

Doctor

José Luis Salazar

Jefe de División de Nuevas Creaciones (C)

SUPERINTENDENCIA DE INDUS

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125423- -00007-0000

Fecha: 2012-10-05 16:39:09

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 523 RESPUESTA

Folios: 119

Referencia: Expediente No. 08.125.423

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Formulaciones novedosas que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas"

Solicitante: Wyeth

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 312**DEL 8 DE JUNIO DE 2012, OFICIO NO. 10028 (EXAMEN DE FONDO)**

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término de prórroga solicitado en nuestro memorial con radicado No. 08-125423-00006:

1. Objeciones del Examinador**1.1 Reivindicaciones**

1.1.1 Su Despacho sugiere retirar la palabra "aproximadamente" de las reivindicaciones.

1.1.2. Considera también que la expresión "un surfactante" es imprecisa.

1.1.3. Estima que la expresión "una sal de aluminio" no es clara.

1.1.4. Dice que la palabra "recipiente" no es clara.

1.1.5. Dice que la reivindicación 23 depende de la misma reivindicación 23 y que por lo tanto se debe corregir el error.

1.1.6. Establece que el término "polisorbato 89" no es conocido en el campo técnico y solicita aclaración.

1.1.7. Finalmente, dice que la expresión "uno o más" es imprecisa.

1.2 Unidad de Invención

Su Despacho considera que la presente invención presenta 6 diferentes grupos inventivos y sugiere solo dejar uno.

1.3 Novedad

El Examinador plantea que, después de realizada la búsqueda de anterioridades, encontró documentos que afectan la novedad de las reivindicaciones 1, 4 - 13, 24 - 27 y 29 - 30, además de la 31, 34 - 36 y 40 de la presente solicitud.

Particularmente, el Examinador considera que los documentos CO 07-117685 (D1) y EP 0941738 (D2) afectan la novedad de la presente solicitud por cuanto:

“Las características esenciales de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en D1, el cual da a conocer una formulación inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína (Folio 85; línea 20), donde el conjugado se selecciona entre el conjugado neumocócico 13-valente (13vPnC9) (Folio 84, línea 26) y el conjugado de Streptococcus pneumoniae unido a una proteína portadora CRM17 (Folio 85, línea 4-9). Adicionalmente, revela que la formulación inmunogénica comprende uno o mas adyuvantes, con el fin de mejorar la efectividad de la composición, entre los que se incluyen

1. sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. (Folio 102; línea 14-21)

2. Formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos entre los que se encuentra MF59 compuesto de Escualeno 5%, Tween 0,5 y 0,5% de Span 85 o el sistema adyuvante Ribi® compuesto de Escualeno 2%, Tween 80, 0,2% y uno o mas componentes de pared celular bacteriana (Folio 103; línea 4 - 5 y 17 - 18).

De igual manera D1 divulga la formulación de una vacuna de conjugado neumocócico multivalente, en donde se incluye un amortiguador de succinato de sodio 5 mM a pH 5,8. (Folio 103; línea 25 - 28; ejemplo 15).

En consecuencia, las reivindicaciones 1 y 24 carecen de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones dependientes 4 - 13, 25 - 27 y 29 - 30 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de las reivindicaciones 1 y 24 por lo cual se considera que no son nuevas."

(...)

Las características esenciales de la composición de la reivindicación 31 habían sido divulgadas previamente en D2, el cual da a conocer una formulación antigénica que contiene una porción de lipopolisacárido el cual es utilizado en el desarrollo de vacunas. El documento D2 divulga que las estructuras de sacáridos pueden ser conjugadas con portadores de proteínas (Pág. 2; líneas 44 - 48), útiles en la preparación de conjugados antigénicos que incluyen toxinas bacterianas y toxoides entre los que se encuentran, peptidasa de C5a de estreptococo, Neisseria meningitidis, en donde el portador de proteína preferido es CRM-197 (Pág; línea 28 - 36; Párrafo 37).

De igual manera, D2 enseña que la formulación de un conjugado de antígeno contiene adyuvantes adecuados en el uso de formulaciones de vacunas, que pueden aumentar la respuesta inmune al antígeno, cuyo uso es conocido en el estado de la técnica. Los adyuvantes se seleccionan entre fosfato de aluminio (sal de aluminio) o hidróxido de aluminio (Pág. 7; línea 37 - 43; Párrafo 38). El documento D2 enseña adicionalmente la presencia de soluciones búfer, seleccionadas entre de solución salina de fosfatos o de bicarbonato de sodio los cuales tienen un pH neutro a ligeramente alcalino (Pág. 5; línea 55 - 56; Párrafo 30).

En consecuencia, las reivindicaciones 31 y 40 carecen de novedad, según lo divulgado en el documento D2.

Las reivindicaciones dependientes 34 - 36 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de las reivindicaciones 31 y 40, por lo cual se considera que no son nuevas."

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1 Reivindicaciones

En respuesta a las objeciones de su Despacho los términos "aproximadamente", "un surfactante", "una sal de aluminio", "recipiente", "de la reivindicación 23", "polisorbato 89" y "uno o más", se han modificado o suprimido en el nuevo capítulo reivindicatorio que el solicitante ha decidido presentar. De acuerdo con lo anterior estas objeciones se deben considerar como superadas.

2.2 Unidad de invención

En cuanto a la unidad de invención en el nuevo capítulo reivindicatorio el solicitante ha limitado la invención a lo que su Despacho denominó como invención 1. Por lo tanto se debe considerar como superada esta objeción.

2.3 Novedad

La novedad de una solicitud está legalmente definida en el Artículo 16 de la Decisión 486 así: *"una invención se considerará nueva, cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso de la prioridad reconocida..."*

En virtud de la anterior definición, consideramos que los documentos D1 y D2 no constituyen documentos del arte previo que afecten la novedad de la presente solicitud.

Su Despacho considera que la referencia D1 afecta la novedad de las reivindicaciones

1, 4 - 13, 24 - 27 y 29 - 30 de la presente invención. Sin embargo, D1 no describe la formulación de la nueva reivindicación 1, en particular que el polisorbato 80 está presente a una concentración final de 0,01% a 0,05% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

La formulación de vacunas es un campo no predecible y las formulaciones que son efectivas para estabilizar y preservar un inmunógeno de unas especies de bacteria no serán necesariamente efectivas se esperaría que fueran efectivas para un inmunógeno de especies de bacterias diferentes.

Los solicitante han demostrado de manera sorprendente que las formulaciones que comprenden (i) una solución salina tamponada de pH, en donde el tampón tiene un pKa de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5, (ii) polisorbato 80 a una concentración final de 0,01% a 0,05% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación, y
iii) 13 conjugados de polisacárido-proteína de neumococo que son estables y retienen su inmunogenicidad (ver ejemplo 1 de la presente solicitud).

Estabilizar un producto de complejo tal como 13vPnC (una vacuna de conjugado de polisacárido-proteína de neumococo de valencia 13 que comprende polisacáridos capsulares de 13 diferentes serotipos conjugados a una proteína portadora) es conocido en la técnica por representar un reto. Los solicitantes de manera sorprendente han encontrado que aún a una concentración muy baja de polisorbato 80 se mejora de manera notoria la estabilidad del 13vPnC.

Adicionalmente, a una baja concentración de tensoactivo tal como polisorbato 80 se incrementa la seguridad de la formulación.

Como se muestra en el ejemplo 1, el polisorbato 80 (también conocido como Tween 80) a una concentración de 0,001% a 0,05% estabiliza mayormente el 13vPnC y evita la agregación. Se observó mediante inspección visual que el 13vPnC formulado en ausencia de polisorbato 80 comenzaría a precipitarse en la solución en 10 minutos a 2 - 8 ° C con agitación suave por vía de un agitador orbital horizontal. En contraste, el 13vPnC formulado en 0,001%, 0,005%, 0,01 % o 0,05% de polisorbato 80 y agitado suavemente a 2 - 8 ° C era estable hasta por 25 días sin signos visibles de precipitación (ver página 54, último párrafo a página 55, primeras 3 líneas). Así, estos datos demuestran que la adición de un tensoactivo

tal como polisorbato 80 a una concentración de 0,001% a 0,05% mejora la estabilidad de la composición inmunogénica.

Un segundo experimento de estabilidad confirmó, además, que la adición de polisorbato 80 a la formulación a la concentración actualmente reivindicada mejoró significativamente la estabilidad del 13vPnC como se demostró mediante el ensayo de inmunogenicidad de 2 horas. Como se muestra en la tabla 1 (ver página 28), los solicitantes observaron una disminución significativa en la antigenicidad de los polisacáridos de 13 serotipos en una formulación de polisorbato 80. Sin embargo, la formulación 13vPnC que comprende 0,05% de polisorbato 80, demostró gran estabilidad en las dos horas del ensayo de antigenicidad (ver tabla 1).

Adicionalmente, la formulación 13vPnC con baja concentración de polisorbato 80 se estabilizó significativamente contra las altas fuerzas de corte (ver página 56 - 58 y tabla 2). Como se ve en la tabla 2, la formulación de 13vPnC sin polisorbato 80 tuvo en promedio un 20% de disminución en la antigenicidad después del sometimiento a agitación (de vórtice). La 13vPnC formulada con 0,05% de polisorbato 80 tuvo una disminución en la antigenicidad que varía de 2 - 10 % (promedio 8%) y el 13vPnC formulado con 0,05% de polisorbato 80 tuvo una disminución en la antigenicidad de 0 - 8 % (promedio 3%). Así, los datos presentados en la tabla 2 demuestran que la 13vPnC formulada con 0,001% a 0,05% de polisorbato 80 se estabilizó significativamente contra las fuerzas de corte con relación al 13vPnC formulado sin polisorbato 80.

Al menos por estas razones, la nueva reivindicación 1 es novedosa y posee nivel inventivo sobre la técnica anterior. Las nuevas reivindicaciones 2 a 16 dependen de la limitación de la reivindicación 1. De acuerdo con esto las reivindicaciones 2 a 16 también son novedosas y poseen nivel inventivo sobre los documentos de la técnica anterior.

3. Solicitudes concedidas en otros países para esta misma invención.

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que patentes en México, Australia, Eurasia, Singapur y en los estados Unidos han sido otorgadas. Aún cuando entiendo que estas decisiones de ninguna manera obligan al Despacho para decidir de igual

forma, considero que por tratarse de una pregunta fáctica la determinación de la existencia de novedad, las decisiones de otras oficinas de patentes constituyen un antecedente persuasivo en la materia.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ
C.C.No.79.143.366 de Usaquén
T.P.20.281

Anexos: Capítulo reivindicatorio modificado
 Recibo por reivindicación adicional a la 10
 Solicitud divisional
 Copia de las Patente 7,935,787 de los Estados Unidos

BM_RAC/BOGDMS-#1227845-V1-P2008_000476-MEMORIAL_RESP_PRIMER_FONDO.DOC

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que estabiliza un conjugado de polisacárido-proteína, la formulación comprendiendo (I) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón tiene un pKa de 3,5 a 7,5 y pH de 5,5 a 7,5, (ii) polisorbato 80 a una concentración final de 0,01% a 0,05% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación y (iii) conjugados de polisacárido-proteína que comprenden un polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 14, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae*, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* y 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*.

2. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual dicho tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato.

3. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y

9

pH 5,8 a 6,0.

4. La formulación de la Reivindicación 3, en la cual la concentración final del tampón de succinato es 5mM.

5. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en la cual 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. La formulación de la Reivindicación 5, en la cual la sal en la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio.

7. La formulación de la Reivindicación 6, en la cual dicho tampón es histidina y en donde la sal en la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio.

8. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, la cual comprende además polisacáridos de meningococo, una o más proteínas antigénicas de meningococo o una combinación de los mismos.

9. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, la cual comprende además polisacáridos de estreptococo, una o más proteínas antigénicas de estreptococo o una combinación de

los mismos.

10. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en la cual la formulación del conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo de valencia 13 (13vPnC) 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, 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 7F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇ y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

11. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a

10, en la cual la formulación comprende además un adyuvante.

12. La formulación de la Reivindicación 12, en el cual el adyuvante es fosfato de aluminio.

13. Una formulación que estabiliza un conjugado de polisacárido-proteína, la formulación comprende:

(i) una solución salina tamponada de pH, donde el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5.8 a 6.0,

(ii) polisorbato 80 a una concentración final de 0,01% a 0,05% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación, y

(iii) 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 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae*

12

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

14. La formulación de la Reivindicación 13, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 5 mM.

15. La formulación de las Reivindicaciones 13 o 14, en la cual la sal en la solución salina tamponada de pH comprende cloruro de sodio.

16. La formulación de las Reivindicación 13, 14 o 15, en la cual la formulación comprende además un adyuvante y en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.



US007935787B2

(12) **United States Patent**
Khandke et al.

(10) **Patent No.:** **US 7,935,787 B2**
(45) **Date of Patent:** **May 3, 2011**

- (54) **FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS**
- (75) Inventors: **Lakshmi Khandke**, Nanuet, NY (US); **Ronald Malone**, Madison, NJ (US); **Xudong Yang**, Tappan, NY (US); **Hanyoung Han**, Fort Lee, NJ (US); **Jeon Loon Look**, Gaithersburg, MD (US); **Zhaowei Jin**, Cary, NC (US); **Robert C. Seid, Jr.**, Gaithersburg, MD (US); **Ying Chen**, Apex, NC (US)
- (73) Assignee: **Wyeth LLC**, Madison, NJ (US)
- (*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 570 days.
- (21) Appl. No.: **11/737,674**
- (22) Filed: **Apr. 19, 2007**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2007/0253984 A1 Nov. 1, 2007
- Related U.S. Application Data**
- (60) Provisional application No. 60/795,261, filed on Apr. 26, 2006.
- (51) **Int. Cl.**
A61K 31/715 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
- (52) **U.S. Cl.** **530/350; 514/54**
- (58) **Field of Classification Search** None
See application file for complete search history.
- (56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,673,574	A	6/1987	Anderson
4,902,506	A	2/1990	Anderson et al.
4,912,094	A	3/1990	Myers et al.
5,057,540	A	10/1991	Kensil et al.
5,078,996	A	1/1992	Conlon et al.
5,118,794	A	6/1992	Grangeorge
5,163,918	A	11/1992	Righi
5,254,339	A	10/1993	Morein
5,614,382	A	3/1997	Metcalfe
5,723,127	A	3/1998	Scott et al.
6,113,918	A	9/2000	Johnson et al.
6,207,646	B1	3/2001	Krieg et al.
6,224,880	B1	5/2001	Chan et al.
6,270,775	B1	8/2001	Cleary
6,355,255	B1	3/2002	Cleary et al.
6,951,653	B2	10/2005	Cleary et al.
2004/0047882	A1	3/2004	Broeker
2006/0228380	A1 *	10/2006	Hausdorff et al. 424/244.1
2008/0069835	A1	3/2008	Boutriaux

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

EP	0 941 738	A1	9/1999
EP	0941738	A1	9/1999
EP	1296713	B1	2/2003
EP	1326634	B1	7/2003
JP	7236483		9/1995
JP	10201844		8/1998

RU	37462	4/2004
UA	67144	6/2004
WO	WO 92/19265	11/1992
WO	WO 93/13202	7/1993
WO	WO9813052	4/1998
WO	WO 00/18434	4/2000
WO	WO 01/41800	A2 6/2001
WO	WO 2004/083251	A2 9/2001
WO	WO 02/05846	A1 1/2002
WO	WO 02/098368	A2 12/2002
WO	WO 02/098369	A2 12/2002
WO	WO 03/039485	A2 5/2003
WO	WO 03/063766	A2 8/2003
WO	WO 2004/065603	A2 8/2004
WO	WO 2004/094596	A2 11/2004
WO	WO 2005/039620	A1 5/2005

OTHER PUBLICATIONS

Baldwin, R.N., "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", 1988, *Diabetic Medicine*, vol. 5, pp. 789-790.

Bartzoka, Brook and McDormott, Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces. In K.L. Mittal and P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, New York, pp. 371-380, 2000.

U.S. Appl. No. 60/795,098, filed Apr. 26, 2006, Look et al.

Bartzoka, Vasiliki et al., "Silicone-Protein Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction", 1998, *Langmuir*, vol. 14, pp. 1892-1898.

Bartzoka, Vasiliki, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?", 1998, *Langmuir*, vol. 14, pp. 1887-1891.

Bartzoka, Vasiliki, "Protein-Silicone Synergism at Liquid/Liquid Interfaces", 2000, *Langmuir*, vol. 16, pp. 4589-4593.

Bernstein, Richard K., "Clouding and Deactivation of Clear (Regular) Human Insulin: Association with Silicone Oil from Disposable Syringes?", 1987, *Diabetes Care*, vol. 10, pp. 786-787.

Bolgiano, Barbara et al., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", 2001, *Vaccine*, vol. 19, pp. 3189-3200.

Chantelau, Ernst A. and Berger, Michael, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", 1985, *Lancet*, vol. 1, p. 1459.

Chantelau, E. et al., "Silicone oil released from disposable insulin syringes", 1986, *Diabetes Care*, vol. 9, pp. 672-673.

Chantelau, E., "Silicone oil contamination of insulin", 1989, *Diabetic Medicine*, vol. 6, p. 278.

Collier, Fred C. and Dawson, Arthur D., "Insulin syringes and silicone oil", 1985, *Lancet*, vol. 326, p. 611.

(Continued)

Primary Examiner — Mark Navarro

(57) **ABSTRACT**

The present invention addresses an ongoing need in the art to improve the stability of immunogenic compositions such as polysaccharide-protein conjugates and protein immunogens. The invention broadly relates to novel formulations which stabilize and inhibit precipitation of immunogenic compositions. More particularly, the invention described hereinafter, addresses a need in the art for formulations which stabilize and inhibit particulate formation (e.g., aggregation, precipitation) of immunogenic compositions which are processed, developed, formulated, manufactured and/or stored in container means such as fermentors, bioreactors, vials, flasks, bags, syringes, rubber stoppers, tubing and the like.

26 Claims, 9 Drawing Sheets

then dialyzed twice against a 30-fold excess of 25 mM NaAc/1% Z3-14 pH 4.5, and passed over a cation exchange chromatography column. The rLP2086 was eluted with a 0-0.3M NaCl gradient and stored frozen (-25° C.).

The purified rLP2086 was then formulated with 150 mM NaCl, 0.020% Tween™80, 0.25 mg Al/mL of AlPO₄, and in the following buffers: 10 mM phosphate buffer at pH 7.0 and 5 mM succinate buffer at pH 6.0. Table 8 compares protein binding percentage to the AlPO₄ adjuvant.

TABLE 8

RLP2086 BINDING TO ADJUVANT		
Buffer	Total Protein Conc. (µg/mL)	AlPO ₄ Bound Protein (%)
10 mM Phosphate buffer pH 7.0 containing 150 mM NaCl, 0.02% polysorbate 80 and 0.25 mg Al/mL of AlPO ₄	400	68
5 mM Succinate buffer pH 6.0 containing 150 mM NaCl, 0.02% polysorbate 80 and 0.25 mg Al/mL of AlPO ₄	120	82
	400	81
	120	100

REFERENCES

Baldwin, "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", *Diabet. Med.*, 5:789-790, 1988.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces. In K. L. Mittal and P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, New York, pp. 371-380, 2000.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction", *Langmuir* 14:1892-1898, 1998^b.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?", *Langmuir* 14:1887-1891, 1998^a.

Bartzoka, Chan and 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 et al., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 19:3189-3200, 2001.

Chantelau and Berger, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", *Lancet*, 1:1459, 1985.

Chantelau et al., "Silicone oil released from disposable insulin syringes", *Diabetes care*, 9:672-673, 1986.

Chantelau, "Silicone oil contamination of insulin", *Diabet. Med.*, 6:278, 1989.

Chantelau, Burger and Bohiken, "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 et al., "Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 20:3509-3522, 2002.

Ho et al., "Solution Stability of the Subunit Components of Meningococcal C Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Biotech. Appl. Biochem.*, 33:91-98, 2001.

Jones et al., "Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins", *J. Pharmaceutical Sci.*, 94(4):918-927, 2005.

Kajihara et al., "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*, May 2003.

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

What is claimed is:

1. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5,

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.001% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation, and

(iii) one or more polysaccharide-protein conjugates comprising one or more pneumococcal polysaccharides.

2. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is comprised in a container means selected from one or more of the group consisting of a vial, a vial stopper, a vial closure, a glass closure, a rubber closure, a plastic closure, a syringe, a syringe stopper, a syringe plunger, a flask, a beaker, a graduated cylinder, a fermentor, a bioreactor, tubing, a pipe, a bag, a jar, an ampoule, a cartridge and a disposable pen.

3. The formulation of claim 2, wherein the container means is siliconized.

4. The formulation of claim 1, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM.

5. The formulation of claim 1, wherein the polysorbate 80 has a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

6. The formulation of claim 1, further comprising one or more meningococcal polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

7. The formulation of claim 1, further comprising one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

8. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is a 7-valent pneumococcal conjugate (7vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

9. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumo-*

US 7,935,787 B2

33

niae serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

10. The formulation of claim 1, wherein the formulation further comprises an adjuvant.

11. The formulation of claim 10, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

12. The formulation of claim 9, wherein the formulation further comprises an adjuvant.

13. The formulation of claim 12, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

14. The formulation of claim 13 wherein the aluminum phosphate is present at a final concentration of about 0.25 mg/mL.

15. The formulation of claim 9, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.

16. The formulation of claim 1, wherein the buffer is phosphate, succinate, histidine or citrate.

17. The formulation of claim 3, wherein the succinate buffer has a pH of 5.8 to 6.0.

18. The formulation of claim 1, wherein the pH buffered saline solution contains sodium chloride.

19. The formulation of claim 15, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 5 mM.

20. The formulation of claim 19, wherein the buffer is at pH 5.8.

21. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer is succinate at a final concentration of about 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0;

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation;

(iii) a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide; and

(iv) an adjuvant comprising aluminum phosphate present at a final concentration of about 0.25 mg/mL.

34

to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

22. The formulation of claim 21, wherein the final concentration of the succinate buffer is 5 mM.

23. The formulation of claim 21, wherein the pH buffered saline solution contains sodium chloride,

24. The formulation of claim 23, wherein the sodium chloride is present at a final concentration of 150 mM.

25. The formulation of claim 21, wherein the formulation further comprises an adjuvant, the adjuvant being aluminum phosphate.

26. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution containing sodium chloride, wherein the buffer is succinate at a final concentration of about 5 mM and pH 5.8;

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation;

(iii) a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide; and

(iv) an adjuvant comprising aluminum phosphate present at a final concentration of about 0.25 mg/mL.

* * * * *

2012/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 104341	
				Bogotá D.C., Octubre 04 de 2012 - 08:23:01	
RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE				NI 900.034.906	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	85738	22/08/2012		590.000.00
RECIBO DE CA	999999999	85739	22/08/2012		590.000.00
RECIBO DE CA	999999999	91864	06/09/2012		10.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS		1.190.000.00	1.190.000.00	
				\$1.190.000.00	
=====					
SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
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					
Octubre 4 de 2012 - 08:23:02					

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

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, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente <u>08.125.423</u> De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____
5. Comprobante de Pago No _____ Fecha <u>DD / MM / AA</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	

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, 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 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, octoxinol 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

32

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

41

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 cor-
tantes) 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)

45

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 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

42

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

48

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, oxtoxinol 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, MPL™ (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]-b-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, *Bortedella* destruida, saponinas, tal como Stimulon™ 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 una 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 diphteria* (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-

21

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 HYPAKTM 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				13vPnC con el 0,05% Tween80			
Serotipo	Antigenici- dad 0 min	Antigenici- dad 30 min	Antigenici- dad 120 min	Serotipo	Antigenici- dad 0 min	Antigenici- dad 30 min	Antigenici- dad 120 min
1	4.8 µg/ml	4.2 µg/ml	2.4 µg/ml	1	5.1 µg/ml	5.0 µg/ml	5.2 µg/ml
3	4.8 µg/ml	4.1 µg/ml	1.7 µg/ml	3	5.0 µg/ml	5.0 µg/ml	5.2 µg/ml
4	5.8 µg/ml	5.0 µg/ml	3.1 µg/ml	4	6.1 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
5	3.4 µg/ml	3.0 µg/ml	2.0 µg/ml	5	3.6 µg/ml	3.6 µg/ml	3.7 µg/ml
6A	4.9 µg/ml	3.8 µg/ml	1.3 µg/ml	6A	5.4 µg/ml	5.4 µg/ml	5.6 µg/ml
6B	10.0 µg/ml	5.6 µg/ml	1.4 µg/ml	6B	10.6 µg/ml	10.6 µg/ml	10.5 µg/ml
7F	4.7 µg/ml	3.4 µg/ml	1.0 µg/ml	7F	5.3 µg/ml	5.2 µg/ml	5.3 µg/ml
9V	5.6 µg/ml	4.7 µg/ml	2.5 µg/ml	9V	6.1 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
14	7.6 µg/ml	6.4 µg/ml	3.0 µg/ml	14	8.2 µg/ml	8.3 µg/ml	8.3 µg/ml
18C	5.6 µg/ml	4.4 µg/ml	1.7 µg/ml	18C	6.2 µg/ml	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml
19A	6.4 µg/ml	4.5 µg/ml	1.9 µg/ml	19A	6.8 µg/ml	6.8 µg/ml	6.8 µg/ml
19F	5.4 µg/ml	2.8 µg/ml	0.0 µg/ml	19F	6.1 µg/ml	6.2 µg/ml	6.0 µg/ml
23F	4.5 µg/ml	2.8 µg/ml	0.9 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

EFECTO ESTABILIZADOR DE TWEENTM80 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	3.8 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

79

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

EFEECTO 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 μ L (1,43%)	Particulados
Jeringas Schott TopPac	4	Sin Particulado

Se seleccionó el serotipo 6B *S. pneumoniae* monovalente como un modelo para el 13vPnC y se formuló a 61,6 μ g/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 Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra
5 ppm (2,5 µl de Si en 500 mL de La Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra
10 ppm (5 µl de Si en 500 mL de La Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra
15 ppm (7,5 µl de Si en 500 mL de La Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra
20 ppm (10 µl de Si en 599 mL de La Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra
100 ppm (2 µl de Si en 20 mL de La Formulaci3n)	Particulados blancos como fibra

Tambi3n se examin3 la cantidad de silicona en las formulaciones de 13vPnC (sin AlPO_4). Se determin3 la concentraci3n de silicona mediante Espectroscopia de Emisi3n de Plasma DC (datos no mostrados). En este m3todo, se combin3 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 seg3n los m3todos existente para la determinaci3n 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 blancos como fibra
200 $\mu\text{g/mL}$ del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Particulados blancos como fibra

EJEMPLO 4

LOS ADYUVANTES DE ALUMINIO INHIBEN LA FORMACIÓN DE PARTICULADOS 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 con-
tentivo del 0,85% NaCl y 4,4 µg/ml de serotipos 1, 3, 4,
5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F y 8,8 µg/ml de se-
rotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 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. Los recipientes en-

sayados se enumeran a continuación en la Tabla 6.

TABLA 6

RECIPIENTES

	Recipientes	Descripción
1	Jeringas Vetter Tipo 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 BänderGlas (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 BänderGlas (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 lipídado recombinante (rLP2086) utilizada en este ejemplo fue expresada y purificada de la manera siguiente. Se expresó rLP2086 recombinantemente 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 lipídado 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

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. 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 aproximadamente de 3,5 hasta aproximadamente 7,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína.
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde el tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato.
3. La formulación de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la solución salina tamponada de pH tiene un pH de 5,5 a 7,5.
4. La formulación 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. La formulación 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. La formulación de la reivindicación 1, en donde dicha solución salina tamponada de pH tiene un pH de 5,5 a 7,5, en donde dicho tampón es histidina y en donde la sal en la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio.

7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste de polisorbato 20 (TwennTM20), polisorbato 40 (TwennTM40), polisorbato 60 (TwennTM60), polisorbato 65 (TwennTM65), polisorbato 80 (TwennTM80), polisorbato 85 (TwennTM85), TritonTM N-1 01, TritonTM X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato, polipeptido de trietanolamina, polioxietileno-660 hidroxiestearato (PEG-15, Solutol H-15), polioxietileno-35 ricinolato (Cremophor ELTM), lecitina de soya y poloxámero.

8. La formulación de la reivindicación 7, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

9. La formulación 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. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación comprende, además, uno o más adyuvantes.

11. La formulación de la reivindicación 10, en donde dicho adyuvante es una sal de aluminio.

12. La formulación de la reivindicación 11, en donde dicha sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.

13. La formulación de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o mas polisacáridos de neumococo.

14. La formulación de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende, además, uno o mas polisacáridos de meningococo, una o

mas proteínas antigénicas de meningococo, o una combinación de las mismas.

15. La formulación de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende, además, uno o mas polisacáridos de estreptococo, una o mas proteínas de antígeno de estreptococo, o una combinación de las mismas.

16. La formulación de las reivindicaciones 1 a 15, 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.

17. La formulación de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la 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 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* 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 7F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇ y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₉₇.

18. La formulación de las reivindicaciones 1 a 17, en donde dicho tampón es un tampón de succinato a una concentración final de 5 mM.

19. La formulación de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el conjugado de polisacárido-proteína comprende una o mas polisacáridos de neumococo, el tampón es histidina, la sal en la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio y la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

20. La formulación de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el conjugado de polisacárido-proteína comprende una o mas polisacáridos de neumococo, el tampón es histidina a pH 5,8, la sal en la solución salina tamponada de pH es cloruro de sodio y la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

21. Una formulación que estabiliza una composición de proteína de *N. meningitidis* 2086, la formulación comprende (i) una solución salina tamponada de pH, en donde el tampón tiene un pKa de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5, (ii) un tensioactivo y (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086.

22. La formulación de la reivindicación 21, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

23. La formulación de la reivindicación 22, en donde la formulación comprende, además, un adyuvante de sal de aluminio.

24. Una formulación que inhibe la agregación inducida por silicona de una composición de proteína de *N. meningitidis* 2086 comprendida en un medio de recipiente siliconado, la formulación comprende (i) una solución salina tamponada de pH, en donde el tampón tiene un pKa de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5, (ii) una sal de aluminio (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086.

FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN

LA PRECIPITACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

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.

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.

1/9

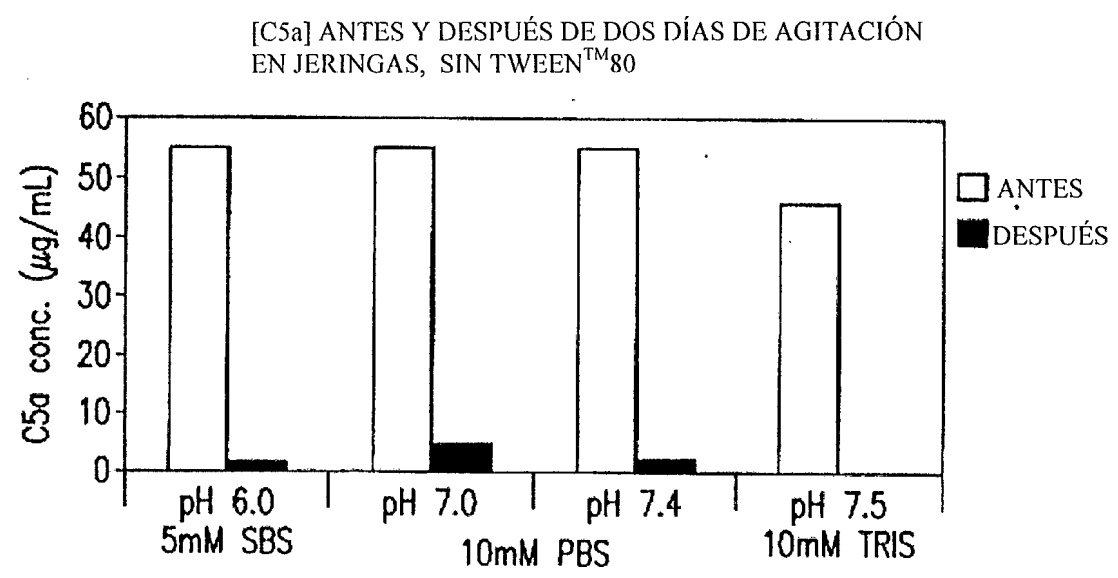


FIG.1A

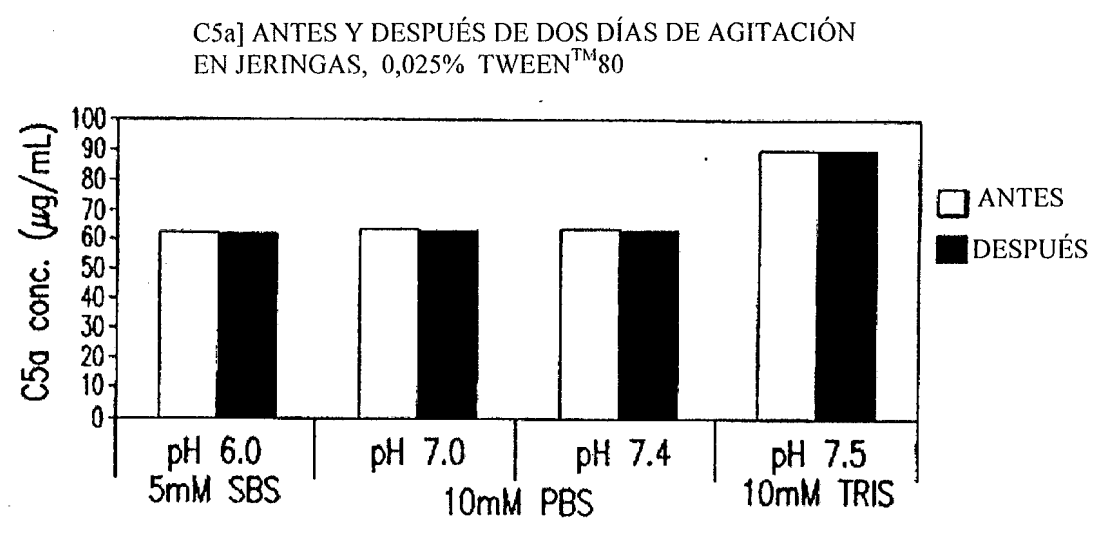


FIG.1B

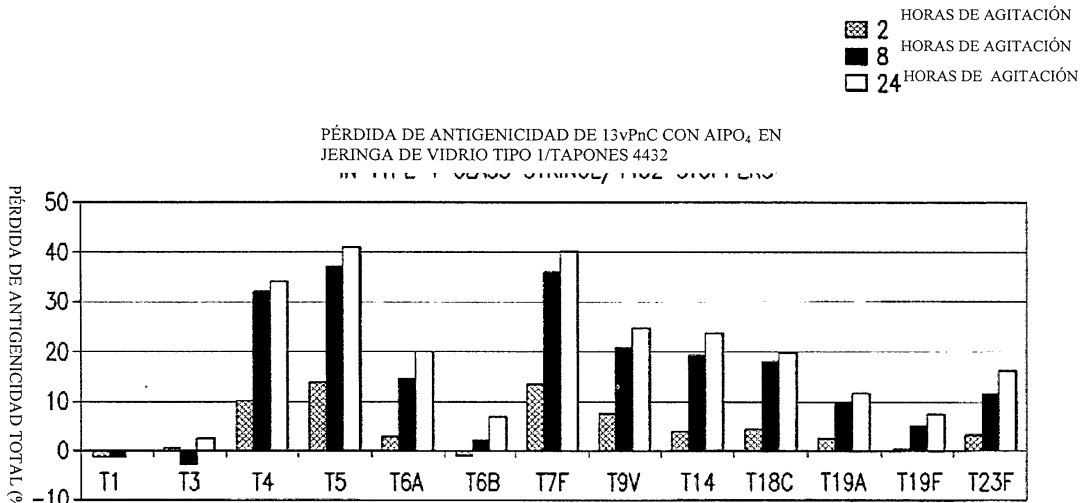


FIG.2

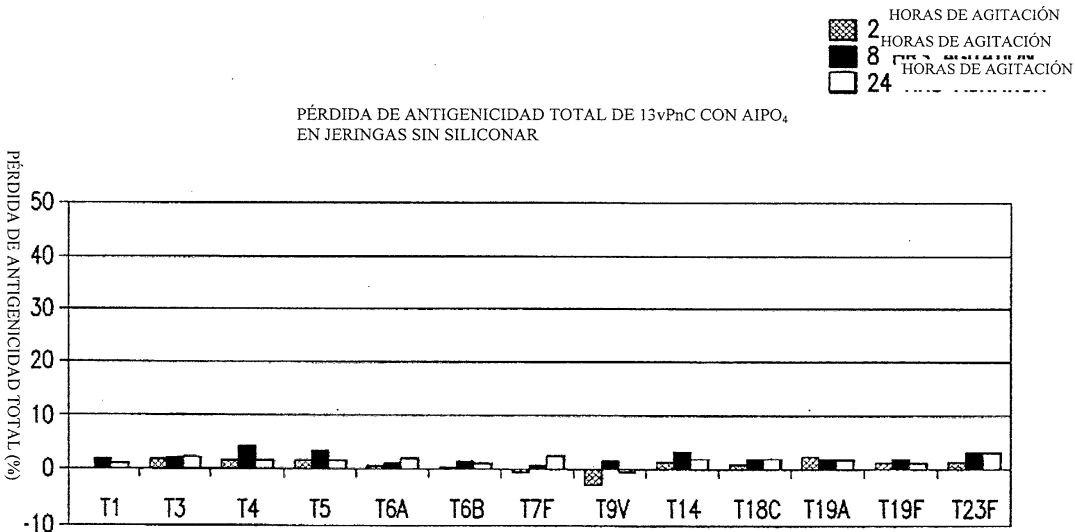


FIG.3

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

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

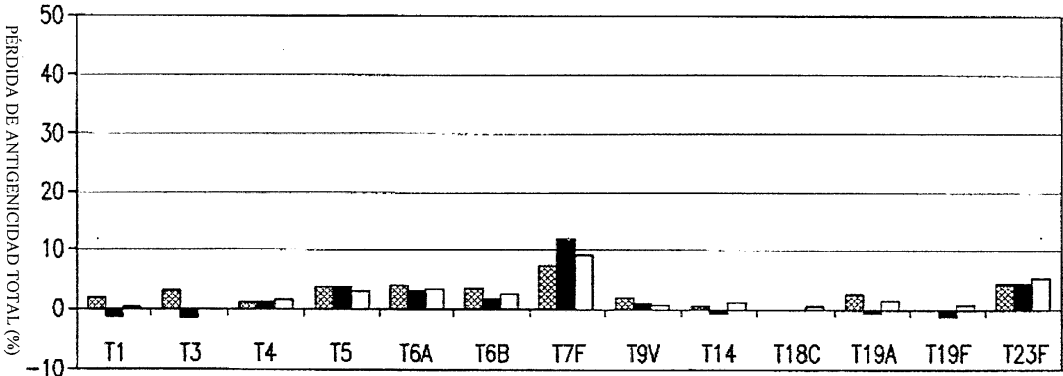


FIG.4

11

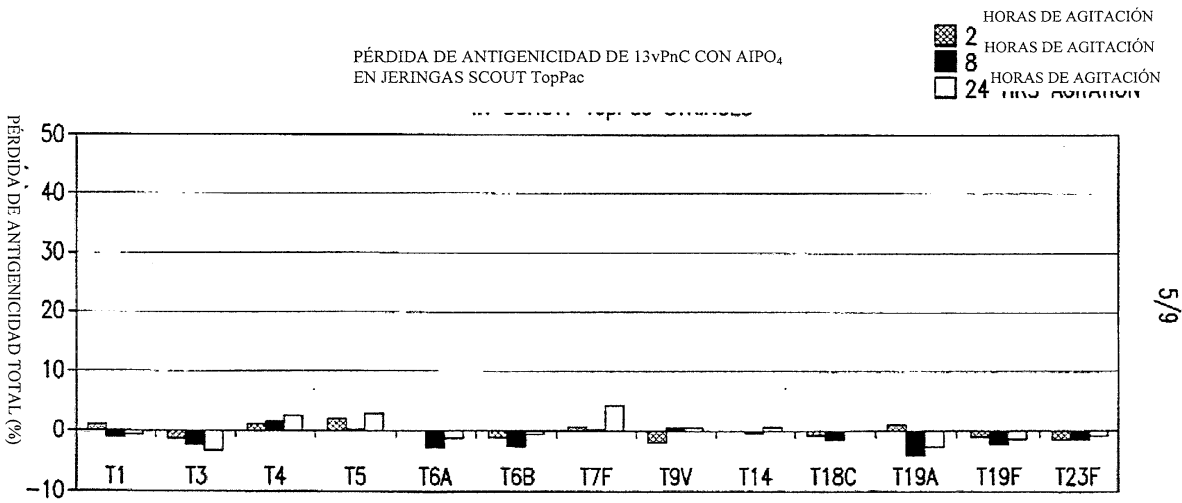


FIG.5

5/9

112

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPnC CON AIPO₄
EN JERINGAS BD ESTUFADAS DE 0,04 mg Si

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

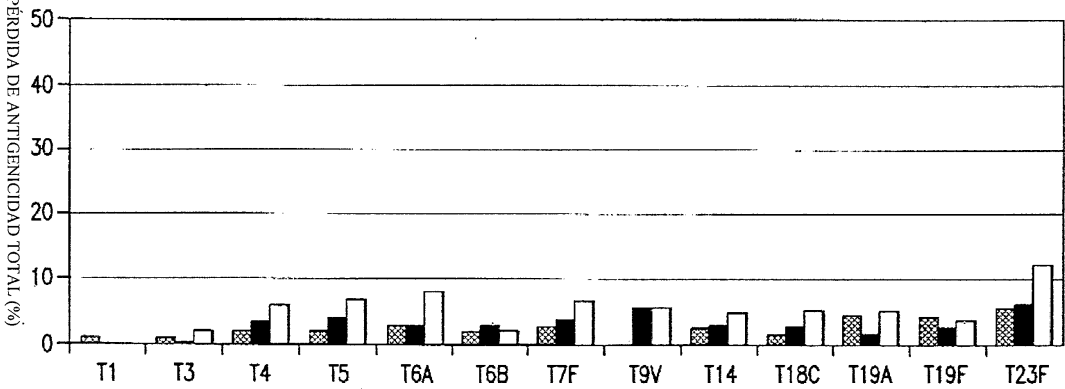


FIG.6A

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD DE 13vPnC SIN AIPO₄ EN
JERINGAS BD ESTUFADAS DE 0,04 mg Si

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

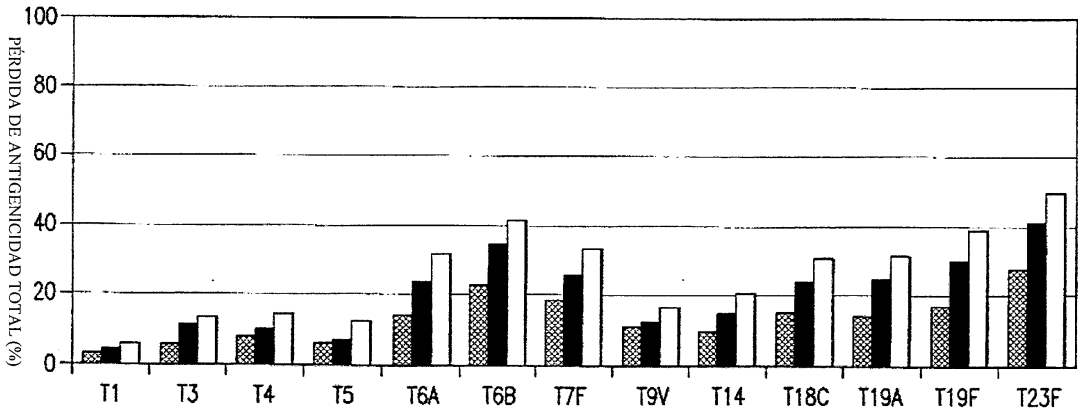


FIG.6B

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

HORAS DE AGITACIÓN
2
8
24

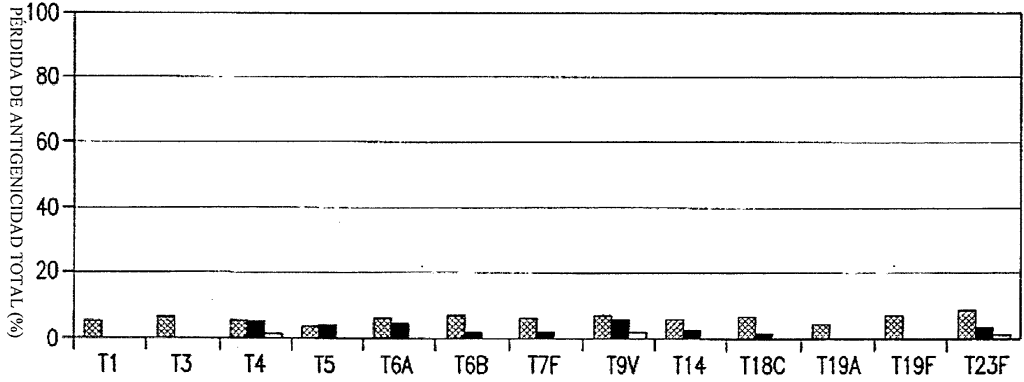


FIG.7A

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

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

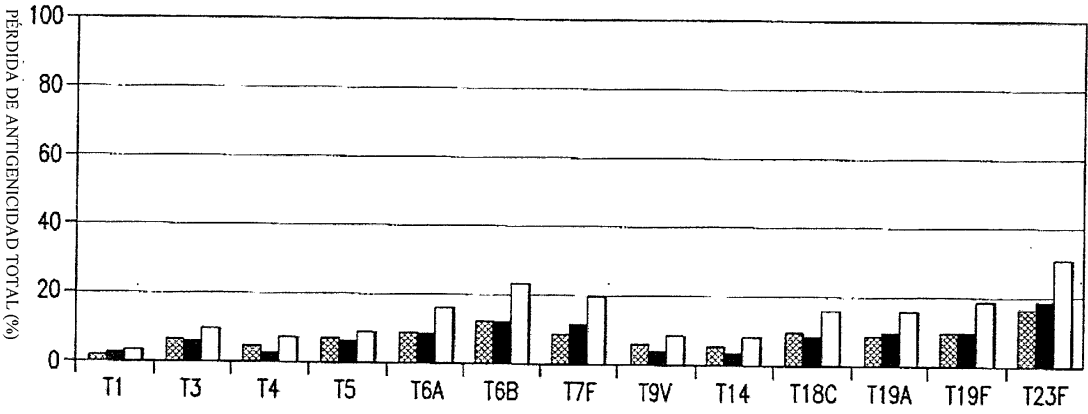


FIG.7B



(12) **United States Patent**
Khandke et al.

(10) **Patent No.:** **US 7,935,787 B2**
(45) **Date of Patent:** **May 3, 2011**

- (54) **FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS**
- (75) Inventors: **Lakshmi Khandke**, Nanuet, NY (US); **Ronald Malone**, Madison, NJ (US); **Xudong Yang**, Tappan, NY (US); **Hanyoung Han**, Fort Lee, NJ (US); **Jee Loon Look**, Gaithersburg, MD (US); **Zhaowei Jin**, Cary, NC (US); **Robert C. Seid, Jr.**, Gaithersburg, MD (US); **Ying Chen**, Apex, NC (US)
- (73) Assignee: **Wyeth LLC**, Madison, NJ (US)
- (*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 570 days.

- (21) Appl. No.: **11/737,674**
- (22) Filed: **Apr. 19, 2007**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2007/0253984 A1 Nov. 1, 2007
- Related U.S. Application Data**
- (60) Provisional application No. 60/795,261, filed on Apr. 26, 2006.
- (51) Int. Cl.
A61K 31/715 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
- (52) U.S. Cl. **530/350; 514/54**
- (58) Field of Classification Search None
See application file for complete search history.

- (56) **References Cited**
- U.S. PATENT DOCUMENTS**
- | | | |
|------------------|---------|---------------------------------|
| 4,673,574 A | 6/1987 | Anderson |
| 4,902,506 A | 2/1990 | Anderson et al. |
| 4,912,094 A | 3/1990 | Myers et al. |
| 5,057,540 A | 10/1991 | Kensil et al. |
| 5,078,996 A | 1/1992 | Conlon et al. |
| 5,118,794 A | 6/1992 | Grangeorge |
| 5,163,918 A | 11/1992 | Righi |
| 5,254,339 A | 10/1993 | Morein |
| 5,614,382 A | 3/1997 | Metcalf |
| 5,723,127 A | 3/1998 | Scott et al. |
| 6,113,918 A | 9/2000 | Johnson et al. |
| 6,207,646 B1 | 3/2001 | Krieg et al. |
| 6,224,880 B1 | 5/2001 | Chan et al. |
| 6,270,775 B1 | 8/2001 | Cleary |
| 6,355,255 B1 | 3/2002 | Cleary et al. |
| 6,951,653 B2 | 10/2005 | Cleary et al. |
| 2004/0047882 A1 | 3/2004 | Broeker |
| 2006/0228380 A1* | 10/2006 | Hausdorff et al. 424/244.1 |
| 2008/0069835 A1 | 3/2008 | Boutriau |

- FOREIGN PATENT DOCUMENTS**
- | | | |
|----|--------------|--------|
| EP | 0 941 738 A1 | 9/1999 |
| EP | 0941738 A1 | 9/1999 |
| EP | 1296713 B1 | 2/2003 |
| EP | 1326634 B1 | 7/2003 |
| JP | 7236483 | 9/1995 |
| JP | 10201844 | 8/1998 |

RU	37462	4/2004
UA	67144	6/2004
WO	WO 92/19265	11/1992
WO	WO 93/13202	7/1993
WO	WO9813052	4/1998
WO	WO 00/18434	4/2000
WO	WO 01/41800 A2	6/2001
WO	WO 2004/083251 A2	9/2001
WO	WO 02/05846 A1	1/2002
WO	WO 02/098368 A2	12/2002
WO	WO 02/098369 A2	12/2002
WO	WO 03/039485 A2	5/2003
WO	WO 03/063766 A2	8/2003
WO	WO 2004/065603 A2	8/2004
WO	WO 2004/094596 A2	11/2004
WO	WO 2005/039620 A1	5/2005

OTHER PUBLICATIONS

Baldwin, R.N., "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", 1988, *Diabetic Medicine*, vol. 5, pp. 789-790.

Bartzoka, Brook and McDormott, Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces. In K.L. Mittal and P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, New York, pp. 371-380, 2000. U.S. Appl. No. 60/795,098, filed Apr. 26, 2006, Look et al.

Bartzoka, Vasiliki et al., "Silicone-Protein Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction", 1998, *Langmuir*, vol. 14, pp. 1892-1898.

Bartzoka, Vasiliki, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?", 1998, *Langmuir*, vol. 14, pp. 1887-1891.

Bartzoka, Vasiliki, "Protein-Silicone Synergism at Liquid/Liquid Interfaces", 2000, *Langmuir*, vol. 16, pp. 4589-4593.

Bernstein, Richard K., "Clouding and Deactivation of Clear (Regular) Human Insulin: Association with Silicone Oil from Disposable Syringes?", 1987, *Diabetes Care*, vol. 10, pp. 786-787.

Bolgiano, Barbara et al., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", 2001, *Vaccine*, vol. 19, pp. 3189-3200.

Chantelau, Ernst A. and Berger, Michael, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", 1985, *Lancet*, vol. 1, p. 1459.

Chantelau, E. et al., "Silicone oil released from disposable insulin syringes", 1986, *Diabetes Care*, vol. 9, pp. 672-673.

Chantelau, E., "Silicone oil contamination of insulin", 1989, *Diabetic Medicine*, vol. 6, p. 278.

Collier, Fred C. and Dawson, Arthur D., "Insulin syringes and silicone oil", 1985, *Lancet*, vol. 326, p. 611.

(Continued)

Primary Examiner — Mark Navarro

(57) **ABSTRACT**

The present invention addresses an ongoing need in the art to improve the stability of immunogenic compositions such as polysaccharide-protein conjugates and protein immunogens. The invention broadly relates to novel formulations which stabilize and inhibit precipitation of immunogenic compositions. More particularly, the invention described hereinafter, addresses a need in the art for formulations which stabilize and inhibit particulate formation (e.g., aggregation, precipitation) of immunogenic compositions which are processed, developed, formulated, manufactured and/or stored in container means such as fermentors, bioreactors, vials, flasks, bags, syringes, rubber stoppers, tubing and the like.

then dialyzed twice against a 30-fold excess of 25 mM NaAc/1% Z3-14 pH 4.5, and passed over a cation exchange chromatography column. The rLP2086 was eluted with a 0-0.3M NaCl gradient and stored frozen (-25° C.).

The purified rLP2086 was then formulated with 150 mM NaCl, 0.020% Tween™80, 0.25 mg Al/mL of AlPO₄, and in the following buffers: 10 mM phosphate buffer at pH 7.0 and 5 mM succinate buffer at pH 6.0. Table 8 compares protein binding percentage to the AlPO₄ adjuvant.

TABLE 8

R.LP2086 BINDING TO ADJUVANT		
Buffer	Total Protein Conc. (µg/mL)	AlPO ₄ Bound Protein (%)
10 mM Phosphate buffer pH 7.0 containing 150 mM NaCl, 0.02% polysorbate 80 and 0.25 mg Al/mL of AlPO ₄	400	68
5 mM Succinate buffer pH 6.0 containing 150 mM NaCl, 0.02% polysorbate 80 and 0.25 mg Al/mL of AlPO ₄	120	82
	400	81
	120	100

REFERENCES

Baldwin, "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", *Diabet. Med.*, 5:789-790, 1988.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces. In K. L. Mittal and P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, New York, pp. 371-380, 2000.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction", *Langmuir* 14:1892-1898, 1998^a.

Bartzoka, Brook and McDormott, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?", *Langmuir* 14:1887-1891, 1998^a.

Bartzoka, Chan and 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 et al., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 19:3189-3200, 2001.

Chantelau and Berger, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", *Lancet*, 1:1459, 1985.

Chantelau et al., "Silicone oil released from disposable insulin syringes", *Diabetes care*, 9:672-673, 1986.

Chantelau, "Silicone oil contamination of insulin", *Diabet. Med.*, 6:278, 1989.

Chantelau, Burger and Bohiken, "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 et al., "Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 20:3509-3522, 2002.

Ilo et al., "Solution Stability of the Subunit Components of Meningococcal C Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Biotech. Appl. Biochem.*, 33:91-98, 2001.

Jones et al., "Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins", *J. Pharmaceutical Sci.*, 94(4):918-927, 2005.

Kajihara et al., "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*, May 2003.

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

What is claimed is:

1. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5,

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.001% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation, and

(iii) one or more polysaccharide-protein conjugates comprising one or more pneumococcal polysaccharides.

2. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is comprised in a container means selected from one or more of the group consisting of a vial, a vial stopper, a vial closure, a glass closure, a rubber closure, a plastic closure, a syringe, a syringe stopper, a syringe plunger, a flask, a beaker, a graduated cylinder, a fermentor, a bioreactor, tubing, a pipe, a bag, a jar, an ampoule, a cartridge and a disposable pen.

3. The formulation of claim 2, wherein the container means is siliconized.

4. The formulation of claim 1, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM.

5. The formulation of claim 1, wherein the polysorbate 80 has a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

6. The formulation of claim 1, further comprising one or more meningococcal polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

7. The formulation of claim 1, further comprising one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

8. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is a 7-valent pneumococcal conjugate (7vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

9. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumo-*

niae serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

10. The formulation of claim 1, wherein the formulation further comprises an adjuvant.

11. The formulation of claim 10, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

12. The formulation of claim 9, wherein the formulation further comprises an adjuvant.

13. The formulation of claim 12, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

14. The formulation of claim 13 wherein the aluminum phosphate is present at a final concentration of about 0.25 mg/mL.

15. The formulation of claim 9, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.

16. The formulation of claim 1, wherein the buffer is phosphate, succinate, histidine or citrate.

17. The formulation of claim 3, wherein the succinate buffer has a pH of 5.8 to 6.0.

18. The formulation of claim 1, wherein the pH buffered saline solution contains sodium chloride.

19. The formulation of claim 15, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 5 mM.

20. The formulation of claim 19, wherein the buffer is at pH 5.8.

21. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer is succinate at a final concentration of about 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0;

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation;

(iii) a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide; and

to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide.

22. The formulation of claim 21, wherein the final concentration of the succinate buffer is 5 mM.

23. The formulation of claim 21, wherein the pH buffered saline solution contains sodium chloride,

24. The formulation of claim 23, wherein the sodium chloride is present at a final concentration of 150 mM.

25. The formulation of claim 21, wherein the formulation further comprises an adjuvant, the adjuvant being aluminum phosphate.

26. A formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising

(i) a pH buffered saline solution containing sodium chloride, wherein the buffer is succinate at a final concentration of about 5 mM and pH 5.8;

(ii) polysorbate 80 at a final concentration of at least 0.01% to 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation;

(iii) a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) formulation comprising a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide conjugated to a CRM₁₉₇ polypeptide; and

(iv) an adjuvant comprising aluminum phosphate present at a final concentration of about 0.25 mg/mL.

* * * * *