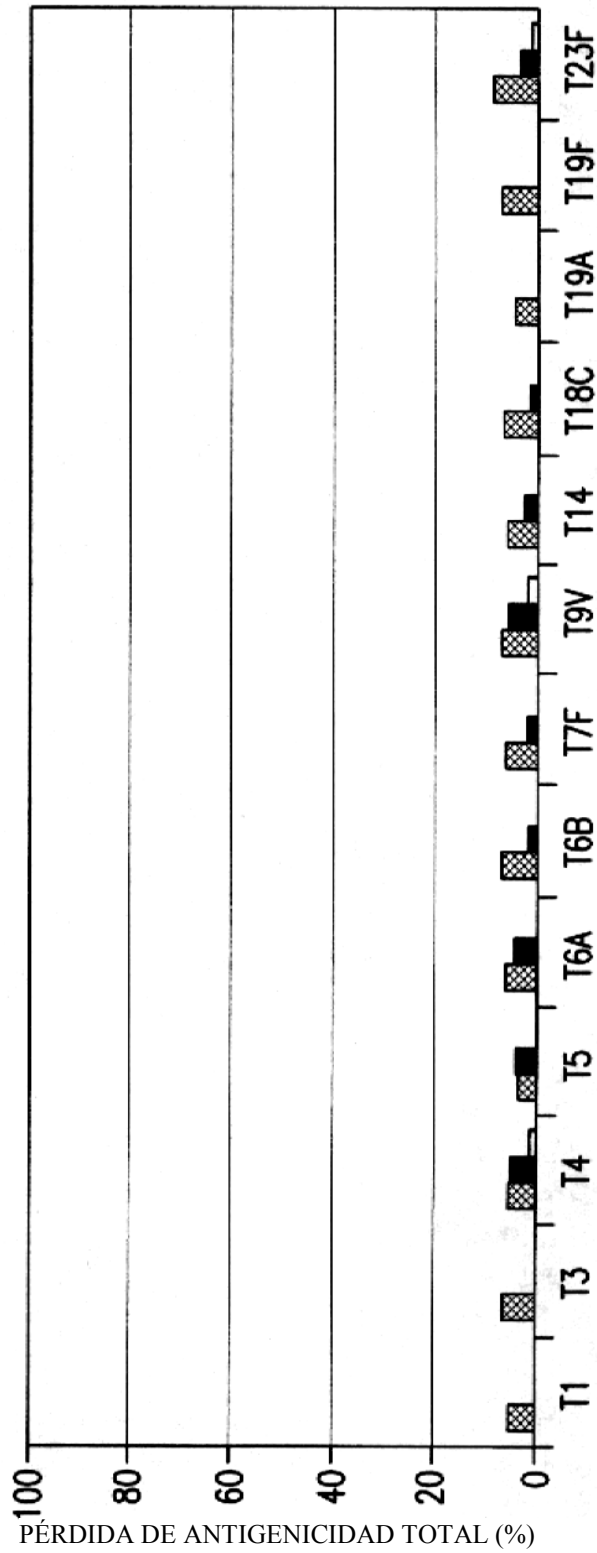


FIG.7A

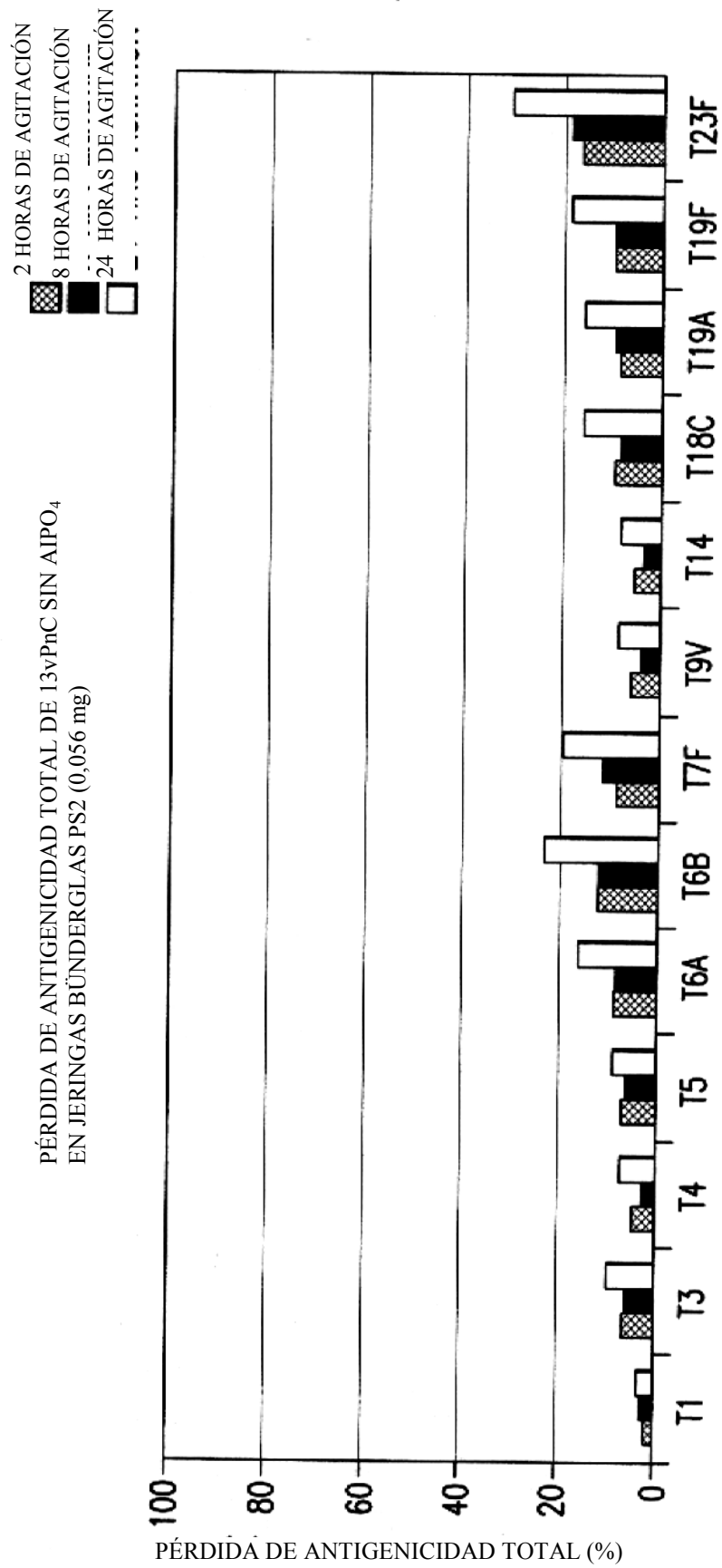


FIG.7B

REIVINDICACIONES DIVISIONAL DE LA SOLICITUD 08.125.423 A

1. Un medio de recipiente siliconado lleno con una formulación que inhibe la agregación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína comprendido en un medio de recipiente siliconado, la formulación comprende (i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa de 3,5 hasta 7,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína en donde el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o mas polisacáridos de neumococo.
2. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1, en donde la solución salina tamponada de pH en la formulación tiene un pH de 5,5 a 7,5.
3. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1 o 2, en donde el tampón en la formulación es fosfato, succinato, histidina o citrato.
4. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 1, en donde el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0.
5. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

6. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.

7. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

8. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la formulación comprende además polisorbato 80 (TweenTM 80).

9. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 8, en donde la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es 0,001% a 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

10. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde uno o mas polisacáridos de neumococo son un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae*.

11. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la proteína de la formulación de conjugado de polisacárido-proteína se seleccionado a partir del grupo que consiste en CRM₁₉₇, un toxoide del tétano, un toxoide de cólera, un toxoide de la tos ferina, un toxoide lábil al calor E. coli (LT), un toxoide de neumolisina, proteína superficial de neumococo A (PspA), proteína de adhesina de neumococo A (PsaA), una peptidasa C5a proveniente de Estreptococo, proteína D Haemophilus influenzae, ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

12. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 7 (7vPnC) que comprende polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

13. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es un conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) que comprende un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*

conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇, y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con polipéptido CRM₁₉₇.

14. El medio de recipiente siliconado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde dicho contenedor es una jeringa.

15. El medio de recipiente siliconado de la reivindicación 14 donde dicho recipiente es una jeringa de vidrio.

Traducción oficial del ingles por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN CESIÓN A WYETH

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Winifred A. Ventura
3. Quien ejerce funciones de notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de la corte de Winifred A. Ventura- Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 23 de diciembre de 2008.
7. Por R. David Rousseau, Tesorero de Nueva Jersey
- 8 No. A 349627
9. Sello del estado de Nueva Jersey.
10. Firma ilegible

Certificado No. 11391753. verificar en línea en https://www.l.state.nj.us&Tytr_standingCert/JSP/Verify_cert.jsp AM 102129

DECLARACIÓN JURADA

Yo, Michelle L. McGowan, por el presente certifico que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión Original (para U.S.S.N. 11/737.674 y todo equivalente legal de la misma en un país extranjero, para la invención titulada "formulaciones nuevas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogenicas" (*Novel formulations which stabilize and inhibit precipitation of immunogenic compositions*)) fechada el 20 de junio de 2007, de Lakshmi Khandlke, Xudong Yang y Hanyoung Han, y fechada el 21 de junio de 2007 de Ronald Malone, y fechada el 22 de junio de 2007 de Jee Loon Look y Robert C. Seid, Jr.; y fechada el 11 de mayo de 2007 de Zhaowei Jin y Ying Chen a Wyeth y que dicha copia es una copia verdadera del original.

Fechada el 17 de diciembre de 2008, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Firma de Michelle L. McGowan

PARA USO EN MEJICO

RECONOCIMIENTO DE FIRMA

Estado De Nueva Jersey}

Condado de Morris }

El 17 de diciembre de 2008, ante mi compareció personalmente Michelle K. McGowan, International Filing Associate (asociada Internacional de presentaciones) de de Wyeth, conocida por mi y a quien conozco como la persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y ella reconoció que lo había suscrito.

Firma de Winifred A. Ventura No. 2334651

Sello de notario público de Nueva Jersey calificado en el condado de Morris. Su cargo vence el 19-9- 2010

Casillero de abogado No. 050765/326014

MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete

Inglés - Español

Resolución No. 2117 del 2008

CESIÓN

Por una contraprestación valiosa, cuyo recibo y suficiencia reconozco por el presente, cada uno de los inventores ha cedido, vendido, transferido y entregado y por el presente cede y vende a WYETH con sede en Five Giralda Farms – Madison, NJ 07940

Sus sucesores y cesionarios, la totalidad del título, derecho e interés en lo que se refiere a los Estados Unidos, sus territorios y posesiones y todos los países extranjeros, en y sobre la invención “Formulaciones nuevas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas”

Tal como establece en la solicitud de patente de los Estados Unidos

☐ suscrita concurrentemente con el presente documento

☐ suscrita en fecha

☒ solicitud no. 11/737.674, presentada el 19 de abril de 2007.

☒ La solicitud reivindica prioridad de la solicitud No. 60/ 795.261, presentada el 26 de abril de 2006, todas las solicitudes anotadas anteriormente se referirán en adelante como “la(s) solicitud(es)”;

Dicha solicitud para patente de los Estados Unidos, incluyendo todas las divisiones, renovaciones, sustituciones, continuación, no provisionales, continuación en parte y solicitudes de Convención basadas total o parcialmente en dichas invenciones o sobre tales solicitudes, y todas las Patente y re-expediciones, re- exámenes, y extensiones de Patentes otorgadas para dichas invenciones o sobre tales solicitudes y cada derecho de prioridad que sea o se pueda predicar o surja de tal invención, solicitud, y dichas Patentes: dicho Cesionario queda por el presente autorizado a presentar solicitudes de patentes en uno o en todos los países o en alguna o en todas las invenciones a nombre del suscrito o a nombre de dicho Cesionario o en sentido diferente tal como lo estime aconsejable el Cesionario, bajo la Convención Internacional o de otra forma; el Comisionado de patentes y marcas comerciales de los Estados Unidos de América queda por el presente autorizado a expedir o transferir todas las Patentes mencionadas a tal Cesionario conforme al presente; esta cesión se hace bajo acuerdo, no solamente en el sentido de que el suscrito tiene poder total para hacer la misma, sino también que tales derechos cedidos no están afectados por ningún otorgamiento, licencia ni por otro derecho dado a la misma, y que el suscrito hará todos los actos razonables que sirvan para asegurar que dichas invenciones, solicitudes de patente y patentes han sido tenidas y usufructuadas por tal Cesionario tan total y completamente tal como las mismas habrían podido ser tenidas y usufructuadas por el suscrito si no se hubiera hecho tal cesión, y en particular para suscribir y entregar a tal Cesionario todos los documentos legales que incluyen peticiones, especificaciones, declaraciones juradas, cesiones, descargo de responsabilidades y declaraciones legales en forma y fondo que puedan ser requeridas por dicho Cesionario, para suministrar a tal Cesionario todos los hechos relacionados con dichas invenciones o la historia de la misma y todos y cada uno de los documentos, fotos, modelos, muestras y otros anexos físicos que pueda incorporar dicha invención, y para certificar en todo proceso referente a dichas invenciones, solicitudes de patentes y /o Patentes.

Por el presente otorgamos a un representante del Cesionario un poder de insertar en esta Cesión cualquier otra identificación que pueda ser necesaria o deseable para cumplir con las reglas de la oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos para el registro de esta cesión.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductora e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés

Fecha: 20 junio de 2007 .

Firma de Lakshmi Khandke

Estado De Nueva York}

Condado de Rockland] .

Ante mi, Janice A. White notario público de Nueva York y para tal condado certifico que compareció personalmente Lakshmi Khandke en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 20 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Janice A. White- notario de N. York No. 01-WH6052604

Sello calificado en el condado Rockland. Su cargo vence el 12-26- 2010

Fecha: 21 junio de 2007 .

Firma de Ronald Malone-

Estado De Nueva York}

Condado de Rockland] .

Ronald Malone

Ante mi, Roseann D. Jastrow notario público de Nueva York y para tal condado certifico que compareció personalmente Roland Malone en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello 21 junio de 2007,

Sello oficial y firma de Roseann D. Jastrow- notario de Nueva York

No. 01- JA 6085816 Sello calificada en el condado Rockland. Su cargo vence el 1-6- 2011

Fecha: 20 junio de 2007 .

Firma de Xudong Yang-

Estado De Nueva York}

Condado de Rockland] .

Xudong Yang

Ante mi, Janice A. White notario público de Nueva York y para tal condado certifico que compareció personalmente Xudong Yang en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 20 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Janice A. White- notario de N. York No. 01-WH6052604

Sello calificada en el condado Rockland. Su cargo vence el 12-26- 2010

Fecha: 20 junio de 2007 .

Firma de Hanyoung Han

Estado De Nueva York}

Condado de Rockland] .

Hanyoung Han

Ante mi, Janice A. White notario público de Nueva York y para tal condado certifico que compareció personalmente Hanyoung Han en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 20 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Janice A. White- notario de N. York No. 01-WH6052604

Sello calificada en el condado Rockland. Su cargo vence el 12-26- 2010

Fecha: 22 junio de 2007 .

Firma de Jee Loon Look

Estado De Maryland}

Condado de Montgomery

Jee Loon Look

Ante mi, Mary Riggen, notario público de tal estado y condado certifico que compareció personalmente Jee Loon Look en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 22 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Mary Riggen- ilegible notario público, su cargo vence el 2-1- 2010.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

testimonio firmo y sello el 22 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Mary Riggen- ilegible notario público, su cargo vence el 2-1-2010.

Fecha: 11 - 5- 2007 .

Firma de Zhaowei Jin

Estado De Carolina del Norte
Condado de Wake

Zhaowei Jin

Ante mi, Edward E. Benton, notario público de tal estado y condado certifico que compareció personalmente Zhaowei Jin esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 11 de mayo de 2007,

Sello oficial y firma de Edward E. Benton- ilegible notario público,
Condado Wake. Carolina del Norte- su cargo vence el 1-2- 2011.

Fecha: 22 junio de 2007 .

Firma de Robert C. Seid, Jr.

Estado De Maryland}
Condado de Montgomery

Robert C. Seid, Jr.

Ante mi, Mary Riggin, notario público de tal estado y condado certifico que compareció personalmente Robert C. Seid en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 22 de junio de 2007,

Sello oficial y firma de Mary Riggin- ilegible notario público, su cargo vence el 2-1- 2010.

--

Fecha: 11 - 5- 2007 .

Firma de Yin Chen

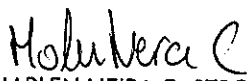
Estado De Carolina del Norte
Condado de Wake

Yin Chen

Ante mi, Edward E. Benton, notario público de tal estado y condado certifico que compareció personalmente YIng Chen en esta fecha y quien reconoció haber suscrito tal documento. En testimonio firmo y sello el 11 de mayo de 2007,

Sello oficial y firma de Edward E. Benton- ilegible notario público,
Condado Wake. Carolina del Norte- su cargo vence el 1-2- 2011.

-Es traducción conforme con copia para confrontar-. Bogotá, enero 14, 2009


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
WINIFRED A VENTURA
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
WINIFRED A VENTURA, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 23RD DAY OF DECEMBER 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A349627
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



A handwritten signature, likely of R. David Rousseau, is written over a horizontal line.

Certificate Number: 113291753

Verify this certificate online at

https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, International Filing Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 11/737,674, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPATATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS") dated June 20, 2007 from Lakshmi Khandke, Xudong Yang and Hanyoung Han; and dated June 21, 2007 from Ronald Malone; and dated June 22, 2007 from Jee Loon Look and Robert C. Seid, Jr.; and dated May 11, 2007 from Zhaowei Jin and Ying Chen to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 17th day of December, 2008, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan
International Filing Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 17th day of December, 2008, before me personally appeared Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Winifred A. Ventura
Notary Public

WINIFRED A. VENTURA
NOTARY PUBLIC, State of New Jersey
No. 2334651
Qualified in Morris County
Commission Expires September 19, 2010

ASSIGNMENT - WORLDWIDE

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, each undersigned inventor has sold and assigned, and by these presents hereby sells and assigns, unto

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940

its successors and assigns, the entire right, title and interest, so far as concerns the United States and the Territories and Possessions thereof and all foreign countries in and to the invention in **"NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS"**

as set forth in this United States Patent Application

- ☐ executed concurrently herewith
- ☐ executed on
- ☒ Application No. 11/737,674; filed April 19, 2007
- ☒ Application claims priority from Application No. 60/795,261, filed April 26, 2006, all applications listed above being hereinafter referred to as the "application(s)";

said application for United States Letters Patent, including all divisional, renewal, substitute, continuation, nonprovisionals, continuation-in-parts, and Convention applications based in whole or in part upon said inventions or upon said applications, and any and all Letters Patent and reissues, reexaminations, and extensions of Letters Patent granted for said inventions or upon said applications and every priority right that is or may be predicated upon or arise from said inventions, said applications, and said Letters Patent; said Assignee being hereby authorized to file patent applications in any or all countries on any or all said inventions in the name of the undersigned or in the name of said Assignee or otherwise as said Assignee may deem advisable, under the International Convention or otherwise; the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States of America being hereby authorized to issue or transfer all said Letters Patent to said Assignee in accordance herewith; this assignment being under covenant, not only that full power to make the same is had by the undersigned, but also that such assigned right is not encumbered by any grant, license, or other right theretofore given, and that the undersigned will do all acts reasonably serving to ensure that the said inventions, patent applications and Letters Patent shall be held and enjoyed by said Assignee as fully and entirely as the same could have been held and enjoyed by the undersigned if this assignment had not been made, and particularly to execute and deliver to said Assignee all lawful documents including petitions, specifications, oaths, assignments, invention disclaimers, declarations, and lawful affidavits in form and substance which may be requested by said Assignee, to furnish said Assignee with all facts relating to said inventions or the history thereof and any and all documents, photographs, models, samples or other physical exhibits which may embody said inventions, and to testify in any proceedings relating to said inventions, patent applications, and/or Letters Patent.

The undersigned hereby grant(s) an authorized representative of Assignee the power to insert in this Assignment any further identification that may be necessary or desirable to comply with the rules of the U.S. Patent and Trademark Office for recordation of this Assignment.

June 20, 2007
Date

Lakshmi Khandke
Lakshmi Khandke

State of New York
County of Rockland

I, JANICE A. WHITE, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Lakshmi Khandke personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 20 day of June, 2007.

(Official Seal)

My commission expires 12-26-2010

Janice A. White
Notary Public

JANICE A. WHITE
Notary Public - State of New York
No. 01-WH6052604
Qualified in Rockland County
My Commission Expires 12-26-2010

21-June-2007
Date

Ronald Malone

Ronald Malone

State of New York

County of Rockland

I, RoseAnn D. Jastraw, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Ronald Malone personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 21st day of June, 2007.

(Official Seal)

RoseAnn D. Jastraw

Notary Public

My commission expires 01-06-2011

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2011

Date 06/20/2007

Xudong Yang
Xudong Yang

State of New York

County of Rockland

I, JANICE A. WHITE, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Xudong Yang personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 20 day of JUNE, 2007.

(Official Seal)

My commission expires 12-26-2010

Janice A. White
Notary Public

JANICE A. WHITE
Notary Public - State of New York
No. 01-WH6052804
Qualified in Rockland County
My Commission Expires 12-26-2010

Date 6/20/2007


Hanyoung Han

State of New York

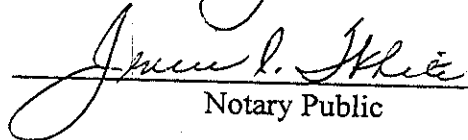
County of Rockland

I, JANICE A. WHITE, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Hanyoung Han personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 20 day of June, 2007.

(Official Seal)

My commission expires 12-26-2010


Notary Public

JANICE A. WHITE
Notary Public - State of New York
No. 01-WH6052604
Qualified in Rockland County
My Commission Expires 12-26-2010

June 22, 2007
Date

Jee Look
Jee Loon Look

State of Maryland

County of Montgomery

I, Mary Riggan, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Jee Loon Look personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 22nd day of June, 2007.

(Official Seal)

My commission expires 2/1/2010

Mary Riggan
Notary Public

05/11/2007
Date

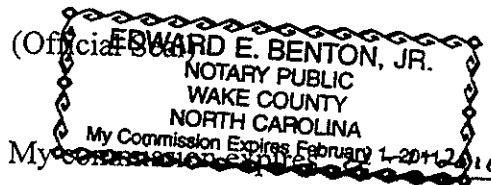
Zhaowei Jin
Zhaowei Jin

State of North Carolina)

County of Wake)

I, Edward E. Benton Jr, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Zhaowei Jin personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 11th day of May, 2007.



Edward E. Benton Jr
Notary Public

Date 22 Jun 07

Robert C. Seid, Jr.
Robert C. Seid, Jr.

State of Maryland

County of Montgomery

I, Mary Riggan, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Robert C. Seid, Jr. personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 22nd day of June, 2007.

(Official Seal)

Mary Riggan
Notary Public

My commission expires 2/1/2010

May 11, 2007
Date

Ying Chen
Ying Chen

State of North Carolina)

County of Wake)

I, Edward E Benton Jr, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Ying Chen personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 11th day of May, 2007.

(Official Seal)
EDWARD E. BENTON, JR.
NOTARY PUBLIC
WAKE COUNTY
NORTH CAROLINA
My Commission Expires February 1, 2011
My commission expires 2/1/2011

Edward E Benton Jr
Notary Public

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 716/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 18 de diciembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión a WYETH del invento titulado "FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM102129

DECLARACIÓN JURAMENTADA

La suscrita, Michelle L. McGowan, Asociada para Registros Internacionales de Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/795,261, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS"), fechada el 3 de mayo de 2006 de Jee Loon Look y Ying Chen a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 9 días del mes de octubre de 2008, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

(Fdo.) Michelle L. McGowan

Michelle L. McGowan
Asociada para Registros Internacionales

PARA USO EN COLOMBIA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
 Condado de Morris)

A los 9 días del mes de octubre de 2008, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Registros Internacionales de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mi haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Barbara A. Kiely
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] Barbara A. Kiely ID. 33893
Notario Público de Nueva Jersey
Mi comisión expira el 20 de junio de 2009

MARIA TERESA LARA B.
TRADUCTORA DE TEX-
RESOLUCION No. 2373
DE MINISTROS

Expediente No: AM102129L1
Patente

Cesión de Inventario

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Jee Loon LOOK
Residencia: 102 Cockleshell Court, Cary, NC 27513
Ciudadanía: Estados Unidos de América
-
- (2) Nombre Completo del Inventor: Ying CHEN
Residencia: 1005 Edinburgh Downs Lane, Apex, NC 27502
Ciudadanía: República Popular China

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/795261 presentada el: 26 de abril de 2006

[X] Yo/nosotros, el suscrito CEDENTE, por la presente autorizo y solicito la inserción anterior del número de solicitud y la fecha de presentación, una vez se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION RA-21419
DE MINISTERIO

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda expedirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA; y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION N. 11111
DE MINISTERIO

(Fdo.) Jee Loon Look
Jee Loon LOOK

3 de mayo de 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Carolina del Norte }
ss:
Condado de Wake }

A los 3 días del mes de mayo de 2006, compareció personalmente ante mí Jee Loon LOOK, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) John U. Mellish
Notario Público

[Sello]

JOHN U. MELLISH
NOTARIO PÚBLICO
CONDADO DE WAKE, N.C.

Mi comisión expira el 13 de diciembre de 2009

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA CERTIFICADA
RESOLUCION N.º 111616
DE MINISTERIO

(Fdo.) Ying Chen
Ying CHEN

3 de mayo de 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Carolina del Norte }
ss:
Condado de Wake }

A los 3 días del mes de mayo de 2006, compareció personalmente ante mí Ying CHEN, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) John U. Mellish
Notario Público

[Sello] JOHN U. MELLISH
NOTARIO PÚBLICO
CONDADO DE WAKE, N.C.
Mi comisión expira el 13 de diciembre de 2009

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Barbara A. Kiely
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Barbara A. Kiely, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey
6. el día 14 de octubre de 2008
7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A342902
9. Sello/Timbre:
10. Firma

(El Gran Sello del
Estado de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

Número del Certificado : 112794440
Verificar este certificado en línea en
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.


María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 14TH DAY OF OCTOBER 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A342902
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. David Rousseau", is written over a horizontal line.

Certificate Number: 112794440

Verify this certificate online at

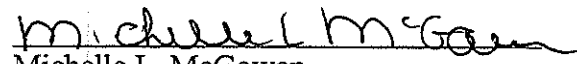
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, International Filing Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/795,261, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS") dated May 3, 2006 from Jee Loon Look and Ying Chen to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 9th day of October, 2008 at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth


Michelle L. McGowan
International Filing Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 9th day of October, 2008 before me personally appeared Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.


Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: Jee Loon LOOK
Residence: 102 Cockleshell Court, Cary, NC 27513
Citizenship: United States of America
-
- (2) Full Name of Inventor: Ying CHEN
Residence: 1005 Edinburgh Downs Lane, Apex, NC 27502
Citizenship: People's Republic of China
-

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

**NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF
IMMUNOGENIC COMPOSITIONS**

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/795261 filed on: April 26, 2006

- ☒ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Jee Look

Jee Loon LOOK

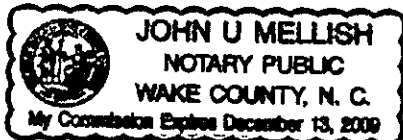
May 3, 2006

Date

ACKNOWLEDGMENT

State of North Carolina }
County of Wake } ss:

On the 3rd day of May 2006, Jee Loon LOOK personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



[Signature]
Notary Public

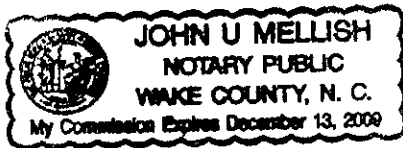
Ying Chen
Ying CHEN

May 3, 2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of North Carolina }
County of Wake } ss:

On the 3rd day of May 2006, Ying CHEN personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



John U. Mellish
Notary Public

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 446/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 4 de agosto de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por WYETH para su representación en relación con asuntos de propiedad industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Michelle L. McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

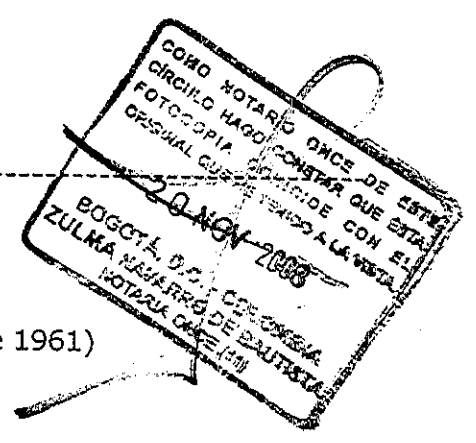
EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

(Fdo.) Michelle L. McGowan

[Sello] MICHELLE L. MCGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

000005

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey
6. el día 28 de julio de 2008
7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A334737
9. Sello/Timbre:
10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

Maria Teresa Lara R.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



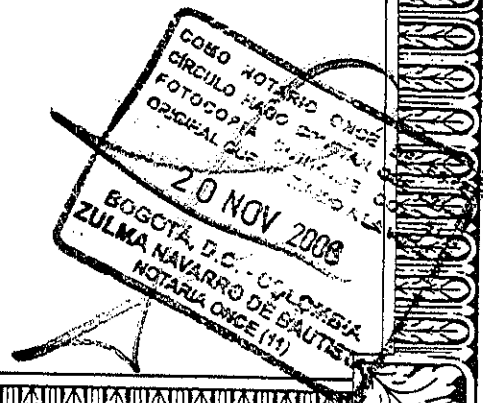
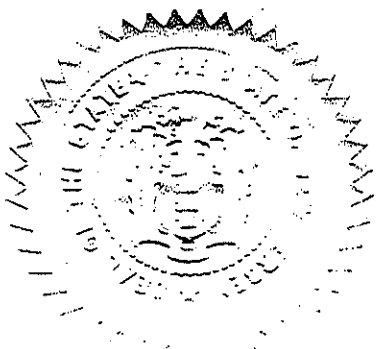
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A334737
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Colombia

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 860.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

WYETH

with offices at

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Baker & McKenzie Colombia S.A., with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient Power of Attorney to obtain the protection of my (our) industrial property for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before administrative, and judicial authorities or persons, in all matters concerning the following: a) obtainment of patents, including filing of assignments, change of name or address, and at my (our) specific direction, voluntary cancellation, defending and filing of oppositions, cancellations, annulment and criminal actions, and in general the civil, criminal, and administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 25th day of July, 2008

Gale F. Matthews
Assistant Secretary

Signature of the person issuing the Power

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

todos miembros de la firma de abogados Baker & McKenzie Colombia S.A., con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder amplio y suficiente para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial a, cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante autoridades o personas del orden administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes, incluyendo presentación de trasposos, cambio de nombre o dirección y bajo mi (nuestra) expresa(s) instrucción(es), cancelación voluntaria, defensa y presentación de oposiciones, cancelaciones, nulidades, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

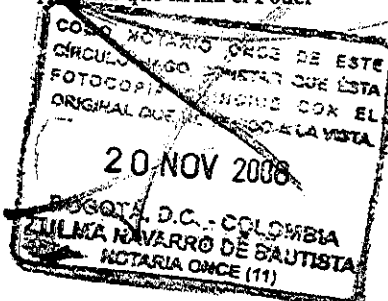
Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 25 días del mes de julio de 2008

Gale F. Matthews
Subsecretario

Firma de la persona que firma el Poder



NOTARIAL CERTIFICATION

On this 25th day of July
2008, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Gale F. Matthews

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in
Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on May 24, 2008.

Michelle L. McGowan
Notary Public

MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 25 días del mes de julio
de 2008, el suscrito Notario

- 1 Que Gale F. Matthews **DA FE**

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

- 3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

- 4 Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

- 5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de la Junta Directiva celebrada el 24 de mayo de 2008.

