

Organización y
Digitalización



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-125423

1. EXPEDIENTE No.

4. TÍTULO FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN
+ PRECIPITACION DE COMPOSICIONES INMUNOGENICAS

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL AG1K 47/12

SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO Delaware, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO ALVARO CORREA CRDÓNEZ
T.P. 28281

BOGOTÁ, D. C.,

PETIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 08-125423- -00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:21:58 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

①

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II. 26 Nov. 2007

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre: WYETH

Dirección: 5 Giralda Farms, Madison, Nueva Jersey 07940,
Estados Unidos de AméricaNacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey 07940, Estados Unidos
de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

79.143.366 Usaquén TP 28281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: KHANDKE, Lakshmi; CHEN, Ying; HAN, Hanyoung; SEID, Robert, Chancey, Jr; JIN, Zhaowei;
LQOK, Jee, Loon; MALONE, Ronald;
YANG, Xudong;Dirección: 120 East Allison Avenue, Nanuet, Nueva York 10954, Estados Unidos de América; 1005 Edinburgh Downs Lane,
Apex, Carolina del Norte 27502, Estados Unidos de América; 2400 Hudson Terrace, Apt. 5H, Fort Lee, Nueva
Jersey 07024 Estados Unidos de América; ; 913 Beacon Square Court, Apt. #349, Gaithersburg, Maryland
20878, Estados Unidos de América; 202 Barons Glenn Way, Cary, Carolina del Norte 27513 Estados Unidos de
América; 50 Orchard Drive, Gaithersburg, Maryland 20878, Estados Unidos de América; 401 N. Middletown
Road, Pearl River, Nueva York 10965, Estados Unidos de América; 6 Lanram Road, Tappan, Nueva York 10983,
Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Domiciliados en Estados Unidos de América

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/066959

Fecha 19.04.2007

Publicación Internacional No. WO/2007/127665

Fecha 08.11.2007

⑥

Título (54)

FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACION DE COMPOSICIO-
NES INMUNOGÉNICAS

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 47/12 , A61K 47/48

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

26.04.2006

(31) Número de Solicitud

60/795,261

⑨

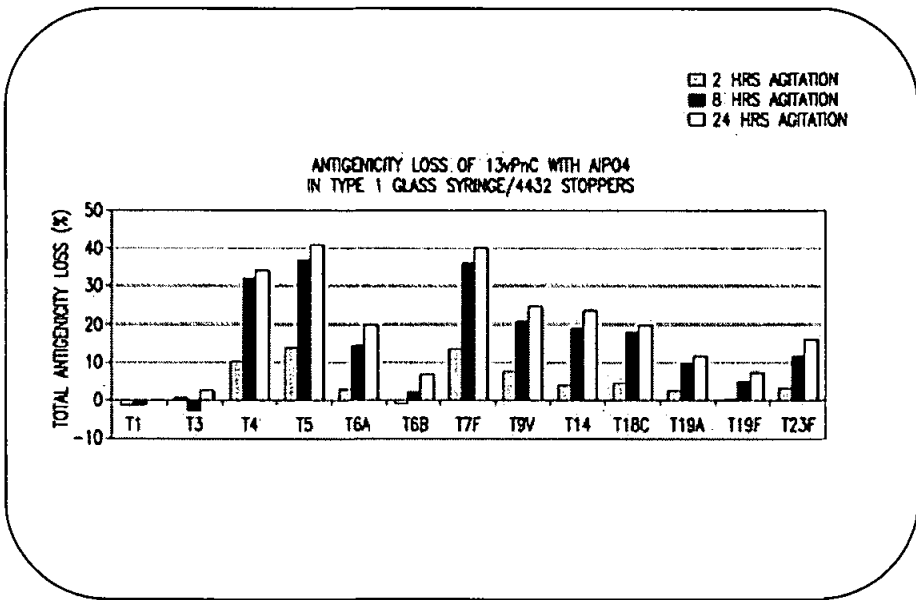
Comprobante de pago No. 08-82,843

Fecha 20-OCT-2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
 - X Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
 - X Poderes, si fuere el caso
 - Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
 - Declaraciones
- X Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
 - Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
 - Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
 - De ser el caso, copia del contrato de acceso
 - De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
 - De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
 - Arte final 12 x 12
 - De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
 - De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros: Documento de presentación de prioridad, Opinión escrita y Reporte de Búsqueda

11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA:

C.O. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20-281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

2008 10 19

NIT : 800176089-2

SUPLENIENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

 No. 08-125423- -00000-0000
 Fecha: 2008-11-25 16:21:58 Dep. 2020 NUECREACIONI
 Tra 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102249184	20/10/2008	55,994,500.00

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°.

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

=====

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

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

(Fdo.) Michelle L. McGowan

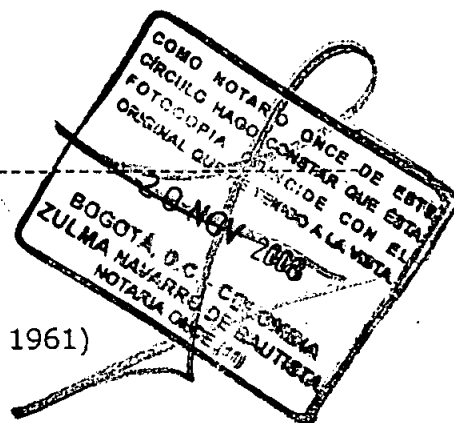
[Sello] MICHELLE L. MCGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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



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

CERTIFICADO

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

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

=====

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

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

Maria Teresa Lara R.

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



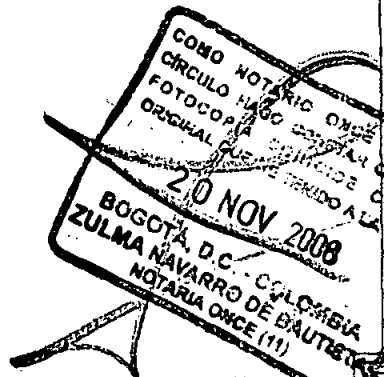
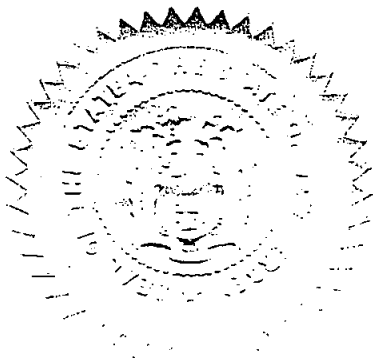
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

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



POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

WYETH

with offices at

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

declares that it hereby grants to

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

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

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

Done and subscribed in

On the 25th day of July, 2008

Gale F. Matthews
Assistant Secretary

Signature of the person issuing the Power

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

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

declara por el presente que otorga a

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

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

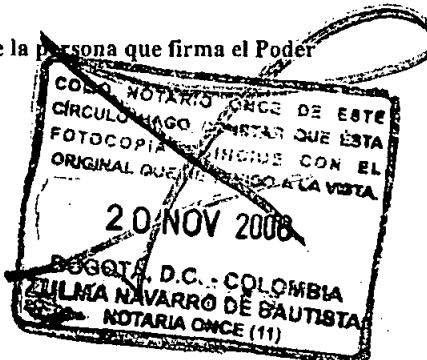
Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 25 días del mes de julio de 2008

Gale F. Matthews
Subsecretario

Firma de la persona que firma el Poder



NOTARIAL CERTIFICATION

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

CERTIFIES

1. That **Gale F. Matthews**

set his hand on the foregoing document.

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

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

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

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

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

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

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

CERTIFICACION NOTARIAL

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

DA FE

1 Que **Gale F. Matthews**

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

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

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

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

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

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

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

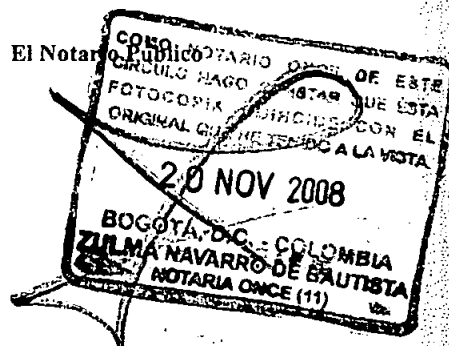
5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

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

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

Michelle L. McGowan
Notary Public

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



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 November 2007 (08.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/127665 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

(74) Agents: CASH, David, E. et al.; Alston & Bird LLP, Bank Of America Plaza, 101 South Tryon Street, Suite 4000, Charlotte, NC 28280-4000 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/066959

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 19 April 2007 (19.04.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/795,261 26 April 2006 (26.04.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KHANDKE, Lakshmi [US/US]; 120 East Allison Avenue, Nanuet, NY 10954 (US). CHEN, Ying [CN/US]; 1005 Edinburgh Downs Lane, Apex, NC 27502 (US). HAN, Hanyoung [US/US]; 2400 Hudson Terrace, Apt. 5H, Fort Lee, NJ 07024 (US). SEID, Robert, Chancey, Jr. [US/US]; 913 Beacon Square Court, Apt. #349, Gaithersburg, MD 20878 (US). JIN, Zhaowei [CN/US]; 202 Barons Glenn Way, Cary, NC 27513 (US). LOOK, Jee, Loon [US/US]; 50 Orchard Drive, Gaithersburg, MD 20878 (US). MALONE, Ronald [US/US]; 401 N. Middletown Road, Pearl River, NY 10965 (US). YANG, Xudong [CN/US]; 6 Lanram Road, Tappan, NY 10983 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

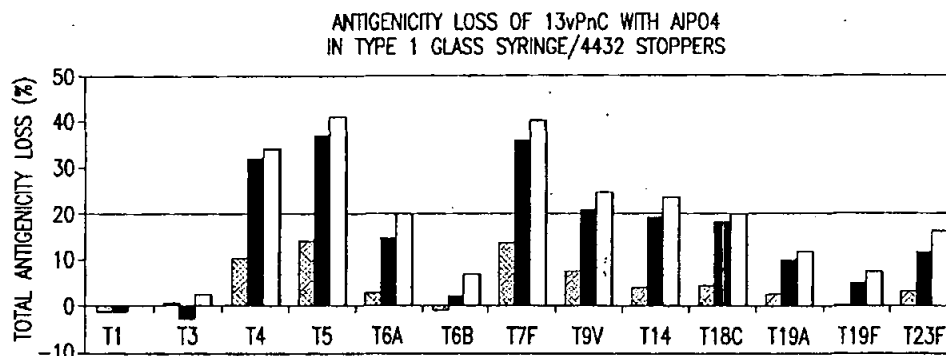
Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

2 HRS AGITATION
8 HRS AGITATION
24 HRS AGITATION



(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.

WO 2007/127665 A2

5

NOVEL FORMULATIONS WHICH STABILIZE AND INHIBIT PRECIPITATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

10

FIELD OF THE INVENTION

The present invention generally relates to the fields of immunology, bacteriology, vaccine formulation, protein stability and process development. More particularly, the invention relates to novel formulations which inhibit precipitation of immunogenic compositions.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

It is generally accepted in the bio-pharmaceutical arts, that improving the stability of an immunogenic composition (e.g., a protein immunogen, a polysaccharide-protein conjugate) is a necessary and highly desirable goal. For example, an immunogenic composition must appear fresh, elegant and professional when administered to a patient. Any changes in stability and/or physical appearance of the immunogenic composition, such as color change, clouding or haziness, may cause a patient or consumer to lose confidence in the product. Furthermore, because many immunogenic formulations are dispensed in multiple-dose containers, uniformity of dose content of the active ingredient (e.g., a polysaccharide-protein conjugate) over time must be assured (e.g., a cloudy solution can lead to a non-uniform dosage pattern). Additionally, the immunogenic composition must be active throughout its "expected" shelf life, wherein any breakdown of the immunogenic composition to an inactive or otherwise undesired form (e.g., an aggregate) lowers the total concentration of the product.

20

25

30

35

Several reports in the literature have suggested that the stability of a particular immunogenic composition (e.g., a protein immunogen, a polysaccharide-protein conjugate) is at least in part dependent upon the specific protein or carrier protein (Ho *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Bolgiano *et al.*, 2001). For example, stability

analysis of meningococcal C (MenC) polysaccharides and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) polysaccharides, conjugated to either a tetanus toxoid (TT) or a CRM₁₉₇ carrier protein, revealed different stability profiles dependent on the carrier protein (Ho *et al.*, 2002). In another study (Ho *et al.*, 2001), MenC-CRM₁₉₇ conjugates from two different manufacturers were analyzed (Ho *et al.*, 2001), wherein the MenC-CRM₁₉₇ conjugates differed in their conjugation chemistry and length of conjugate polysaccharide (both having the same carrier protein, CRM₁₉₇). Data from this study further indicated that factors such as conjugation chemistry (e.g., reductive amination either directly or via a chemical spacer group), number of conjugation sites, polysaccharide chain length, pH, storage buffer, storage temperature(s) and freeze/thaw cycles also influence the stability of an immunogenic composition.

Thus, when developing a formulation for an immunogenic composition, many factors must be considered to ensure a safe, stable, robust and cost effective product. Such considerations include, but are not limited to, chemical stability of the immunogenic composition (e.g., hydrolysis of saccharides, de-polymerization of polysaccharides, proteolysis or fragmentation of proteins), physical/thermal stability of the immunogenic composition (e.g., aggregation, precipitation, adsorption), compatibility of the immunogenic composition with the container/closure system, interactions between immunogenic composition and inactive ingredients (e.g., buffers, salts, excipients, cryoprotectants), the manufacturing process, the dosage form (e.g., lyophilized, liquid), the environmental conditions encountered during shipping, storage and handling (e.g., temperature, humidity, shear forces), and the length of time between manufacture and usage.

It has been suggested in the art, that silicone oil, which induces protein secondary and tertiary conformational changes, might be responsible for the aggregation/precipitation seen in certain protein pharmaceutical preparations (Jones *et al.*, 2005). For example, several reports in the 1980s implicated the release of silicone oil from disposable plastic syringes as the causative agent in the aggregation of human insulin (Chantelau and Berger, 1985; Chantelau *et al.*, 1986; Chantelau, 1989; Bernstein, 1987; Baldwin, 1988; Collier and Dawson, 1985). Chantelau *et al.* (1986) observed that after three or more withdrawals from a ten-dose preparation of insulin (using a siliconized disposable syringe), the vial would begin clouding due to silicone oil contamination, thereby resulting in aggregation and deactivation of the insulin (Chantelau *et al.*, 1986). Paradoxically, silicone oil is a necessary component of plastic syringes, as it serves to lubricate the rubber plunger and facilitate transfer of the plunger down the syringe barrel (i.e., silicone oil improves the syringeability of the formulation).

Furthermore, the use of silicone oil is not limited to syringes, as it is used as a coating for glass vials to minimize protein adsorption, as a lubricant to prevent conglomeration of rubber stoppers during filling procedures, as a lubricant critical to the processability/machinability of glass and elastomeric closures and as a lubricant to ease needle penetration of vial rubber stoppers. Additionally, the siliconization of syringes, glass vials, rubber stoppers and the like, is not a well controlled nor standardized process, and as such, there is a high degree of variability of the silicone oil content from one lot to another.

There is therefore an ongoing need in the art for formulations which enhance stability and inhibit precipitation of immunogenic compositions.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention broadly relates to novel formulations which stabilize and inhibit precipitation of immunogenic compositions. More specifically in certain embodiments, the present invention is directed to novel formulations which inhibit precipitation of immunogenic compositions comprised in container means. In one specific embodiment, the invention is directed to novel formulations which stabilize immunogenic compositions against silicone oil interactions, shear forces, shipping agitation, and the like.

Thus, in certain embodiments, the invention is directed to formulations which stabilize 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) a surfactant and (iii) one or more polysaccharide-protein conjugates. In one specific embodiment, the polysaccharide-protein conjugate formulation is comprised in a container means. In certain embodiments, the container means is 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. In certain embodiments, the container means is siliconized.

In certain embodiments, the pH buffered saline solution of the formulations has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer is phosphate, succinate, histidine or citrate. In certain embodiments, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In one particular embodiment, the final concentration of the succinate buffer is 5 mM. In other embodiments, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium

chloride, sodium chloride or a combination thereof. In one particular embodiment, the salt in the pH buffered saline solution is sodium chloride.

In another embodiment, the surfactant of the formulations is selected from the group consisting of polysorbate 20 (Tween™20), polysorbate 40 (Tween™40), polysorbate 60 (Tween™60), polysorbate 65 (Tween™65), polysorbate 80 (Tween™80), polysorbate 85 (Tween™85), Triton™ N-101, Triton™ X-100, octoxynol 40, nonoxynol-9, triethanolamine, triethanolamine polypeptide oleate, polyoxyethylene-660 hydroxystearate (PEG-15, Solutol H15), polyoxyethylene-35-ricinoleate (Cremophor EL™), soy lecithin and a poloxamer. In one particular embodiment, the surfactant is polysorbate 80. In another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in formulation is at least 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.1% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In certain other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 1.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 10.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

In another embodiment, the polysaccharide-protein conjugate comprises one or more pneumococcal polysaccharides. In certain embodiments, the one or more pneumococcal polysaccharides are a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide. In certain embodiments, the protein of the polysaccharide-protein conjugate formulation is selected from the group consisting of CRM₁₉₇, a tetanus toxoid, a cholera toxoid, a pertussis toxoid, an *E. coli* heat labile toxoid (LT), a pneumolysin toxoid, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein A (PsaA), a C5a peptidase from *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*

protein D, ovalbumin, keyhole limpet haemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) and purified protein derivative of tuberculin (PPD).

In one specific embodiment, 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.

In another specific embodiment, 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. 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.

In other embodiments, the formulation further comprises one or more meningococcal polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof. In yet other embodiments, the formulation further comprises one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

In certain other embodiments, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

In other embodiments, the invention is directed to formulations which stabilize a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) a surfactant and (iii) a streptococcal C5a peptidase. In one specific embodiment,

SCP formulation is comprised in a container means. In certain embodiments, the container means is 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.

In other embodiments, the pH buffered saline solution of the formulation has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer is succinate, histidine, phosphate or citrate. In one specific embodiment, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In another specific embodiment, the final concentration of the succinate buffer is 5 mM. In yet other embodiments, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium chloride, sodium chloride or a combination thereof.

In certain embodiments, the surfactant in the formulations is selected from the group consisting of polysorbate 20 (Tween™20), polysorbate 40 (Tween™40), polysorbate 60 (Tween™60), polysorbate 65 (Tween™65), polysorbate 80 (Tween™80), polysorbate 85 (Tween™85), Triton™ N-101, Triton™ X-100, octoxynol 40, nonoxynol-9, triethanolamine, triethanolamine polypeptide oleate, polyoxyethylene-660 hydroxystearate (PEG-15, Solutol H15), polyoxyethylene-35-ricinoleate (Cremophor EL™), soy lecithin and a poloxamer. In one specific embodiment, the surfactant is polysorbate 80. In certain embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in formulation is 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.1% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 1.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 10.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

In certain other embodiments, the SCP composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide. In still other embodiments, the SCP composition further comprises one

or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.

5 In another embodiment, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

10 In another embodiment, the invention is directed to formulations which inhibit silicone induced precipitation of a polysaccharide-protein conjugate comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, (ii) an aluminum salt and (iii) one or more polysaccharide-protein conjugates. In certain embodiments, the siliconized container means is 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.

15 In certain embodiments, the pH buffered saline solution in the formulations has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer in the formulations is phosphate, succinate, histidine or citrate. In yet other embodiments, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In one particular embodiment, the final concentration of the succinate buffer is 5 mM. In still other embodiments, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium chloride, sodium chloride or a combination thereof. In one particular embodiment, the salt in the pH buffered saline solution is sodium chloride.

20 In other embodiments, the aluminum salt is aluminum hydroxide, aluminum phosphate or aluminum sulfate. In one specific embodiment, the aluminum salt is aluminum phosphate.

25 In certain other embodiments, the formulation further comprises polysorbate 80 (Tween™80). In one specific embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in formulation is at least 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

30 In another embodiment, the polysaccharide-protein conjugate comprises one or more pneumococcal polysaccharides. In certain embodiments, the one or more pneumococcal polysaccharides are a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 1

polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide.

5 In certain other embodiments, the protein of the polysaccharide-protein conjugate formulation is selected from the group consisting of CRM₁₉₇, a tetanus toxoid, a cholera toxoid, a pertussis toxoid, an *E. coli* heat labile toxoid (LT), a pneumolysin toxoid, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein A (PsaA), a C5a peptidase from *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae* protein D, ovalbumin, keyhole limpet haemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) and purified protein derivative of tuberculin (PPD).

10 In one particular embodiment, 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.

20 In another specific embodiment, 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. 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.

In yet other embodiments, the formulation further comprises one or more meningococcal polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

5 In another embodiment, the formulation further comprises one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a combination thereof.

In certain other embodiments, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

10 In other embodiments, the present invention is directed to formulations which inhibit silicone induced precipitation of a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) an aluminum salt and (iii) a streptococcal C5a peptidase. In certain
15 embodiments, the container means is 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.

20 In another embodiment, the pH buffered saline solution of the formulation has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer is succinate, histidine, phosphate or citrate. In certain embodiments, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In another embodiment, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium chloride, sodium chloride or a combination thereof.

25 In certain other embodiments, the formulation further comprises polysorbate 80 (Tween™80). In one specific embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

30 In yet other embodiments, the SCP composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide.

35 In certain other embodiments, the SCP composition further comprises one or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.

In yet another embodiment, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

In other embodiments, the invention is directed to formulations which stabilize a *N. meningitidis* 2086 protein composition, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) a surfactant and (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein. Exemplary *N. meningitidis* 2086 proteins are described herein below. In one specific embodiment, the *N. meningitidis* 2086 protein formulation is comprised in a container means. In certain embodiments, the container means is 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.

In other embodiments, the pH buffered saline solution of the formulation has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer is succinate, histidine, phosphate or citrate. In one specific embodiment, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In another specific embodiment, the final concentration of the succinate buffer is 5 mM. In yet other embodiments, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium chloride, sodium chloride or a combination thereof.

In certain embodiments, the surfactant in the formulations is selected from the group consisting of polysorbate 20 (Tween™20), polysorbate 40 (Tween™40), polysorbate 60 (Tween™60), polysorbate 65 (Tween™65), polysorbate 80 (Tween™80), polysorbate 85 (Tween™85), Triton™ N-101, Triton™ X-100, octoxynol 40, nonoxynol-9, triethanolamine, triethanolamine polypeptide oleate, polyoxyethylene-660 hydroxystearate (PEG-15, Solutol H15), polyoxyethylene-35-ricinoleate (Cremophor EL™), soy lecithin and a poloxamer. In one specific embodiment, the surfactant is polysorbate 80. In certain embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.05% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet other embodiments, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.1% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation

is 1.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation. In yet another embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 10.0% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

5 In certain other embodiments, the *N. meningitidis* 2086 protein composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide. In still other embodiments, the *N. meningitidis* 2086 protein composition further comprises one or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.

In another embodiment, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

15 In other embodiments, the present invention is directed to formulations which inhibit silicone induced precipitation of a *N. meningitidis* 2086 protein composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) an aluminum salt and (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein. In certain embodiments, the container means is 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.

25 In another embodiment, the pH buffered saline solution of the formulation has a pH of 5.5 to 7.5. In other embodiments, the buffer is succinate, histidine, phosphate or citrate. In certain embodiments, the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0. In another embodiment, the salt in the pH buffered saline solution comprises magnesium chloride, potassium chloride, sodium chloride or a combination thereof.

30 In certain other embodiments, the formulation further comprises polysorbate 80 (Tween™80). In one specific embodiment, the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.

35 In yet other embodiments, the *N. meningitidis* 2086 protein composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide.

In certain other embodiments, the *N. meningitidis* 2086 protein composition further comprises one or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.

5 In yet another embodiment, the formulation further comprises one or more adjuvants. Exemplary suitable adjuvants are described herein below.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, from the embodiments thereof, and from the claims.

10 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the stability of Streptococcal C5a peptidase (SCP) formulations (filled in syringes) before and after two days of gentle agitation (60 cpm) on a horizontal orbital shaker. The data presented in FIG. 1A is the two day stability of the SCP formulated without any Tween™80 (*i.e.*, 0%), whereas the data in FIG. 1B is the two day stability of the SCP formulated with 0.025% Tween™80. The buffers used in the formulations shown in FIG. 1A and 1B are succinate buffered saline (SBS), phosphate buffered saline (PBS) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS).

20 Figure 2 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in a BD Hypak syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

Figure 3 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in an un-siliconized syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

25 Figure 4 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in a Vetter syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

Figure 5 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in a Schott TopPac syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

30 Figure 6 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with (FIG. 6A) and without (FIG. 6B) AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in a BD Baked syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

35 Figure 7 shows the total antigenicity loss of the 13vPnC formulated with (FIG. 7A) and without (FIG. 7B) AlPO_4 (0.25 mg/ml) and filled in a BänderGlas PS2

syringe, after two hours, eight hours and twenty-four hours of agitation at 500 rpm and 2-8°C.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 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. Thus, the present invention broadly relates to novel surfactant formulations and/or novel aluminum salt formulations which stabilize and inhibit precipitation of immunogenic compositions. More particularly, the invention
10 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.

15 As set forth above in the Background of the Invention, various factors influence the stability of immunogenic compositions, including, but not limited to, chemical stability of the immunogenic composition, physical/thermal stability of the immunogenic composition, compatibility of the immunogenic composition with the container/closure system, interactions between immunogenic composition and
20 inactive ingredients (e.g., buffers, salts, excipients, cryoprotectants), manufacturing processes, dosage form, environmental conditions encountered during shipping, storage and handling (e.g., temperature, humidity, shear forces), and the length of time between manufacture and usage.

25 The stability of an immunogenic composition of the invention is readily determined using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art. For example, an immunogenic composition is assayed for stability, aggregation, immunogenicity, particulate formation, protein (concentration) loss, and the like, by methods including, but not limited to, light scattering, optical density, sedimentation velocity centrifugation, sedimentation equilibrium centrifugation,
30 circular dichroism (CD), Lowry assay, bicinchoninic acid (BCA) assay, antibody binding, and the like.

35 As set forth in detail herein, the present invention relates to the unexpected and surprising results that formulating an immunogenic composition with a surfactant such as Tween™80 significantly enhances the stability and inhibits precipitation of an immunogenic composition. For example, it was observed in the present invention (e.g., see Example 2), that a thirteen-valent pneumococcal conjugate (13vPnC),

formulated in buffered saline and filled in a single dose syringe, would begin precipitating out of solution within ten minutes at 2-8°C upon gentle agitation via a horizontal orbital shaker. (The horizontal orbital shaker was used to simulate typical process, shipping and storage conditions of a 13vPnC immunogenic composition).
5 However, it was surprisingly observed that the 13vPnC, formulated in buffered saline and 0.001% Tween™80, filled in a single dose syringe and gently agitated at 2-8°C, was stable for twenty-five days with no visible signs of precipitation (data not shown). Thus, this data demonstrated that the addition of a surfactant (e.g., Tween™80) to an immunogenic composition formulation enhances the stability of the immunogenic
10 composition.

A second stability study of the 13vPnC further confirmed that the addition of a surfactant to the formulation significantly enhanced the stability of the 13vPnC. For example, the stability (i.e., assayed by measuring change in 13vPnC antigenicity) of a 13vPnC formulation with 0.05% Tween™80 (Table 1) and without Tween™80
15 (0.0%, Table 1) was assessed over a two hour time period. As is shown in Table 1, there was a significant decrease in antigenicity of the thirteen serotype polysaccharides (formulated without Tween™80) within the two hour assay. Quite dramatically however, the 13vPnC formulation comprising 0.05% Tween™80 (Table 1), demonstrated robust stability throughout the two hour antigenicity assay. It was
20 also observed that the 13vPnC formulated in 250 mL glass bottles with either 0.01% Tween™80 or 0.05% Tween™80 could withstand significant shear forces induced via vortexing the formulations for thirty minutes at 2-8°C, with little or no loss in antigenicity (e.g., see Example 2, Table 2).

In other experiments (Example 3), it was demonstrated that the stability of an immunogenic streptococcal C5a peptidase (SCP) composition was greatly enhanced
25 when formulated with a surfactant such as Tween™80. For example, as shown in FIG. 1A, after two days of vortexing an SCP (55 µg/mL) formulated in either a 5 mM succinate buffer (pH 6.0), a 10 mM phosphate buffer (pH 7.0 and 7.4) or a 10 mM Tris buffer (pH 7.5), there was a significant decrease (e.g., greater than 90%) in the SCP concentration. However, as shown in FIG. 1B, the addition of 0.025%
30 Tween™80 to the SCP succinate, SCP phosphate and SCP Tris formulations, prior to vortexing for two days, completely inhibited the SCP loss which was observed in FIG. 1A.

A 13vPnC immunogenic composition of the invention may also be formulated
35 with or without an adjuvant, such as aluminum phosphate (AlPO₄). Thus, in a separate series of experiments (Example 4), 13vPnC immunogenic compositions

were formulated in 5 mM succinate buffer (pH 5.8), 0.85% NaCl and AlPO_4 (0.25 mg aluminum/ml), without the addition of a surfactant (e.g., no Tween™80 was included in the formulation).

5 In these experiments, the 13vPnC immunogenic composition (formulated in the presence of AlPO_4) were filled in various siliconized and non-siliconized container means (e.g., see Table 3) and subjected to simulated shipping and handling conditions via agitation at 2-8°C. It was observed in these experiments (Example 4), that the container means with higher silicone content exhibited a higher degree of 13vPnC particulate formation and a higher percent of 13vPnC antigenicity loss. An
10 FTIR analysis of the particulates indicated that the particulates consisted of protein and silicone (data not shown) and that about 85% of the 13vPnC is bound to the AlPO_4 , wherein the remaining 15% was free (not bound to AlPO_4) 13vPnC in solution.

15 In another experiment comparing 13vPnC immunogenic compositions formulated with and without AlPO_4 , which were then filled in identical syringes, it was observed that the 13vPnC formulated without AlPO_4 sustained greater antigenicity losses than 13vPnC with AlPO_4 in the syringes tested (e.g., see FIG. 6 and FIG. 7).

20 Thus, the invention as set forth herein, is directed to novel formulations which stabilize and inhibit aggregation or precipitation of immunogenic compositions such as polysaccharide-protein conjugates (e.g., a 13vPnC) and protein immunogens (e.g., a streptococcal C5a peptidase, a *N. meningitidis* ORF 2086 protein), against the various factors which influence the stability of immunogenic compositions (e.g., shear forces, shipping agitation, silicone oil interactions, adsorption, manufacturing processes, temperature, humidity, length of time between manufacture and usage,
25 etc.).

In certain embodiments, the invention is directed to a formulation which stabilizes a polysaccharide-protein conjugate, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, a surfactant and one or more polysaccharide-protein conjugates. In other
30 embodiments, the polysaccharide-protein conjugate formulation is comprised in a container means. In another embodiment, the invention is directed to a formulation which stabilizes a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, a surfactant and a streptococcal C5a peptidase. In certain
35 embodiments, the SCP formulation is comprised in a container means. In another embodiment, the invention is directed to a formulation which stabilizes a *N.*

meningitidis 2086 protein composition, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, a surfactant and a *N. meningitidis* 2086 protein. In certain embodiments, the meningococcal 2086 formulation is comprised in a container means.

5 In certain other embodiments, the invention is directed to a formulation which inhibits silicone induced precipitation of a polysaccharide-protein conjugate comprised in a siliconized container means, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, an aluminum salt and one or more polysaccharide-protein conjugates. In another embodiment, the
10 invention is directed to a formulation which inhibits silicone induced precipitation of a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, an aluminum salt and a streptococcal C5a peptidase. In certain other embodiments, the invention is directed to a formulation
15 which inhibits silicone induced precipitation of a *N. meningitidis* 2086 protein composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, an aluminum salt and a *N. meningitidis* 2086 protein.

In yet other embodiments, the invention is directed to a formulation that
20 optimizes antigen stability and binding percentage to an aluminum salt adjuvant (e.g., $AlPO_4$) of a *N. meningitidis* 2086 protein, the formulation comprising a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, a surfactant, an aluminum salt, and a *N. meningitidis* 2086 protein. In certain embodiments, the formulation is in a container means.

25 As defined hereinafter, the terms "precipitation", "precipitate" "particulate formation", "clouding" and "aggregation" may be used interchangeably and are meant to refer to any physical interaction or chemical reaction which results in the "aggregation" of a polysaccharide-protein conjugate or a protein (or polypeptide) immunogen. The process of aggregation (e.g., protein aggregation) is well known
30 (but not well understood) and described in the art, and is often influenced by numerous physicochemical stresses, including heat, pressure, pH, agitation, shear forces, freeze-thawing, dehydration, heavy metals, phenolic compounds, silicon oil, denaturants and the like.

As defined hereinafter, a "polysaccharide-protein conjugate", a
35 "pneumococcal conjugate", a "7-valent pneumococcal conjugate (7vPnC)", a "13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC)", a "streptococcal C5a peptidase (SCP) immunogenic composition" and a "*N. meningitidis* 2086 protein immunogenic

composition" of the invention includes liquid formulations, frozen liquid formulations and solid (e.g., freeze-dried or lyophilized) formulations.

A. SURFACTANTS

5 As set forth above, the invention is directed to formulations which stabilize and inhibit aggregation of immunogenic compositions against the various factors which influence the stability of immunogenic compositions (e.g., shear forces, shipping agitation, silicone oil interactions, adsorption, manufacturing processes, temperature, humidity, length of time between manufacture and usage, etc.). In
10 certain embodiments, the invention is directed to formulations comprising a surfactant.

A surfactant (or a surface-active agent) is generally defined as (a) a molecule or compound comprising a hydrophilic group or moiety and a lipophilic (hydrophobic) group or moiety and/or (b) a molecule, substance or compound that lowers or
15 reduces surface tension of a solution. As defined herein, a "surfactant" of the present invention is any molecule or compound that lowers the surface tension of an immunogenic composition formulation.

A surfactant used in a formulation of the present invention comprises any surfactant or any combination of surfactants which stabilizes and inhibits aggregation
20 of an immunogenic composition described herein. Thus, a surfactant of the invention includes, but is not limited to, polysorbate 20 (Tween™20), polysorbate 40 (Tween™40), polysorbate 60 (Tween™60), polysorbate 65 (Tween™65), polysorbate 80 (Tween™80), polysorbate 85 (Tween™85), Triton™ N-101, Triton™ X-100, octoxynol 40, nonoxynol-9, triethanolamine, triethanolamine polypeptide oleate, polyoxyethylene-660 hydroxystearate (PEG-15, Solutol H15), polyoxyethylene-35-
25 ricinoleate (Cremophor EL™), soy lecithin, poloxamer, hexadecylamine, octadecylamine, octadecyl amino acid esters, lysolecithin, dimethyldioctadecylammonium bromide, methoxyhexadecylglycerol, pluronic polyols, polyamines (e.g., pyran, dextran sulfate, poly IC, carbopol), peptides (e.g., muramyl peptide and dipeptide, dimethylglycine, tuftsin), oil emulsions, mineral gels (e.g., aluminum phosphate) and immune stimulating complexes (ISCOMS).
30

A person of skill in the art may readily determine a suitable surfactant or surfactant combination by measuring the surface tension of a particular immunogenic composition formulation in the presence and absence of the surfactant(s).
35 Alternatively, a surfactant is evaluated qualitatively (e.g., visual inspection of particulate formation) or quantitatively (e.g., light scattering, sedimentation velocity

centrifugation, optical density, antigenicity) for its ability to reduce, inhibit or prevent aggregation of an immunogenic composition.

B. CONTAINER MEANS

5 In certain embodiments, the invention is directed to formulations of immunogenic compositions comprised in a container means. As defined herein, a "container means" of the present invention includes any composition of matter which is used to "contain", "hold", "mix", "blend", "dispense", "inject", "transfer", "nebulize", etc. an immunogenic composition during research, processing, development, 10 formulation, manufacture, storage and/or administration. For example, a container means of the present invention includes, but is not limited to, general laboratory glassware, flasks, beakers, graduated cylinders, fermentors, bioreactors, tubings, pipes, bags, jars, vials, vial closures (e.g., a rubber stopper, a screw on cap), ampoules, syringes, syringe stoppers, syringe plungers, rubber closures, plastic 15 closures, glass closures, and the like. A container means of the present invention is not limited by material of manufacture, and includes materials such as glass, metals (e.g., steel, stainless steel, aluminum, etc.) and polymers (e.g., thermoplastics, elastomers, thermoplastic-elastomers).

The skilled artisan will appreciate that the container means set forth above 20 are by no means an exhaustive list, but merely serve as guidance to the artisan with respect to the variety of container means which are used to contain, hold, mix, blend, dispense, inject, transfer, nebulize, etc. an immunogen or immunogenic composition during research, processing, development, formulation, manufacture, storage and/or administration of the composition. Additional container means contemplated for use 25 in the present invention may be found in published catalogues from laboratory equipment vendors and manufacturers such as United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR™ (West Chester, PA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Fisher Scientific International Inc. (Hampton, NH) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Thus, the novel formulations of the present invention are particularly 30 advantageous in that they stabilize and inhibit precipitation of immunogenic formulations comprised in a container means throughout the various stages of research, processing, development, formulation, manufacture, storage and/or administration of the composition. The novel formulations of the invention not only stabilize immunogenic compositions against physical/thermal stresses (e.g., 35 temperature, humidity, shear forces, etc.), they also enhance stability and inhibit precipitation of immunogenic compositions against negative factors or influences

such as incompatibility of the immunogenic composition with the container/closure system (e.g., a siliconized container means).

Thus, the novel formulations of the present invention are particularly useful in stabilizing the immunogen (*i.e.*, a polysaccharide-protein conjugate, a protein or polypeptide antigen) against the silicon oil induced precipitation and precipitation described above. For example, co-pending U.S. Application No. 60/795,098, filed April 26, 2006, specifically incorporated herein by reference, describes the aggregation of immunogenic compositions in the presence silicon oil found on container means such syringes, glass vials, rubbers stoppers and the like, wherein the addition of a surfactant to the container means prevented the silicon oil induced aggregation of these immunogenic compositions.

C. ADJUVANTS AND PHARMACEUTICAL CARRIERS/EXCIPIENTS

In certain embodiments, the immunogenic compositions of the invention are further formulated with an adjuvant. An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus may be used as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms), the interferons- α , β and γ , granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GMCSF, see, e.g., U.S. Patent No. 5,078,996 and ATCC Accession Number 39900), macrophage colony stimulating factor (MCSF), granulocyte colony stimulating factor (GCSF), and the tumor necrosis factors α and β (TNF). Still other adjuvants useful in this invention include chemokines, including without limitation, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES.

In certain embodiments, an adjuvant used to enhance an immune response of an immunogenic composition formulation includes, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094, which is hereby incorporated by reference. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in United States Patent No. 6,113,918, which is hereby incorporated by reference. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino]- β -D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form or as a stable emulsion (RC529-SE).

Still other adjuvants include mineral oil and water emulsions, aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate *etc.*, Amphigen, Avridine, L121/squalene, D-lactide-poly(lactide)/glycoside, pluronic polyols, muramyl dipeptide, killed *Bordetella*, saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), described in U.S. Patent No. 5,057,540, which is hereby incorporated by reference, and particles generated therefrom such as ISCOMS (immunostimulating complexes), ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339, *Mycobacterium tuberculosis*, bacterial lipopolysaccharides, synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (U.S. Patent No. 6,207,646, which is hereby incorporated by reference), IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), described in European Patent Nos. 1,296,713 and 1,326,634, a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; see, e.g., International Patent Publication Nos. WO 93/13302 and WO 92/19265, incorporated herein by reference.

Also useful as adjuvants (and carrier proteins) are cholera toxins and mutants thereof, including those described in published International Patent Application number WO 00/18434 (wherein the glutamic acid at amino acid position 29 is replaced by another amino acid (other than aspartic acid), preferably a histidine). Similar CT toxins or mutants are described in published International Patent Application number WO 02/098368 (wherein the isoleucine at amino acid position 16 is replaced by another amino acid, either alone or in combination with the replacement of the serine at amino acid position 68 by another amino acid; and/or wherein the valine at amino acid position 72 is replaced by another amino acid). Other CT toxins are described in published International Patent Application number WO 02/098369 (wherein the arginine at amino acid position 25 is replaced by another amino acid; and/or an amino acid is inserted at amino acid position 49; and/or two amino acids are inserted at amino acid positions 35 and 36).

In certain embodiments, the immunogenic composition formulations comprise a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the pharmaceutically acceptable diluent is sterile water, water for injection, sterile isotonic saline or a biological buffer. The polysaccharide-protein conjugates and/or protein immunogens are mixed with such diluents or carriers in a conventional manner. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with administration to humans or other vertebrate

hosts. The appropriate carrier is evident to those skilled in the art and will depend in large part upon the route of administration.

For example, excipients that may be present in the immunogenic composition formulation are preservatives, chemical stabilizers and suspending or dispersing agents. Typically, stabilizers, preservatives and the like are optimized to determine the best formulation for efficacy in the targeted recipient (e.g., a human subject). Examples of preservatives include chlorobutanol, potassium sorbate, sorbic acid, sulfur dioxide, propyl gallate, the parabens, ethyl vanillin, glycerin, phenol, and parachlorophenol. Examples of stabilizing ingredients include casamino acids, sucrose, gelatin, phenol red, N-Z amine, monopotassium diphosphate, lactose, lactalbumin hydrolysate, and dried milk.

In certain embodiments, an immunogenic composition formulation is prepared for administration to human subjects in the form of, for example, liquids, powders, aerosols, tablets, capsules, enteric-coated tablets or capsules, or suppositories. Thus, the immunogenic composition formulations may also include, but are not limited to, suspensions, solutions, emulsions in oily or aqueous vehicles, pastes, and implantable sustained-release or biodegradable formulations.

The immunogenic compositions of the present invention, are not limited by the selection of the conventional, physiologically acceptable carriers, diluents and excipients such as solvents, buffers, adjuvants, or other ingredients useful in pharmaceutical preparations of the types described above. The preparation of these pharmaceutically acceptable compositions, from the above-described components, having appropriate pH isotonicity, stability and other conventional characteristics is within the skill of the art.

D. IMMUNOGENS

In certain embodiments, a polysaccharide-protein conjugate formulation of the invention comprises one or more pneumococcal polysaccharides. In other embodiments, a polysaccharide-protein conjugate formulation of the invention comprises one or more streptococcal polysaccharides. In yet other embodiments, a polysaccharide-protein conjugate formulation of the invention comprises one or more meningococcal polysaccharides. In still other embodiments, a polysaccharide-protein conjugate formulation of the invention comprises a combination of one or more pneumococcal polysaccharides, one or more pneumococcal polypeptides, one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal polypeptides, one or more meningococcal polysaccharides, and/or one or more meningococcal polypeptides.

As defined hereinafter, the term "polysaccharide" is meant to include any antigenic saccharide element (or antigenic unit) commonly used in the immunologic and bacterial vaccine arts, including, but not limited to, a "saccharide", an "oligosaccharide", a "polysaccharide", a "liposaccharide", a "lipo-oligosaccharide (LOS)", a "lipopolysaccharide (LPS)", a "glycosylate", a "glycoconjugate" and the like.

In one particular embodiment of the invention, the one or more pneumococcal polysaccharides are a *S. pneumoniae* serotype 4 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6B polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 9V polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 14 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 18C polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 19F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 23F polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 1 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 3 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 5 polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 6A polysaccharide, a *S. pneumoniae* serotype 7F polysaccharide and a *S. pneumoniae* serotype 19A polysaccharide.

In certain embodiments, a 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.

In certain other embodiments, a 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. 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.

Polysaccharides are prepared by standard techniques known to those skilled in the art. For example, the capsular polysaccharides set forth in the present invention are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F of *Streptococcus pneumoniae*, wherein each serotype is grown in a soy-based medium and the individual polysaccharides are then purified through centrifugation, precipitation, ultra-filtration, and column chromatography. Similarly, streptococcal polysaccharides (e.g., one or more polysaccharides (or oligosaccharides) from a β -hemolytic *Streptococcus* such group A *Streptococcus*, group B *Streptococcus*, group C *Streptococcus* and group G *Streptococcus*) and meningococcal saccharides (e.g., an *N. meningitidis* lipo-oligosaccharide (LOS) or lipo-polysaccharide (LPS)) are prepared from clinically relevant serotypes or serogroups, using general techniques and methods known to one of skill in the art. The purified polysaccharides are then chemically activated (e.g., via reductive amination) to make the saccharides capable of reacting with the carrier protein. Once activated, each capsular polysaccharide is separately conjugated to a carrier protein (e.g., CRM₁₉₇) to form a glycoconjugate (or alternatively, each capsular polysaccharide is conjugated to the same carrier protein) and formulated into a single dosage formulation.

The chemical activation of the polysaccharides and subsequent conjugation to the carrier protein (i.e., a polysaccharide-protein conjugate) are achieved by conventional means. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,673,574 and 4,902,506.

Carrier proteins are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. Carrier proteins should be amenable to standard conjugation procedures. In a particular embodiment of the present invention, CRM₁₉₇ is used as the carrier protein.

CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 (β 197) grown in casamino acids and yeast extract-based medium. CRM₁₉₇ is purified through ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. Alternatively, CRM₁₉₇ is prepared recombinantly in accordance with U.S. Patent No. 5,614,382, which is hereby incorporated by reference. Other diphtheria toxoids are also suitable for use as carrier proteins.

In other embodiments, a carrier protein of the invention is an enzymatically inactive streptococcal C5a peptidase (SCP) (e.g., one or more of the SCP variants

described in U.S. Patent 6,951,653, U.S. Patent 6,355,255 and U.S. Patent 6,270,775).

Other suitable carrier proteins include inactivated bacterial toxins such as tetanus toxoid, pertussis toxoid, cholera toxoid (e.g., CT E29H, described in International Patent Application WO2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein (PsaA), or *Haemophilus influenzae* protein D, can also be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD) can also be used as carrier proteins.

After conjugation of the capsular polysaccharide to the carrier protein, the polysaccharide-protein conjugates are purified (enriched with respect to the amount of polysaccharide-protein conjugate) by a variety of techniques. These techniques include concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration.

After the individual glycoconjugates are purified, they are compounded to formulate the immunogenic composition of the present invention. Formulation of the polysaccharide-protein conjugates of the present invention can be accomplished using art-recognized methods. For instance, the 13 individual pneumococcal conjugates can be formulated with a physiologically acceptable vehicle to prepare the composition. Examples of such vehicles include, but are not limited to, water, buffered saline, polyols (e.g., glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycol) and dextrose solutions.

In other embodiments, the invention is directed to formulations which stabilize a streptococcal C5a peptidase (SCP) immunogenic composition, wherein the formulations comprise a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, a surfactant and a streptococcal C5a peptidase. The C5a peptidase is a highly conserved serine protease and is expressed across all β -hemolytic Streptococci (e.g., streptococcal Groups A, B, C and G). For example, the nucleotide sequence encoding a Group B streptococci (GBS) C5a peptidase is 98% identical to the nucleotide sequence encoding a Group A streptococci (GAS) C5a peptidase. Thus, in certain embodiments of the invention, an immunogenic composition against infection caused by β -hemolytic Streptococci comprises a C5a peptidase immunogen (or antigen).

In one particular embodiment, a C5a peptidase of the invention is an enzymatically inactive streptococcal C5a peptidase (e.g., one or more of the SCP variants described in U.S. Patent 6,951,653, U.S. Patent 6,355,255 and U.S. Patent 6,270,775, each specifically incorporated herein by reference). In another specific
5 embodiment, the SCP used in the novel immunogenic composition formulations of the invention is cloned from a Group B streptococci. In another embodiment, the Group B streptococci SCP sequence has been genetically mutated to render it proteolytically inactive (e.g., see U.S. Patents 6,951,653; 6,355,255 and 6,270,775) and is expressed as a recombinant protein in *E. coli*.

In another embodiment, the invention is directed to formulations which stabilize a *N. meningitidis* 2086 protein immunogenic composition, wherein the formulations comprise a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, a surfactant and a *N. meningitidis* 2086 protein. The *N. meningitidis* 2086 proteins are encoded by a nucleic acid sequence open reading
10 frame (ORF) identified as "ORF 2086" (e.g., see International Publication No. WO 03/063766 A2 (International Application No. PCT/US02/32369), International Publication No. WO 04/094596 A2 (International Application No. PCT/US04/011901), and International Publication No. WO 04/065603 A2 (International Application No. PCT/US04/000800), each specifically incorporated herein by reference). In a further
15 embodiment, the invention is directed to formulations that optimize antigen stability and binding percentage to an aluminum salt adjuvant (e.g., AlPO_4) of a *N. meningitidis* 2086 protein, wherein the formulations comprise a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, a surfactant, an aluminum salt, and a *N. meningitidis* 2086 protein.
20

All patents and publications cited herein are hereby incorporated by reference.
25

E. EXAMPLES

The following examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described
30 in detail. The following examples are presented for illustrative purpose, and should not be construed in any way as limiting the scope of this invention.

EXAMPLE 1

IMMUNOGENIC FORMULATIONS COMPRISING 0.001%-0.05% TWEEN™80

STABILIZE AND PREVENT AGGREGATION OF THE IMMUNOGEN

The polysaccharide-protein conjugate used in this example was a thirteen-valent pneumococcal polysaccharide conjugate (13vPnC) comprising capsular
35

polysaccharides from *S. pneumoniae* serotypes 4, 6B, 9V, 18C, 19F, 14, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F and 19A, each of which were conjugated to CRM₁₉₇. The capsular polysaccharides were prepared by standard techniques known to those skilled in the art. Briefly, each pneumococcal polysaccharide serotype was grown in a soy-based medium, the individual polysaccharides were then purified through centrifugation, precipitation, ultra-filtration, and column chromatography. The purified polysaccharides were chemically activated for conjugation and each polysaccharide was separately conjugated to a CRM₁₉₇ carrier protein to form a glycoconjugate and formulated into a single dosage formulation.

The chemical activation of the polysaccharides and subsequent conjugation to the carrier protein were achieved by conventional means (e.g., see U.S. Patent No. 4,673,574 and 4,902,506). CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 (β197) grown in casamino acids and yeast extract-based medium. CRM₁₉₇ is purified through ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography.

The antigenicity experiments described below were performed by mixing the 13vPnC samples with one of thirteen antisera (Ab) specific to the each of the polysaccharide serotypes and detecting the immune complexes via light scattering measurements on an Array® 360 system (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). The detected light scattering measurements for each of the thirteen serotypes were then compared to a standard curve and reported as antigenicity (μg/mL).

Syringes (BD Hypak SCF™) and syringe stoppers (BD Hypak SCF™) were purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Clear borosilicate vials (VWR TraceClean™, 40 mL) with Teflon®-lined closures were purchased from VWR™ (West Chester, PA). Polysorbate 80 (Tween™80) was purchased from J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc.; Phillipsburg, NJ). Buffered saline was succinate (5 mM) and NaCl (0.85%) at pH 5.8.

The 13vPnC was formulated (500 mL total volume) at different surfactant concentrations (Tween™80; 0.001%, 0.005%, 0.01% and 0.05%, weight/volume) as follows: 0.85% saline (150 mM NaCl) was added to a one liter Pyrex® glass beaker, followed by 50 mM succinate buffer (final concentration 5 mM) and the 13vPnC. The final concentration of each serotype conjugate was 4.4 μg/mL (except for serotype 6B, which was 8.8 μg/mL). The 13vPnC formulation was then divided into five separate glass vials (50 mL per vial), wherein either 0.0%, 0.001%, 0.005%, 0.01% or 0.05% Tween™80 (w/v) was added to one of the five vials and each solution

filtered through a 0.22 μ m Durapore® filter (Millipore; Billerica, MA). Subsequently, 0.65 mL of each solution was filled in a separate 3 mL BD HYPACK™ SCF™ glass syringe with w4432 grey stoppers (BD Medical Pharmaceutical Systems; Franklin Lakes, NJ), and the syringes placed on a horizontal orbital shaker (60 cpm) for 100 hours at 2°C to 8°C.

It was observed by visual inspection (data not shown), that the 13vPnC formulated in the absence of Tween™80 (*i.e.*, 0.0%), would begin precipitating out of solution within ten minutes at 2-8°C upon gentle agitation *via* a horizontal orbital shaker. In contrast, the 13vPnC, formulated in 0.001%, 0.005%, 0.01% or 0.05% Tween™80 and gently agitated at 2-8°C, was stable for up to twenty-five days with no visible signs of precipitation (data not shown). Thus, this data demonstrated that the addition of a surfactant (*e.g.*, Tween™80) to an immunogenic composition formulation enhances the stability of the immunogenic composition.

A second stability experiment of the 13vPnC further confirmed that the addition of surfactant to the formulation significantly enhanced the stability of the 13vPnC. In this experiment, the 13vPnC was formulated with and without 0.05% Tween™80. The 13vPnC formulated without Tween™80 (*i.e.*, 0.0%) was prepared as follows: 0.85% saline (150 mM NaCl) was added to a one liter Pyrex® glass beaker, followed by 50 mM succinate buffer (final concentration 5 mM) and the 13vPnC, at a total volume of 500 mL. The 13vPnC formulation with 0.05% Tween™80 was prepared as follows: 0.85% saline (150 mM NaCl) was added to a one liter Pyrex® glass beaker, followed by 50 mM succinate buffer (final concentration 5 mM), 0.05% Tween™80 and the 13vPnC, at a total volume of 500 mL. The final concentration of each serotype conjugate in the 500 mL formulations was 4.4 μ g/mL (except for serotype 6B, which was 8.8 μ g/mL). The 500 mL formulations were homogenized via a rotor/stator homogenizer at 6,000 rpm (2-8°C) for 120 minutes. The homogenization process created an air-liquid interface (with air bubbles).

The stability of the 13vPnC formulation with (Table 1) and without (Table 1) 0.05% Tween™80 was assessed over a two hour time period as follows: Samples (20-30 mL) were removed at zero, thirty and one hundred-twenty minutes from the 0.0% and 0.05% Tween™80 formulations, the samples were diluted 1:2 in protein diluent (Array® 360 protein diluent (Cat. No. 663630); Beckman Coulter Inc.; Fullerton, CA) and the antigenicity of all thirteen serotypes of the 13vPnC were assayed (*see*, Table 1) on an Array® 360 system.

As is shown in Table 1, there was a significant decrease in antigenicity of the thirteen serotype polysaccharides (formulated without Tween™80) within the two hour assay. Quite significantly however, the 13vPnC formulation comprising 0.05% Tween™80 (Table 1), demonstrated robust stability with no reduction in the antigenicity throughout the two hour antigenicity assay.

TABLE 1
STABILITY ASSAY OF 13VPNC FORMULATED WITH AND WITHOUT TWEEN™80

13vPnC without Tween80				13vPnC with 0.05% Tween80			
Serotype	Antigenicity 0 minutes	Antigenicity 30 minutes	Antigenicity 120 minutes	Serotype	Antigenicity 0 minutes	Antigenicity 30 min	Antigenicity 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	2.6 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

The 13vPnC/Tween™80 formulation was further tested for stability against high shear forces. In this experiment, a 100 mL 13vPnC composition (4.4 µg/mL serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F and 8.8 µg/mL serotype 6B, 5 mM succinate buffer, 150 mM NaCl and 0.25 mg/mL AlPO₄) was added to three 250 mL glass bottles comprising either 0.0%, 0.01% or 0.05% Tween™80. The three bottles were then vortexed for thirty minutes (2-8°C) on a vortexer (Vortex-Genie® 2; Scientific Industries, Inc.; Bohemia, NY) and an air-liquid interface was created at the maximum speed setting. After thirty minutes 10-30 mL samples were taken from each bottle, diluted 1:2 in Array® 360 protein diluent and the antigenicity of the thirteen serotypes assayed on an Array® 360 system.

As seen in Table 2 below, the 13vPnC formulated without Tween™80 (0.0%) had on average a 20% decrease in antigenicity after vortexing. The 13vPnC formulated with 0.01% Tween™80 had a decrease in antigenicity ranging from 2-10% (average 8%) and the 13vPnC formulated with 0.05% Tween™80 had a decrease in antigenicity ranging from 0-8% (average 3%). Thus, the data presented in Table 2

demonstrate that the 13vPnC formulated with either 0.01% or 0.05% Tween™80 were significantly stabilized against shear forces, relative to the 13vPnC formulated in the absence of Tween™80.

5

TABLE 2
STABILIZING EFFECT OF TWEEN™80 AGAINST SHEAR FORCES

Serotype	Antigenicity 0.0% tw80	Antigenicity 0.0% tw80 + vortex	Antigenicity 0.01% tw80	Antigenicity 0.01% tw80 + vortex	Antigenicity 0.05% tw80	Antigenicity 0.05% tw80 + vortex
1	4.7 µg/mL	3.6 µg/mL	4.8 µg/mL	4.3 µg/mL	4.7 µg/mL	4.6 µg/mL
3	4.6 µg/mL	3.4 µg/mL	4.7 µg/mL	4.2 µg/mL	4.7 µg/mL	4.4 µg/mL
4	5.5 µg/mL	4.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.6 µg/mL
5	3.2 µg/mL	2.5 µg/mL	3.5 µg/mL	3.2 µg/mL	3.3 µg/mL	3.3 µg/mL
6A	4.3 µg/mL	3.6 µg/mL	4.6 µg/mL	4.5 µg/mL	4.7 µg/mL	4.8 µg/mL
6B	9.7 µg/mL	7.7 µg/mL	10.2 µg/mL	9.6 µg/mL	10.2 µg/mL	10.1 µg/mL
7F	4.6 µg/mL	3.5 µg/mL	5.4 µg/mL	5.0 µg/mL	5.4 µg/mL	5.3 µg/mL
9V	5.3 µg/mL	4.1 µg/mL	5.7 µg/mL	5.1 µg/mL	5.6 µg/mL	5.3 µg/mL
14	6.8 µg/mL	5.4 µg/mL	7.3 µg/mL	6.7 µg/mL	7.4 µg/mL	6.8 µg/mL
18C	4.1 µg/mL	3.4 µg/mL	4.5 µg/mL	4.3 µg/mL	4.5 µg/mL	4.5 µg/mL
19A	5.1 µg/mL	4.2 µg/mL	5.5 µg/mL	5.3 µg/mL	5.6 µg/mL	5.4 µg/mL
19F	4.8 µg/mL	3.6 µg/mL	5.2 µg/mL	4.9 µg/mL	5.2 µg/mL	5.1 µg/mL
23F	3.0 µg/mL	2.4 µg/mL	3.4 µg/mL	3.3 µg/mL	3.5 µg/mL	3.4 µg/mL

EXAMPLE 2

FORMULATIONS COMPRISING SURFACTANT STABILIZE AND
PREVENT AGGREGATION OF STREPTOCOCCAL C5A PEPTIDASE

10

The streptococcal C5a peptidase (SCP) used in this example was expressed and purified as follows. The SCP was expressed recombinantly in *E. coli* using an arabinose inducible system. Standard fermentation protocols for *E. coli* using animal-free defined medium and subsequent cell lysis were followed. Recombinant SCP was purified from the soluble fraction of the cell lysate by saturation to 60% (approximately 3 M) ammonium sulfate while stirring for 12-24 hours. The saturated lysate was centrifuged, supernatant retained and loaded onto a phenyl Sepharose hydrophobic interaction column. Bound material was then eluted with 1 M ammonium sulfate, 20mM Tris-Cl, pH 7.5, concentrated, and diafiltered against PBS, pH 7.4. The purified recombinant SCP (rSCP) was diluted to ~10 mg/mL with PBS, pH 7.4 and passed through a Posidyne filter to remove endotoxin, followed by a final filtration (0.2 µm) for sterility and stored frozen (-25°C).

15

20

The purified SCP (55 µg/mL) was then formulated with 0.025% Tween™80 or without Tween™80 (0.0%) in the following buffers: 5 mM succinate buffer at pH 6.0, 10 mM phosphate buffer at pH 7.0, 10 mM phosphate buffer at 7.4 or 10 mM Tris

25

buffer at pH 7.5 and filled in separate BD Hypak SCF™ syringes. The syringes were then placed on an a horizontal orbital shaker at 2-8°C, shaken at 180 cpm for two days and the SCP protein concentration determined by the modified Lowry assay.

As shown in FIG. 1, the stability of SCP was greatly enhanced when formulated with Tween™80. For example, after two days on the orbital shaker, the SCP formulated without Tween™80 (FIG. 1A) demonstrated a significant decrease (e.g., greater than 90%) in the SCP concentration each of the buffers tested. However, as shown in FIG. 1B, the addition of 0.025% Tween™80 to the SCP buffer formulations, prior to being placed on the orbital shaker for two days, completely inhibited the SCP loss which was observed in FIG. 1A.

The storage stability of the SCP/Tween™80 (0.025%) formulation was also assessed at 25°C and 37°C for eight weeks and six weeks, respectively (data not shown). Briefly, the SCP (200 µg) was formulated in either succinate buffer or phosphate buffer as follows: succinate buffer (5 mM, pH 6.0) or phosphate buffer (15 mM, pH 7.4), 0.9% NaCl and 0.025% Tween™80. The stability of the SCP/Tween™80 formulations were assayed by size-exclusion-HPLC, modified Lowry total protein assay and visual inspection for precipitation. It was observed in this study, that the SCP/Tween™80 formulations (in either buffer) were completely stable at 25°C and 37°C for the entire stability study (i.e., up to eight weeks and six weeks, respectively).

EXAMPLE 3

THE INFLUENCE OF SILICONIZED CONTAINER MEANS ON THE STABILITY OF 13vPnC

Previous experiments indicated (data not shown) that 13vPnC immunogenic compositions precipitated and/or aggregated when filled in ready to use (single-dose) Becton Dickinson® (BD) Hypak Type 1 borosilicate glass syringes treated with Dow Corning® medical grade DC 360 silicone and capped with West 4432/50 latex free stoppers (chlorobutyl) and EZ tip cap West 7025/65 (Synthetic Isoprene Bromobutyl Blend; West Pharmaceutical®, Lionville, PA). In these experiments, the 13vPnC was formulated in 5 mM succinate buffer containing 0.85% NaCl and 4.4 µg/ml of *S. pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F and 8.8 µg/ml of *S. pneumoniae* serotype 6B, with and without 0.25mg/mL aluminum phosphate as an adjuvant. It was observed that, in the absence of AlPO₄, the 13vPnC particulates were readily observable, whereas, in the presence of AlPO₄, the 13vPnC particulates were significantly diminished and more difficult to detect.

In the present example, a series of container and closure components (*i.e.*, container means) were examined to identify what components were inducing or contributing to 13vPnC particulate formation. The container means tested comprised syringes, stoppers and vials and are listed below in Table 3. The BD and West stoppers listed in Table 3 were siliconized, using either the Huber or Jar process. The Huber process of siliconization is more controlled and yielded 30 to 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of silicone on the surface of the stopper, while the Jar process of siliconization resulted in 150 to 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of silicone on the surface of the stopper. Based on theoretical calculations, about 15% of the surface area of the stopper is exposed to the product in the syringe, suggesting that for the Huber and Jar process between 4.5 to 9 μg and 22.5 to 45 μg of silicone is extractable from the stoppers, respectively.

Materials

The silicone was Dow Corning® 360 Medical Fluid 1000 centistokes (batch No. 0001846266). The 7vPnC was formulated in 5 mM succinate buffer containing 0.85% NaCl and 4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. pneumoniae* serotypes 4, 9, 14, 18C, 19F and 23F and 8.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. pneumoniae* serotype 6B, with and without 0.25 mg/ml aluminum phosphate. The 13vPnC was formulated in 5 mM succinate buffer containing 0.85% NaCl and 4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F and 8.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. pneumoniae* serotype 6B, with and without 0.25 mg/ml aluminum phosphate. Monovalent *S. pneumoniae* serotype 6B was formulated (5 mM succinate buffer containing 0.85% NaCl, without aluminum phosphate) at a concentration of 61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to simulate the total saccharide concentration of the 13vPnC formulations.

Methods

The 7vPnC and 13vPnC were formulated as described above, and 35 ml of a given formulation was added to a clear 250 ml Nalgene® bottle. Into each Nalgene® bottle, the container means components listed in Table 3 were added. The Nalgene® bottles were then placed on a Labline® Orbit Shaker and swirled overnight at 50 rpm. The results are summarized in Table 3.

Visual Appearance. The Nalgene® bottles containing each of the container means components were held up to a fluorescence light in the laboratory. A path of a beam of light (Tindal effect) passing through the samples allowed for the detection of particulates.

Protein Assay. The total protein and protein bound to aluminum was determined by measuring the total protein concentration in the formulated immunogenic composition and the protein associated with the aluminum pellet,

respectively (an aliquot of the immunogenic composition was centrifuged and the pellet was re-suspended in saline). Assays were performed using the Pierce Modified Lowry protein assay (catalog # 23240) with bovine serum albumin as a standard.

5

RESULTS

10

In the first series of experiments, the 13vPnC immunogenic compositions were formulated without AlPO_4 and exposed to a series of container means listed below in Table 3. It was clearly evident from the data (Table 3), that the container means components that were treated with silicone oil induced the formation of white particles. In contrast, no particulates were detected in the presence of the non-siliconized Daikyo® stoppers (Daikyo Seiko, Ltd., Japan) and Schott vials (Schott North America Inc., Lebanon, PA).

TABLE 3
EFFECT OF DIFFERENT CONTAINER MEANS COMPONENTS ON 13vPnC, FORMULATED
WITHOUT ALPO₄

Container Means Components	Number of Container Means Components Added	Appearance (Visual Inspection)
Control-13vPnC without AlPO ₄	None	No Particulate
BD Hypak BSCF 1-3 ml 4432/50 Grey Si WWD Stoppers	10	Particulates
BD Hypak BSCF 1-3 ml 4432/50 Grey Si Huber Processed Stoppers	10	Particulates
West 890 Ready to Sterilize Stoppers	10	Particulates
BD Hypak BSCF 1-3 ml W4416/50 Grey Si 1000 WWD Stoppers	10	Particulates
Helvoet 6213 Stoppers	10	Particulates
Daikyo Vial Stoppers (D777-1 B2-40 F451 plug stoppers)	10	No Particulate
BD Hypak BSCF 1-3ml LLA EZGTC W7025/65 Syringe Barrels	4	Particulates
Hypak NSCF 1-3 ml 4023/50 B2-40 Daikyo Stoppers	10	No Particulate
Syringe E-Z Grip Tip Cap W7025/65 EZ IITC	10	No Particulate
2 ml, 13 mm Schott Type 1 glass vials	4	No Particulate
Silicone Oil (Dow Chemical Medical grade 360)	500 µL (1.43%)	Particulates
Schott TopPac Syringes	4	No Particulate

5 The monovalent *S. pneumoniae* serotype 6B was chosen as a model for the 13vPnC and was formulated at 61.6 µg/ml (without AlPO₄) to simulate the total saccharide concentration in the 13vPnC formulation. Silicone (Dow Corning 360 Medical Fluid) was added to aliquots of the formulated monovalent 6B, ranging from 2 ppm to 100 ppm. The mixtures were placed on a Labline® Orbit Shaker for 2
10 hours at 50 rpm. As indicated below in Table 4, fiber-like white particulates were observed at all silicone (Si) concentrations.

TABLE 4
EFFECT OF SILICONE CONCENTRATION ON THE FORMATION OF PARTICULATES

Silicone Concentration	Appearance (Visual Inspection)
2 ppm (1 µl of Si to 500 mL Formulation)	Fiber-like white particulates
5 ppm (2.5 µl of Si to 500 mL Formulation)	Fiber-like white particulates
10 ppm (5 µl of Si to 500 mL Formulation)	Fiber-like white particulates
15 ppm (7.5 µl of Si to 500 mL Formulation)	Fiber-like white particulates
20 ppm (10 µl of Si to 500 mL Formulation)	Fiber-like white particulates
100 ppm (2µl of Si to 20 mL Formulation)	Fiber-like white particulates

5 The amount of silicone in 13vPnC formulations (without AlPO₄) was also examined. The silicone concentration was determined by DC Plasma Emission Spectroscopy (data not shown). In this method, the content of 25 syringes were pooled and extracted with two 50 ml portions of cyclohexane/isopropyl alcohol mixture. The extracts were combined and evaporated. The residual was solubilized and tested as per existing methods for silicone determination on rubber stoppers.
10 The results indicated that between 15.8 to 19.0 µg of silicone is extractable from each syringe. This amount corresponds to 2.7% to 3.3% of silicone.

 In a separate series of experiments, in which the 13vPnC was formulated in the presence of AlPO₄ and subjected to the same container means set forth in Table
15 3, it was elucidated that the silicone and the "free" protein (13vPnC) in solution was responsible for the formation of the particulates (data not shown). FTIR analysis of the particulates also indicated that the particulate consisted of protein and silicone (data not shown). It was determined in these experiments, that about 85% of the 13vPnC is bound to the AlPO₄, wherein the remaining 15% was free (not bound to
20 AlPO₄) 13vPnC in solution. In contrast, it was observed that 7vPnC formulated with AlPO₄ was 100% bound to the AlPO₄ (data not shown).

 To elucidate the effect of free protein-polysaccharide on the formation of particulates, 25 ml of both 7vPnC and 13vPnC were aliquoted and transferred to a 50 ml centrifuge tube. The samples were centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm and
25 the supernatant was carefully extracted and transferred to a Nalgene® bottle. Ten siliconized stoppers (4432 Stoppers) were added to each bottle and placed on orbital shaker at 50 rpm. After careful visual inspection, it was observed that the 7vPnC supernatant exhibited no particulate formation, thereby remaining clear and colorless.

However, the 13vPnC supernatant began to show low levels of particulate in the fourth hour of observation (data not shown). This result suggested that the free protein-polysaccharide in solution, in conjunction with silicone, is responsible for the formation of the particulates.

5 To further elucidate the contribution of the free protein-polysaccharide in solution to the formation of particulates, monovalent *S. pneumoniae* serotypes 4 and 6B were chosen for their high and low binding to aluminum, respectively. These two monovalents were formulated at protein concentration ranging from 25 µg/ml to 200 µg/ml in the absence and presence of AlPO_4 . Ten siliconized stoppers (4432
10 stoppers) were placed in each formulation, which were then placed on the orbit shaker at 50 rpm. As indicated below in Table 5, fiber-like white particulates were observed for both monovalent serotypes at all protein concentrations in the absence of AlPO_4 . However, in the presence of AlPO_4 , particulates were detected at lower concentrations for serotype 4 (100 µg/ml) versus serotype 6B (200 µg/ml), data not
15 shown.

TABLE 5
EFFECT OF PROTEIN CONCENTRATION ON THE FORMATION OF PARTICULATES

	Appearance (Visual Inspection)	
	Without AlPO ₄	With AlPO ₄
25 µg/mL of 6B	Fiber-like white particulates	No particulates
50 µg/mL of 6B	Fiber-like white particulates	No particulates
75 µg/mL of 6B	Fiber-like white particulates	No particulates
100 µg/mL of 6B	Fiber-like white particulates	No particulates
200 µg/mL of 6B	Fiber-like white particulates	Fiber-like white particulates
25 µg/mL of Type 4	Fiber-like white particulates	No particulates
50 µg/mL of Type 4	Fiber-like white particulates	No particulates
75 µg/mL of Type 4	Fiber-like white particulates	No particulates
100 µg/mL of Type 4	Fiber-like white particulates	Fiber-like white particulates
200 µg/mL of Type 4	Fiber-like white particulates	Fiber-like white particulates

5

EXAMPLE 4

ALUMINUM ADJUVANTS INHIBIT THE FORMATION OF 13vPnC PARTICULATES IN THE
PRESENCE OF SILICONIZED CONTAINER MEANS

As set forth above in Example 3, a 13vPnC immunogenic composition is a liquid formulation comprising 4.4 µg/mL of *S. pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F and 8.8 µg/mL of type 6B in 5 mM succinate buffer (pH 5.8) and 0.85% NaCl, which may also be formulated with or without an adjuvant (e.g., an aluminum adjuvant). The 13vPnC may also be formulated with or without an adjuvant, such as 0.25 mg aluminum/ml aluminum phosphate (AlPO₄). It was observed in Example 3, that 13vPnC formulated without AlPO₄ and filled in BD Hypak SCF™ syringes (capped with Hypak plungers) failed visual inspection due to the observation of particulates, wherein further studies revealed that the particulates were in part a result of protein-polysaccharide interactions with silicone. In the following example, syringes (and plungers) from various vendors were evaluated with 13vPnC formulations, wherein shipping and handling conditions were simulated via agitation (described below).

15
20

Materials

The 13vPnC was formulated in 5 mM succinate buffer containing 0.85% NaCl and 4.4 µg/ml of *S. pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F and 8.8 µg/ml of *S. pneumoniae* serotype 6B, with and without 0.25 mg/ml aluminum phosphate. The container means tested are listed below in Table 6.

5

TABLE 6
CONTAINER MEANS

	Container Means	Description
	1 Vetter syringes Type 1 untreated glass	1ml long bulk format
	2 Schott TopPac® syringes	Plastic syringes
	3 BD Baked syringes Type 1 untreated glass	0.1 mg silicone/barrel
	4 BD Baked syringes Type 1 untreated glass	0.04 mg silicone/barrel
	5 BD High viscosity syringes Type 1 untreated glass	2.25 ml syringes 12500 cst silicone
	6 BD High viscosity syringes Type 1 untreated glass	1.0 ml syringes 12500 cst silicone
	7 BänderGlas syringes, PS2 Type 1 untreated glass	0.056 mg silicone/barrel
	8 BänderGlas syringes, PS4 Type 1 untreated glass	0.14 mg silicone/barrel
	1 West 4023/50 Flurotec® B2-40 plungers	Flurotec® plungers
	2 West 4023/50 Flurotec® B2-40 plungers	Flurotec® plungers
	1 13vPnC with AlPO ₄ in BD Hypak syringes with West 4432 ready to use plungers and 7025/65 EZ tip caps	Positive control, high silicone
	2 13vPnC with AlPO ₄ in un-siliconized syringes with West 4023/50 Flurotec® B2-40 plungers	Negative control, not treated with silicone

Methods

10

Formulation and Fill Procedure. Listed below in Table 7 is the recipe for a 2 liter 13vPnC formulation. Briefly, the 0.85 % saline was first added to a glass beaker, followed by the 5 mM succinate buffer (pH 5.8), and then sequentially each of the *S. pneumoniae* serotype conjugates. The formulation was then gently mixed on a stirrer plate and filtered through a 0.22 µm Millipore® filter unit. For formulation comprising AlPO₄ ; the AlPO₄ (0.25 mg/ml final concentration) was then added and the formulation gently mixed. The test syringes were then filled (0.58 ml/syringe) and capped with plungers.

15

Shipping Simulation via Agitation. A VWR® signature Digital Multitube vortexer (Catalog No. 14005-826) was used to agitate the samples. The syringes filled with 13vPnC were placed horizontal and fixed by the two support plates of the

20

vortexer. Samples were held at horizontal position and agitated at 500 rpm pause mode at 2-8°C for twenty-four hours.

Nephelometry. Serotype specific antigenicities were determined by a rate nephelometry assay using type-specific antibodies. For 13vPnC with AlPO₄, the aluminum phosphate was solubilized by adding 1N NaOH. The solution was immediately neutralized by adding 1M citric acid. For 13vPnC without AlPO₄, no solubilization and neutralization procedures were performed. The assay measures the rate of change of light scattering intensity derived from the antibody-antigen complex formed in the sample using Beckman Array 360 nephelometer.

TABLE 7
13vPnC FORMULATION TABLE

Component	Batch Size (L)	Bulk Conc (mg/mL)	Required Conc (ug/mL)	13vPnC with AlPO ₄ Volume (mL)	13vPnC without AlPO ₄ Volume (mL)
serotype 1	2.000	0.506	4.4	17.39	17.39
serotype 3	2.000	0.256	4.4	34.38	34.38
serotype 4	2.000	0.530	4.4	16.60	16.60
serotype 5	2.000	0.515	4.4	17.09	17.09
serotype 6A	2.000	0.519	4.4	16.96	16.96
serotype 6B	2.000	0.489	8.8	35.99	35.99
serotype 7F	2.000	0.500	4.4	17.60	17.60
serotype 9V	2.000	0.521	4.4	16.89	16.89
serotype 14	2.000	0.518	4.4	16.99	16.99
serotype 18C	2.000	0.509	4.4	17.29	17.29
serotype 19A	2.000	0.511	4.4	17.22	17.22
serotype 19F	2.000	0.520	4.4	16.92	16.92
serotype 23F	2.000	0.511	4.4	17.22	17.22
Succinate Buffer in 0.85% Saline, pH 5.8	2.000	50.0	5000	200.0	200.0
AlPO ₄	2.000	3.250	250	153.85	NA
Saline	2.000	NA	NA	1387.62	1541.46

RESULTS

In this study, syringes from different vendors, having different silicone levels (Table 6), were subject to controlled agitation conditions. The total antigenicity of each serotype was measured by Nephelometry assay for both pre-agitation and post-agitation samples. Antigenicity loss following agitation (percentage) was calculated and is shown in FIG. 2 through FIG. 7.

Prior to the study, the agitation conditions were optimized based on the antigenicity loss of the two controls: (1) the worst-case control (positive control, high silicone; FIG. 2) and (2) the best-case control (negative control, no silicone; FIG. 3). The conditions were then optimized such that the antigenicity loss was low in positive

control, yet detectable in the negative control. This was to ensure that the agitation was neither too weak to produce precipitation in the syringes; nor too strong, such that the precipitation might be caused by factors other than the silicone interaction (e.g., by shear forces). Thus, agitation at 500 rpm (pause mode) for twenty-four hours was chosen as the most suitable agitation condition, while a temperature of 2-8°C and a horizontal position were used to simulate the conditions in real time product shipping and handling.

The results of the study are summarized as follows: The largest antigenicity losses of the 13vPnC formulated with AlPO_4 occurred in the syringes with higher silicone levels (data not shown). For example, of the syringes listed in Table 6, the BD Hypak syringe (control 1), the BD baked syringe (syringe 3; 0.1 mg silicone), the BD high viscosity (syringe 5) and the BänderGlas PS4 syringe (syringe 8, 0.14 mg silicone), each had one or more of the 13vPnC serotypes with greater than 10% antigenicity loss. The smallest antigenicity losses of the 13vPnC formulated with AlPO_4 occurred in the syringes with lower silicone levels. For example, the Vetter syringes (FIG. 4) and the Schott TopPac plastic syringes (FIG. 5) were most similar to un-siliconized syringes (FIG. 2), both demonstrating minor antigenicity losses for 13vPnC formulated with AlPO_4 .

The influence of the aluminum phosphate on stabilizing the 13vPnC and inhibiting particulate formation in the presence of siliconized syringes was analyzed in experiments using 13vPnC formulated with and without 0.25 mg/ml AlPO_4 , wherein syringes used were the BD baked low silicone syringes (syringe 4 in Table 6) and the BänderGlas low silicone PS2 syringes (syringe 7 in Table 6). The BD baked low silicone syringes (0.04 mg silicone/barrel) typically had less than 10% antigenicity loss for the 13vPnC serotypes formulated with AlPO_4 (FIG. 6A), whereas the antigenicity loss for the 13vPnC serotypes formulated without AlPO_4 (FIG. 6B) had antigenicity losses ranging from 5% (serotype 1) up to about 50% (serotype 23F). The BänderGlas low silicone PS2 (0.056 mg silicone/barrel) syringes had less than 5-8% antigenicity loss (depending on serotype) for 13vPnC formulated with AlPO_4 (FIG. 7A), whereas the antigenicity loss for the 13vPnC serotypes formulated without AlPO_4 (FIG. 7B) had antigenicity losses ranging from about 5% to about 30% (depending on serotype).

Thus, these data taken together indicate that: (1) the antigenicity loss of 13vPnC was greater in the syringes with higher silicone levels and (2) the 13vPnC formulated without AlPO_4 sustained greater antigenicity losses than 13vPnC with AlPO_4 in all of the syringes tested.

EXAMPLE 5

FORMULATIONS COMPRISING SURFACTANT OPTIMIZE THE BINDING OF
MENINGOCOCCAL ANTIGENIC PROTEINS TO ALUMINUM SALT ADJUVANTS

5 The recombinant lipidated *N. meningitidis* 2086 protein (rLP2086) used in this example was expressed and purified as follows. The rLP2086 was expressed recombinantly in *E. coli* utilizing a native leader sequence. Standard fermentation protocols for *E. coli* using animal-free defined medium and subsequent cell lysis were followed. Recombinant lipidated *N. meningitidis* 2086 protein was purified from the membrane pellet with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% sarcosyl pH 8. This sarcosyl
10 extract was adjusted to 1% Zwittergent 3-14 (Z3-14) and dialyzed twice against a 30 fold excess of 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Z3-14. The dialyzed rLP2086 extract was precipitated with 90% ethanol to remove remaining sarcosyl, and solubilized with 50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Z3-14 pH 8. Insoluble material was removed by centrifugation, the supernatant was passed over an anion exchange chromatography
15 column, and rLP2086 was collected in the unbound fraction. The unbound material was then dialyzed twice against a 30-fold excess of 25mM 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).

20 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
	120	82
5 mM Succinate buffer pH 6.0 containing 150 mM NaCl, 0.02% polysorbate 80 and 0.25 mg Al/mL of AlPO ₄	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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Chantelau, "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.
- 30 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.
- 35 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.

5 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
5 has a pKa of about 3.5 to about 7.5, (ii) a surfactant and (iii) one or more polysaccharide-protein conjugates.
2. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate formulation is comprised in a container means selected from one or more of
10 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 1, wherein the container means is siliconized.
4. The formulation of claim 1, wherein the buffer is succinate at a final
15 concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.
5. The formulation of claim 1, wherein the surfactant is polysorbate 80.
6. The formulation of claim 5, wherein the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is at least 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume
20 of the formulation.
7. The formulation of claim 1, wherein the polysaccharide-protein conjugate comprises one or more pneumococcal polysaccharides.
8. The formulation of claim 1, further comprising one or more meningococcal
25 polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof.
9. The formulation of claim 1, further comprising one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a
30 combination thereof.
- 35

10. 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.
11. 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. 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.
12. The formulation of claim 1, wherein the formulation further comprises an adjuvant.
13. The formulation of claim 12, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

14. A formulation which stabilizes a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) a surfactant and (iii) a streptococcal C5a peptidase.
- 5
15. The formulation of claim 14, wherein the SCP 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.
- 10
16. The formulation of claim 15, wherein the container means is siliconized.
- 15
17. The formulation of claim 14, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.
18. The formulation of claim 14, wherein the surfactant is polysorbate 80.
- 20
19. The formulation of claim 18, wherein the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.
- 25
20. The formulation of claim 14, wherein the SCP composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide.
- 30
21. The formulation of claim 14, wherein the SCP composition further comprises one or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.
- 35
22. The formulation of claim 14, wherein the formulation further comprises an adjuvant.

23. The formulation of claim 22, wherein the adjuvant is aluminum hydroxide, aluminum phosphate or aluminum sulfate.
- 5 24. A formulation which inhibits silicone induced aggregation of a polysaccharide-protein conjugate comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, (ii) an aluminum salt and (iii) one or more polysaccharide-protein conjugates.
- 10 25. The formulation of claim 24, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.
26. The formulation of claim 24, further comprising polysorbate 80 (Tween™80), wherein the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is at
15 least 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.
27. The formulation of claim 24, wherein the polysaccharide-protein conjugate comprises one or more pneumococcal polysaccharides.
- 20 28. The formulation of claim 24, further comprising one or more meningococcal polysaccharides, one or more meningococcal antigenic proteins, or a combination thereof.
- 25 29. The formulation of claim 24, further comprising one or more streptococcal polysaccharides, one or more streptococcal antigenic proteins, or a combination thereof.
- 30 30. The formulation of claim 24, wherein the formulation further comprises an adjuvant.
- 35 31. A formulation which inhibits silicone induced aggregation of a streptococcal C5a peptidase (SCP) composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5, (ii) an aluminum salt and (iii) a streptococcal C5a peptidase.

32. The formulation of claim 31, wherein the buffer is succinate at a final concentration of 1 mM to 10 mM and pH 5.8 to 6.0.
- 5 33. The formulation of claim 31, further comprising polysorbate 80 (Tween™80), wherein the final concentration of the polysorbate 80 in the formulation is at least 0.01% to 10% polysorbate 80 weight/volume of the formulation.
- 10 34. The formulation of claim 31, wherein the SCP composition further comprises one or more polypeptides selected from the group consisting of a streptococcal polypeptide, a pneumococcal polypeptide, a meningococcal polypeptide and a staphylococcal polypeptide.
- 15 35. The formulation of claim 31, wherein the SCP composition further comprises one or more polysaccharides selected from the group consisting of a streptococcal polysaccharide, a pneumococcal polysaccharide, a meningococcal polysaccharide and a staphylococcal polysaccharide.
- 20 36. The formulation of claim 31, wherein the formulation further comprises an adjuvant.
- 25 37. A formulation which stabilizes a *N. meningitidis* 2086 protein composition, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, (ii) a surfactant and (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein.
- 30 38. The formulation of claim 37, wherein the surfactant is polysorbate 80.
39. The formulation of claim 37, wherein the formulation further comprises an aluminum salt adjuvant.
- 35 40. A formulation which inhibits silicone induced aggregation of a *N. meningitidis* 2086 protein composition comprised in a siliconized container means, the formulation comprising (i) a pH buffered saline solution, wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5, (ii) an aluminum salt and (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein.

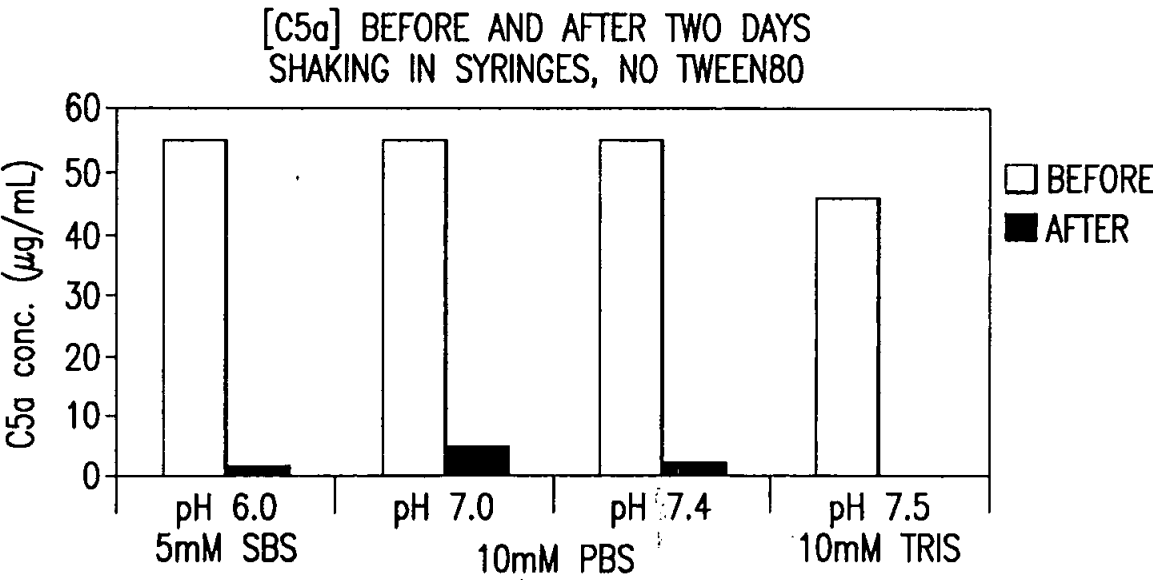


FIG.1A

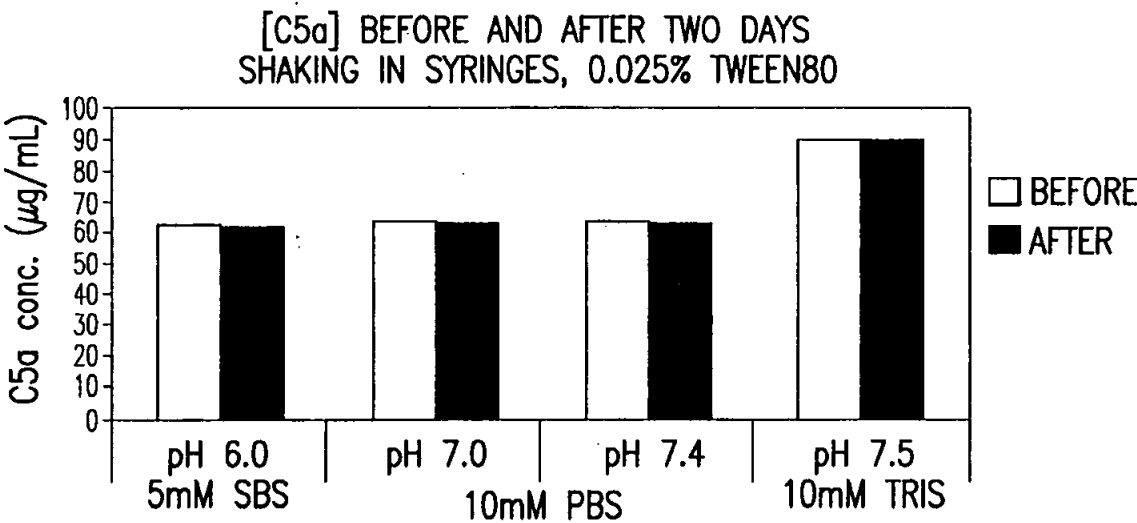


FIG.1B

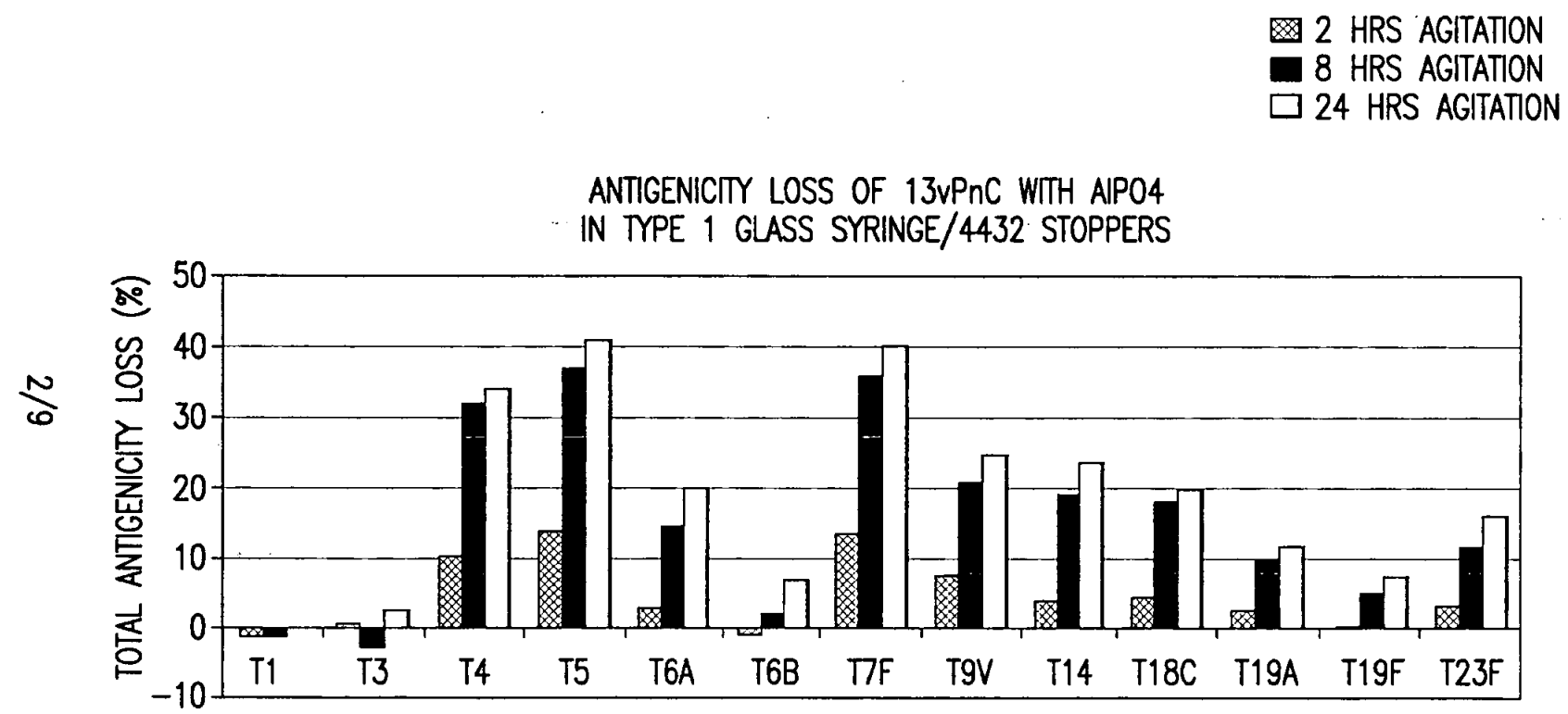


FIG.2

3/9

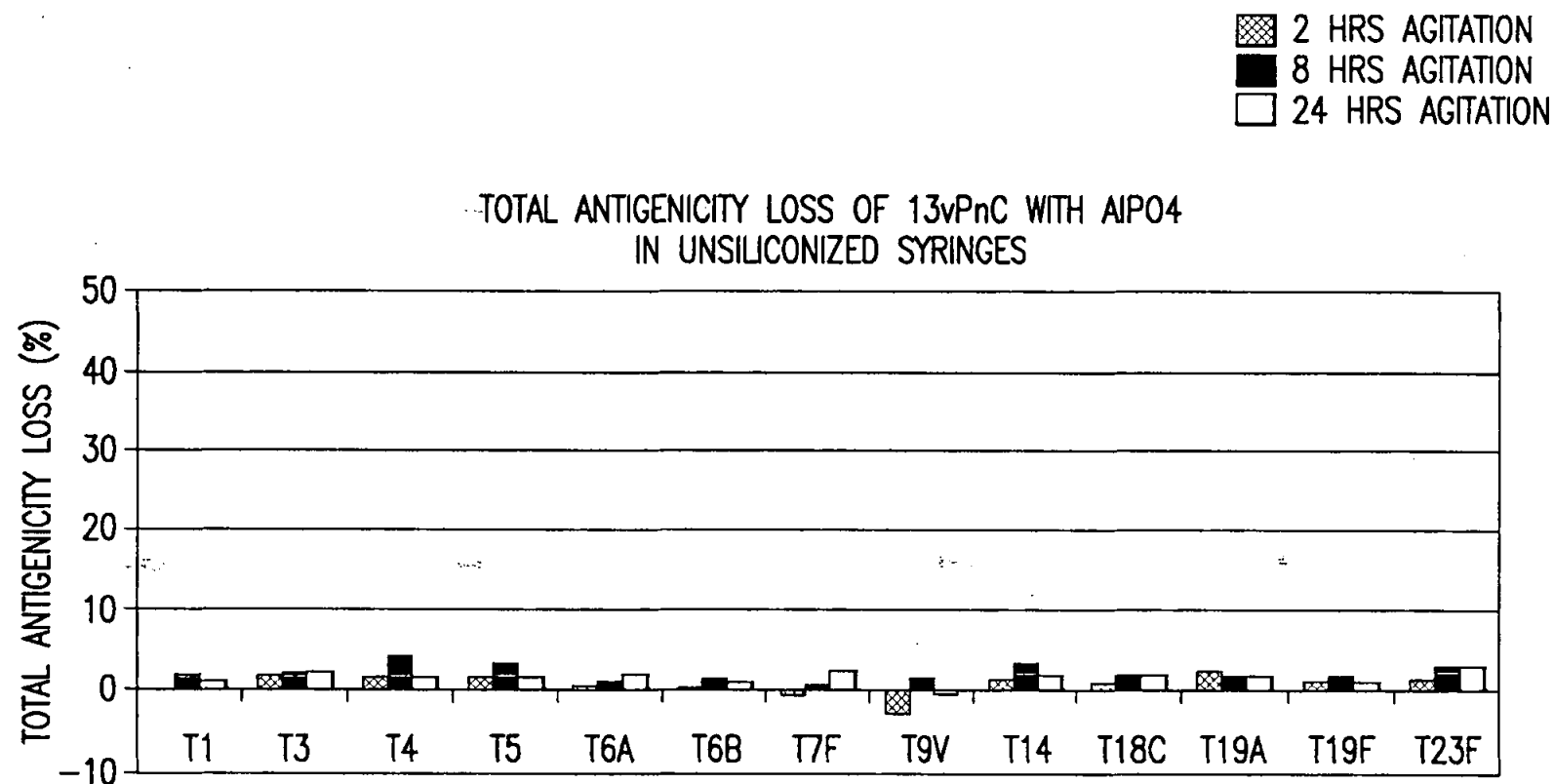


FIG.3

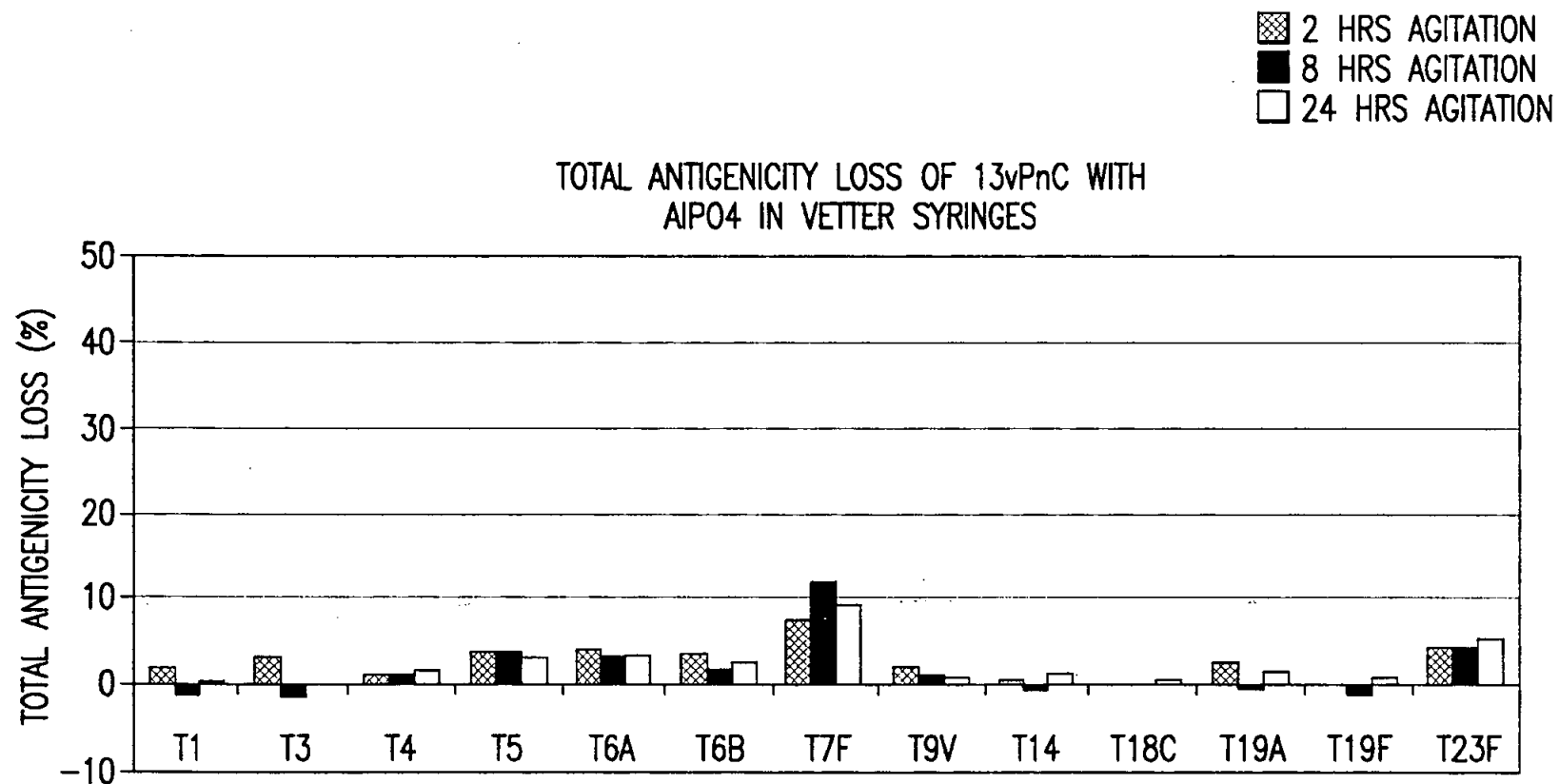


FIG.4

5/9

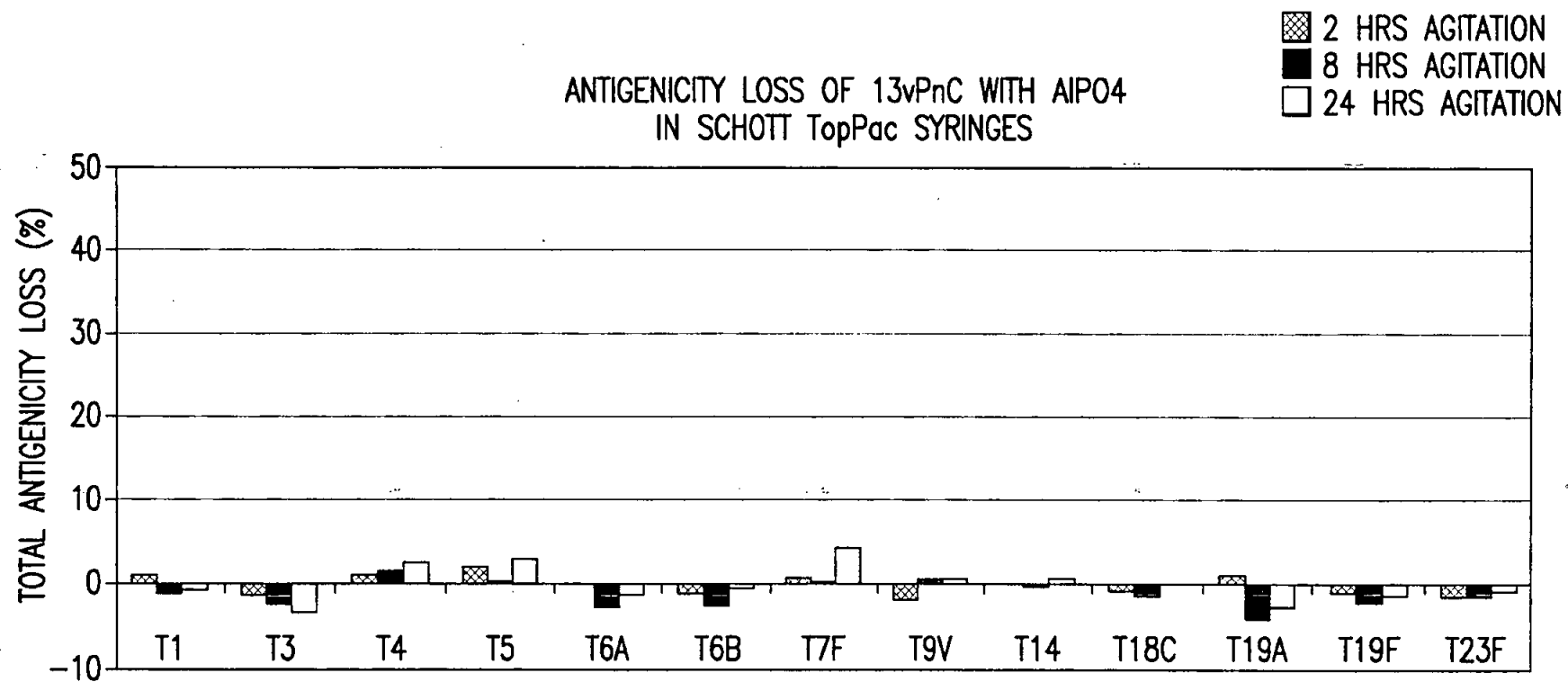


FIG.5

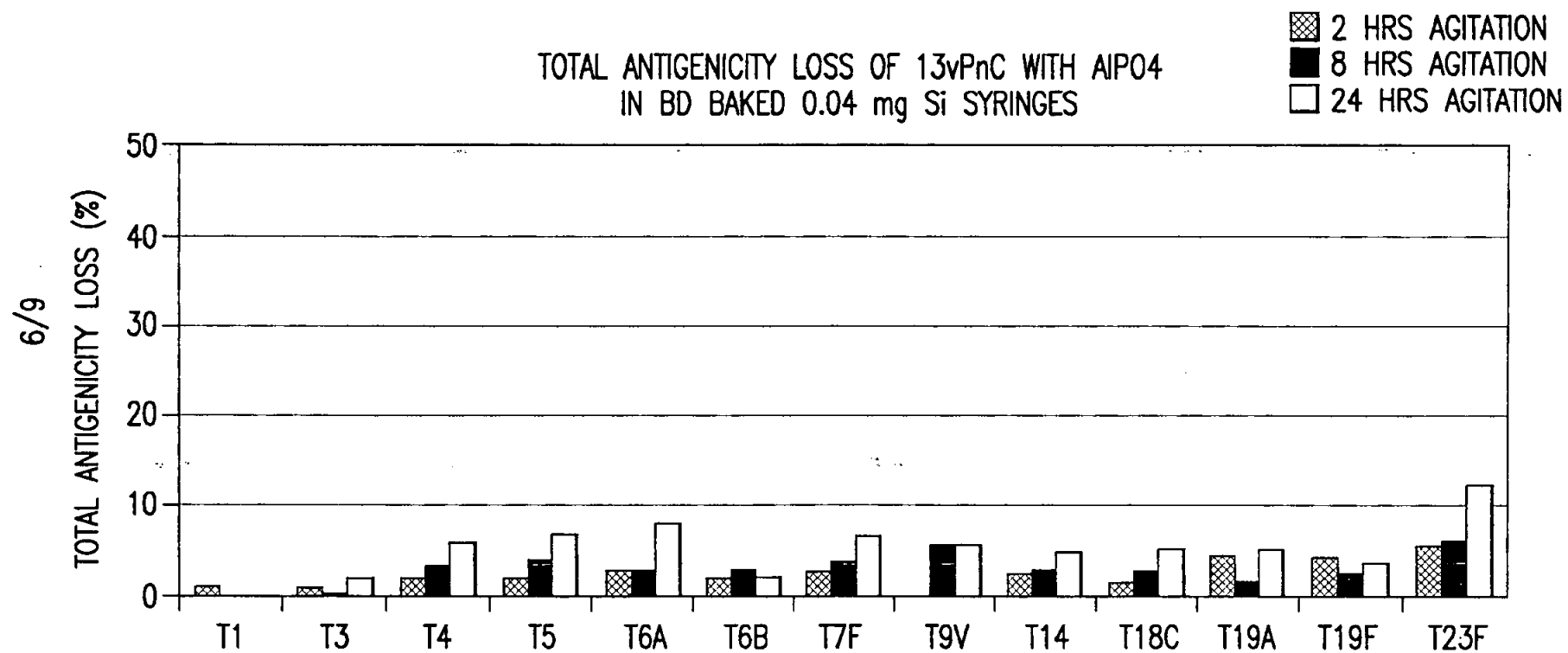


FIG.6A

6/7

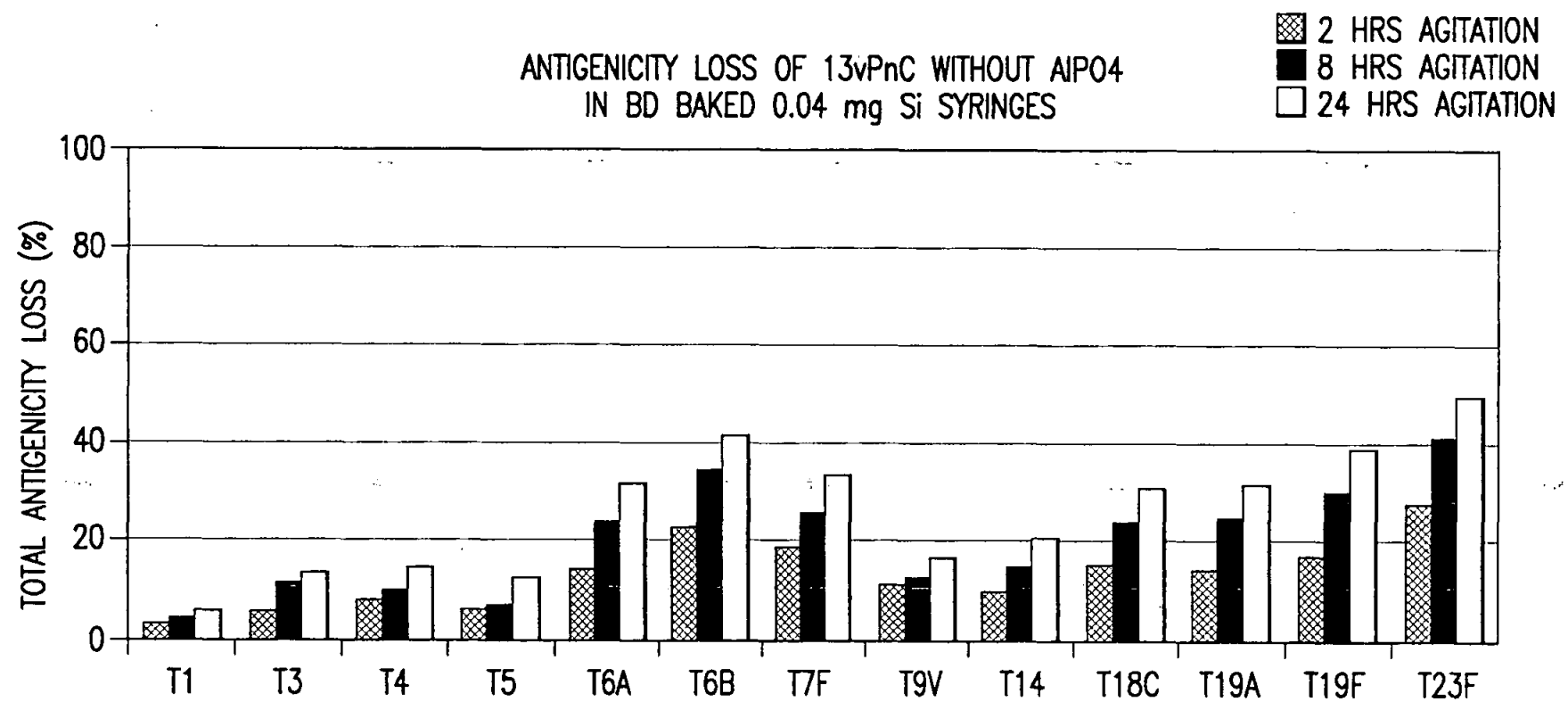


FIG.6B

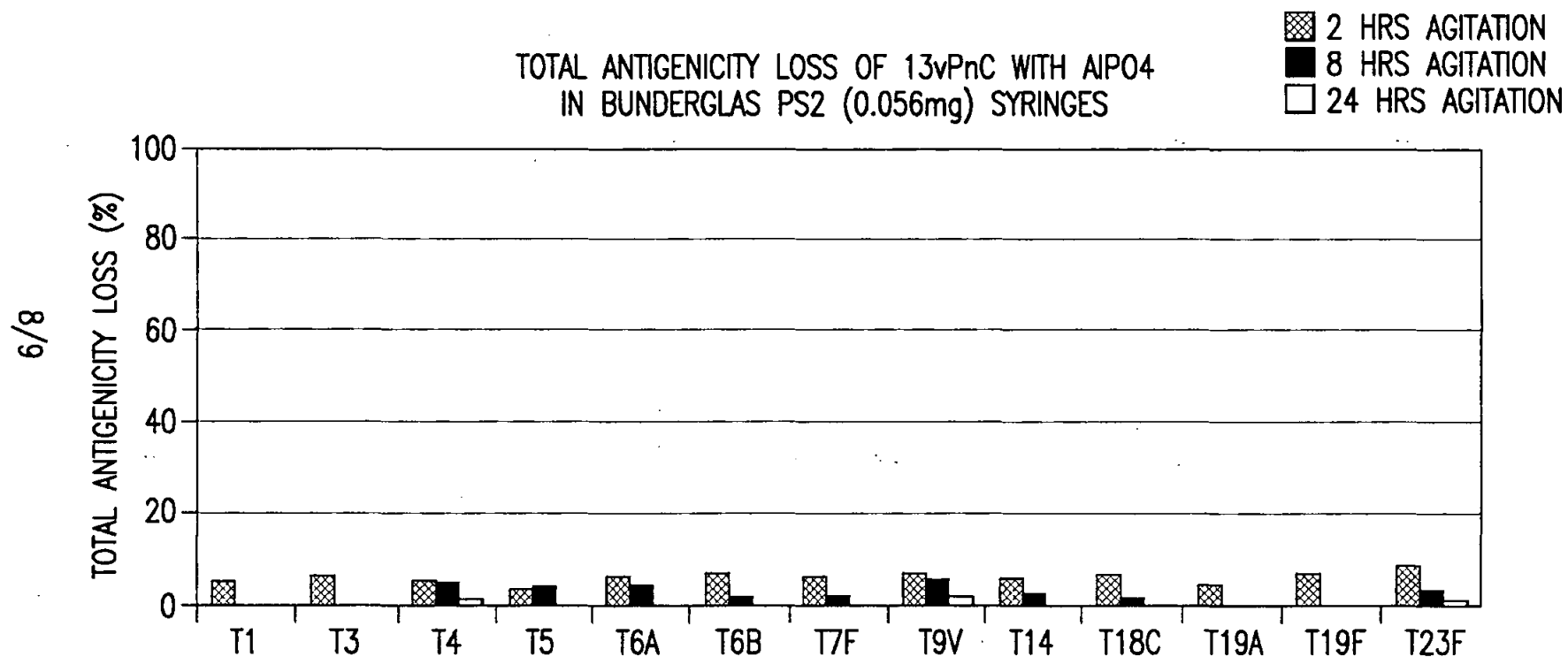


FIG.7A

6/6

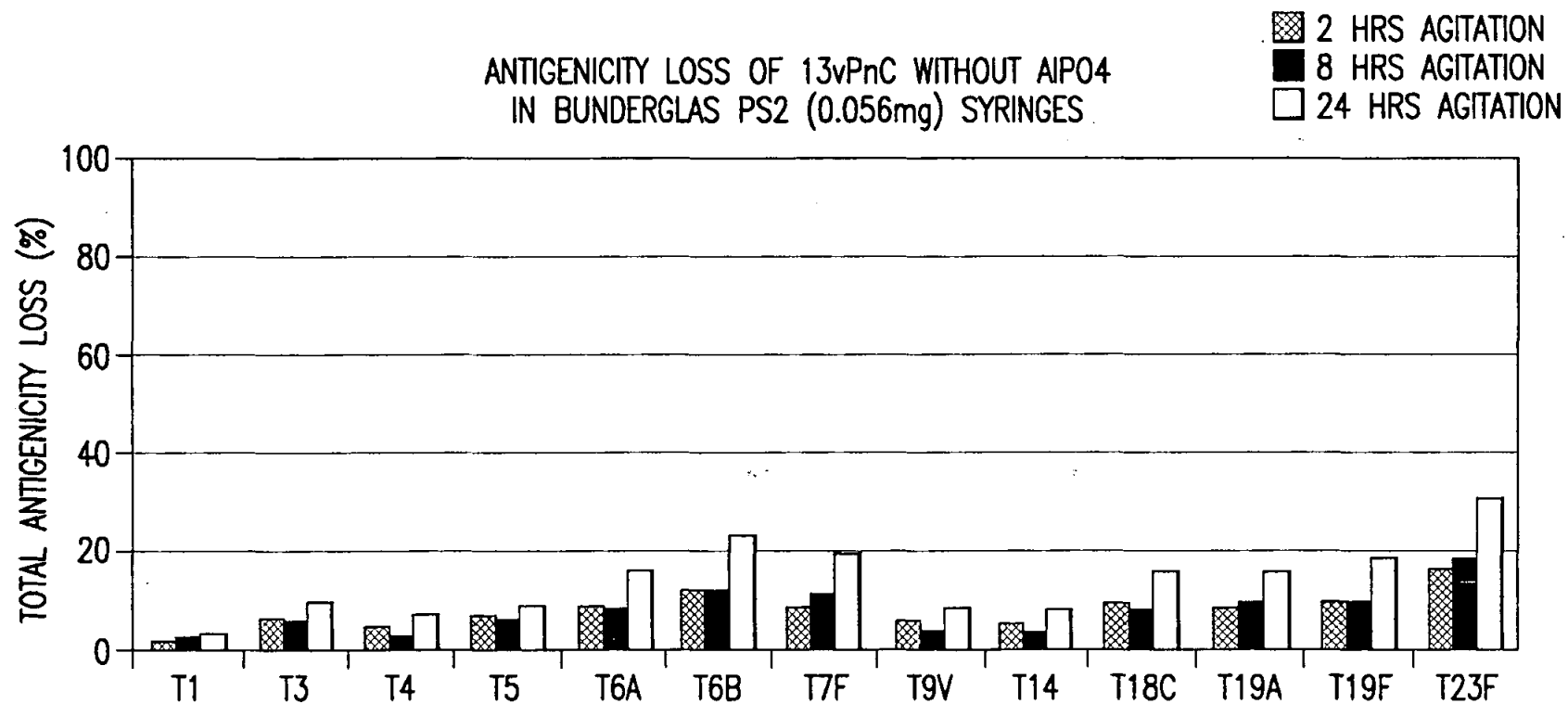


FIG.7B

nnnn

Debra
non

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:	Alston & Bird
CASH, David, E.	JUL 05 2007
Alston & Bird LLP	Received by R
Bank Of America Plaza	
101 South Tryon Street, Suite 4000	
Charlotte, NC 28280-4000	
ETATS-UNIS D'AMERIQUE	

Date of mailing (day/month/year) 20 June 2007 (20.06.2007)	
Applicant's or agent's file reference AM102129(326169)	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/066959	International filing date (day/month/year) 19 April 2007 (19.04.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published.	Priority date (day/month/year) 26 April 2006 (26.04.2006)
Applicant	WYETH et al

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
26 April 2006 (26.04.2006)	60/795,261	US	06 June 2007 (06.06.2007)

ALSTON & BIRD
be RTA 7/6/07
RECEIVED

DOCUMENT
By <i>[Signature]</i>
Date 7-5-07

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

e-mail

Telephone No. +41 22 338 74 01

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

1/DAJB0SUW0

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/066959

International filing date (day/month/year)
19.04.2007

Priority date (day/month/year)
26.04.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/12 A61K47/48

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Boulois, Denis

Telephone No. +31 70 340-3878



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/066959

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/066959

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 14-40

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 14-40

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

 International application No.
PCT/US2007/066959

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
 - ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
 - ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-13

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3,4,10,11,13</u>
	No: Claims	<u>1,2,5-9,12</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-13</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-13</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that there are 6 inventions covered by the claims indicated as follows:

Subject 1): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claims 1-13)

Subject 2): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5 (ii) a surfactant (iii) a streptococcal C5a peptidase (claims 14-23)

Subject 3): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claims 24-30)

Subject 4): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5 (ii) an aluminium salt (iii) a streptococcal C5a peptidase (claims 31-36)

Subject 5): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein (claims 37-39)

Subject 6): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a *N. meningitidis* 2086 protein (claim 40)

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

1. The problem to be solved by the present application is to provide a formulation which stabilizes and inhibits precipitation of immunogenic compositions.

2. The solutions proposed by the Applicant in its broader form are:

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claim 1)

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5 (ii) a surfactant (iii) a streptococcal C5a peptidase (claim 14)

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claim 24)

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a streptococcal C5a peptidase (claim 31)

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a N. meningitidis 2086 protein (claim 37)

- a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a N. meningitidis 2086 protein (claim 40)

3. The use of a buffer with a Pka of 3.5 to 7.5 with a surfactant to stabilize a composition against aggregation is further known from the following documents:

- WO0141800 is directed to the same problem than the present application, namely the stabilisation of a composition against aggregation; the active agent may be a conjugate polypeptide-polysaccharide (see p. 4, l 8-11 ; p. 7, l. 31-p. 8, l. 6; p. 9. l. 18-27 ; examples and claims). One stabilizing composition used comprises a surfactant such as Tween and a buffer such as a Histidine buffer. These compounds are among the preferred

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

compounds of present application (see Table 3 of WO0141800).

- WO03039485 shows the stabilizing effect on proteins of a composition comprising succinate or histidine buffer with polysorbate as surfactant (see p. 1, l. 12-17; p. 2, l. 1-31; p. 3, l. 5-18; p. 11, l. 8-29 , examples and claims)
- WO200539620 also discloses the stabilisation against aggregation of a protein by a surfactant like polysorbate with a buffer combination, such as a succinate buffer (see p. 8, l. 15-26; p. 9, l. 26 - p. 10, l. 7).

Moreover a composition comprising a conjugate polysaccharide-protein, a surfactant, and a buffer with a Pka of 3.5 to 7.5 is also known from following documents:

- US2004/0047882 discloses compositions comprising polysorbate, a citrate buffer and a conjugate (see claims 1 and 5,6; see par. [013])
- EP-A-941738 shows a composition comprising a conjugate of lipopolysaccharide with a surfactant, namely QS21 and a phosphate buffer system (par. [053]).
- US6224880 discloses a vaccine made from a conjugate, combined with a surfactant (tween) with a phosphate buffer (see example and claims)

The use of an Aluminium salt with a buffer such as a phosphate buffer to stabilize a protein composition against aggregation is known from WO0205846 (see p. 2, l. 14-20; p. 3, l. 13-20; p. 4, l. 6-13 p. 13, l. 14, examples and claims).

The idea to use a composition comprising "i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 or from 3.5 to 6.5 with (ii) a surfactant or an aluminium salt " as stabilizing composition is therefore not novel, because it is already known from the cited prior art documents.

All these documents disclose compositions from which the presently claimed compositions differ in the nature of the immunogenic substance in the case of claims 1, 14, 24, 31, 37, and 40.

The technical contribution to the known prior art is therefore the nature of the immunogenic substance. All these technical contributions are different (polysaccharide-protein conjugate in claims 1 and 24, streptococcal C5s peptidase in claims 14 and 31, N. meningitidis 2086 protein in claims 37 and 40).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

In the present application, no further technical feature can be distinguished that can be regarded as a "special technical feature" involved in the technical relationship among the different inventions. Each of the invention listed below is a distinct invention, characterized by its own technical feature, defining the contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

Consequently, there is lack of unity a posteriori and the different inventions not belonging to a common inventive concept are formulated as the different subjects on the communication pursuant to Rule 13 PCT.

Furthermore, searching this plurality of different inventions would have caused "major additional searching efforts".

The application has to be divided into the following subjects:

Subject 1): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claims 1-13)

Subject 2): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5 (ii) a surfactant (iii) a streptococcal C5a peptidase (claims 14-23)

Subject 3): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a polysaccharide-protein conjugate (claims 24-30)

Subject 4): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 6.5 (ii) an aluminium salt (iii) a streptococcal C5a peptidase (claims 31-36)

Subject 5): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) a surfactant (iii) a N. meningitidis 2086 protein (claims 37-39)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

Subject 6): a formulation comprising (i) a pH buffered saline solution wherein the buffer has a pKa of about 3.5 to about 7.5 (ii) an aluminium salt (iii) a N. meningitidis 2086 protein (claim 40)

Only the first subject was searched.

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to following documents:

- D1: US 2004/047882 A1 (BROEKER MICHAEL [DE]) 11 March 2004 (2004-03-11)
- D2: EP-A-0 941 738 (AMERICAN CYANAMID CO [US] WYETH CORP [US]) 15 September 1999 (1999-09-15)
- D3: US-B1-6 224 880 (CHAN CHRISTINA Y [US] ET AL) 1 May 2001 (2001-05-01)
- D4: WO 02/05846 A (GREEN CROSS VACCINE CO LTD [KR]; BAE CHEON SOON [KR]; LIM GWAN YEUL [K]) 24 January 2002 (2002-01-24)
- D5: WO 01/41800 A (CHIRON CORP [US]; ESIKOVA IRINA [US]; WOLFE SIDNEY [US]; THOMSON JAMES) 14 June 2001 (2001-06-14)
- D6: WO 2005/039620 A (HEXAL BIOTECH FORSCHUNGS GMBH [DE]; SKUFCA PETER [DE]; SEIBERT FABIAN) 6 May 2005 (2005-05-06)
- D7: WO 03/039485 A (PROTEIN DESIGN LABS [US]; KAISHEVA ELIZABET A [US]; GUPTA SUPRIYA [US]) 15 May 2003 (2003-05-15)

2. The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1,2,5-9,12 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D1 discloses compositions comprising polysorbate, a citrate buffer and a conjugate (see claims 1 and 5,6; see par. [013]) and is relevant for the novelty of claims 1,2,5-9 and 12.

D2 shows a composition comprising a conjugate of lipopolysaccharide with a surfactant,

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066959

namely QS21 and a phosphate buffer system (par. [053]).

D3 discloses a vaccine made from a conjugate, combined with a surfactant (tween) with a phosphate buffer (see example and claims) . Consequently, claims 1,2 are not novel over D2 or D3.

3. Even if novelty could be established, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 3,4, 10,11,13 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

The problem addressed by the present application is to provide a compositions stable against aggregation.

The solution is the use of a composition of a surfactant and a buffer.

The document D1 appear to be of particular relevance as far as inventive step is concerned (Article 33(3) PCT). This document solves indeed the same problem, so that, as far as novel subject-matter is concerned, the present application does apparently not fulfill the requirements of Article 33(3) PCT over these prior art documents.

The choice of a particular surfactant, buffer or antigen is a normal design routine for the skilled person.

Dependent claims 3,4,10,11,13 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step as said features are disclosed in the cited prior art or also fall within the knowledge and ability of the skilled person.

Therefore, as no unexpected effect for the present composition (as far as novel) over the prior art compositions has been demonstrated, this composition does apparently not fulfill the requirements of Article 33(3) PCT.

The present drafting of the claims does not recite any features which appear to either provide novelty or which could form a basis for the recognition of an inventive step. The cited documents merely represent those considered most relevant to the claims as presently on file. Further documents may become relevant if amended claims are filed.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

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.

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN DE LA INVENCION

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

De este modo, en ciertas modalidades, la invención

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

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

es cloruro de sodio.

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

lisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

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

En una modalidad específica, la formulación del con-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

de adyuvantes adecuados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ben ejemplos de adyuvantes adecuados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A. SURFACTANTES

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

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

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

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

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

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

B. RECIPIENTES

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

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

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

De este modo, las formulaciones novedosas de la pre-

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

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

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

C. ADYUVANTES Y VEHÍCULOS/EXCIPIENTES FARMACÉUTICOS

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

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

sición inmunogénica incluye, sin limitación, MPLTM (3-O-lípido de monofosforil desacilado A; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente americana No. 4.912.094, la cual queda incorporada aquí por referencia. Igualmente adecuados para usarse como adyuvantes son los análogos de lípido A sintéticos o compuestos de aminoalquilo glucosamina fosfato (AGP) o sus derivados o análogos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente americana No. 6.113.918, la cual queda incorporada aquí por referencia. Uno de esos AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-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 StimulonTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descritos en la Patente americana No. 5.057.540, la cual queda incorporada aquí por referencia y partículas generadas de

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

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

toxinas 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* (β197) 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
aproximadamente 7,5, un surfactante, una sal de aluminio y
una proteína de *N. meningitidis* 2086.

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

E. EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1

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

**TWEENTM80 ESTABILIZAN Y PREVIENEN LA
AGREGACIÓN DEL INMUNÓGENO**

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

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

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

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

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

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

te; se añadió el 0,85% salina (150 mM NaCl) a un cubilete de vidrio Pyrex® de un litro, seguida de 50 mM tampón de succinato (concentración final 5 mM) y el 13vPnC. La concentración final de cada conjugado serotipo fue 4,4 µg/mL (salvo para el serotipo 6B, que fue de 8,8 µg/mL). La formulación de 13vPnC fue luego dividida en cinco frascos de vidrio por separado (50 mL por frasco), donde se añadió o bien el 0,0%, 0,001%, 0,005%, 0,01% ó 0,05% TweenTM80 (p/v) a uno de los cinco frascos y cada solución fue filtrada a través de un filtro Ducapor® de 0,22 µm (Millipore; Billerica, MA). En lo subsiguiente, se llenó 0,65 mL de cada solución en una jeringa de vidrio de 3 mL BD 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 periodo 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	3.8 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	5.8 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	0.8 µg/ml	23F	5.2 µg/ml	5.2 µg/ml	5.2 µg/ml

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

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

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

TABLA 2

EFFECTO ESTABILIZADOR DE TWEEN™80 CONTRA ESFUERZOS CORTANTES

Serotipo	Antigenicidad 0,0% tw80	Antigenicidad 0,0% tw80 + torbellino	Antigenicidad 0,01% tw80	Antigenicidad 0,01% tw80 + torbellino	Antigenicidad 0,05% tw80	Antigenicidad 0,05% tw80 + torbellino
1	4.7 µg/mL	3.6 µg/mL	4.8 µg/mL	4.3 µg/mL	4.7 µg/mL	4.6 µg/mL
3	4.6 µg/mL	3.4 µg/mL	4.7 µg/mL	4.2 µg/mL	4.7 µg/mL	4.4 µg/mL
4	5.5 µg/mL	4.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.4 µg/mL	5.9 µg/mL	5.6 µg/mL
5	3.2 µg/mL	2.5 µg/mL	3.5 µg/mL	3.2 µg/mL	3.3 µg/mL	3.3 µg/mL
6A	4.3 µg/mL	3.8 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	9.8 µg/mL	10.2 µg/mL	10.1 µg/mL
7F	4.8 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	6.7 µg/mL	5.1 µg/mL	5.8 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	3.8 µg/mL	5.2 µg/mL	4.9 µg/mL	5.2 µg/mL	5.1 µg/mL
23F	3.0 µg/mL	2.4 µg/mL	3.4 µg/mL	3.3 µg/mL	3.5 µg/mL	3.4 µg/mL

EJEMPLO 2

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLO 3

LA INFLUENCIA DE RECIPIENTES SILICONADOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE 13vPnC

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

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

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

silicona en la superficie del tapón, mientras el proceso Jar de siliconación resultó en 150 a 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de serotipos 4, 9, 14, 18C, 19F y 23F *S. pneumoniae* y 8,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para simular la concentración de sacárido total de las formulaciones de 13vPnC.

Métodos

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

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

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

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

RESULTADOS

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

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

TABLA 3

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

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

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

Se seleccionó el serotipo 6B *S. pneumoniae* monovalente como un modelo para el 13vPnC y se formuló a 61,6 µg/ml (sin AIPO₄) para simular la concentración d sacárido total en la formulación 13vPnC. Se añadió, silicona (Fluido Médico Dow Corning 360) a alícuotas del monovalente 6B formulado, oscilando de 2 ppm a 100 ppm. Las mezclas fueron colocadas en un Agitador de Órbita Labline® durante 2 horas a 50 rpm. Conforme se indica a continuación en la Tabla 4, se observaron particulados blancos como fibras a todas las concentraciones de silicona (Si).

TABLA 4

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

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

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

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

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

Para elucidar el efecto de la proteína-polisacárido libre sobre la formación de los particulados, se hicieron alícuotas con 25 ml tanto de 7vPnC como 13vPnC y transfirieron a un tubo centrífugo de 50 ml. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm y el supernatante fue extraído cuidadosamente y transferido a una botella Nalgene®. Se añadieron diez tapones siliconados (Tapones 4432) a cada botella y se colocaron en agitador orbital a 50 rpm. Pervia 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 AIPO ₄	Con AIPO ₄
25 µg/mL de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
50 µg/mL d 6B	Particulados blancos como fibra	Sin particulados
75 µg/mL de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
100 µg/mL de 6B	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
200 µg/mL de 6B	Particulados blancos como fibra	Particulados blancos como fibra
25 µg/mL del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
50 µg/mL del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
75 µg/mL del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Sin Particulados
100 µg/mL del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Particulados blan- cos como fibra
200 µg/mL del Tipo 4	Particulados blancos como fibra	Particulados blan- cos como fibra

EJEMPLO 4

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

Conforme se indica anteriormente en el Ejemplo 3, una

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

Materiales

Se formuló el 13vPnC en 5 mM tampón de succinato con contenido 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 serotipos 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 lipidado 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 lipidado recombinante a partir de la pastilla de membrana con 50 mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% sarcosilo pH 8. Este extracto de sarcosilo fue ajustado

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

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

TABLA 8
AGLUTINACIÓN DE LA rLP2086 CON EL ADYUVANTE

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

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

REFERENCIAS

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

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

2005.

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

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

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

REIVINDICACIONES

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 aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 7,5, (ii) un surfactante y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína.

2. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual la formulación del conjugado de polisacárido-proteína va comprendida en un recipiente seleccionado 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.

3. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual se silicona el recipiente.

4. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5,8 a 6,0.

5. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual el surfactante es polisorbato 80.

6. La formulación de la Reivindicación 5, en la cual la concentración final del polisorbato 80 en la formula-

ción es por lo menos del 0,001% al 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

7. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más de los polisacáridos de neumococo.

8. La formulación de la Reivindicación 1, la cual comprende además uno o más polisacáridos de meningococo, una o más proteínas antigénicas de meningococo o una combinación de los mismos.

9. La formulación de la Reivindicación 1, la cual comprende además uno o más polisacáridos de estreptococo, una o más proteínas antigénicas de estreptococo o una combinación de los mismos.

10. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual 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 un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 14 conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇ y un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇.

11. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual la formulación del conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococo (13vPnC) que comprende polisacárido serotipo 4 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 6B *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 9V *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 14 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 18C *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 19F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 23F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 1 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 3 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 5 *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 6A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇, un polisacárido serotipo 7F *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇ y un polisacárido serotipo 19A *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM₁₇.

12. La formulación de la Reivindicación 1, en la cual la formulación comprende además un adyuvante.

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

14. Una formulación que estabiliza una composición de

peptidasa C5a de estreptococo (SCP), la formulación comprendiendo (i) una solución salina tamponada, donde el tampón tiene un pKa aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 6,5, (ii) un surfactante y (iii) una peptidasa C5a de estreptococo.

15. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual la formulación SCP va comprendida en un recipiente seleccionado 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.

16. La formulación de la Reivindicación 15, en la cual el recipiente es siliconado.

17. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5,8 a 6,0.

18. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual el surfactante es polisorbato 80.

19. La formulación de la Reivindicación 18, en la cual la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 0,01% al 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

20. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual la composición SCP comprende además uno o más poli-

péptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido de estreptococo, un polipéptido de neumococo, un polipéptido de meningococo y un polipéptido de estafilococo.

21. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual la composición 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.

22. La formulación de la Reivindicación 14, en la cual la formulación comprende además un adyuvante.

23. La formulación de la Reivindicación 23, en la cual el adyuvante es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.

24. Una formulación que inhibe la agregación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína comprendido en un medio 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.

25. La formulación de la Reivindicación 24, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0.

26. La formulación de la Reivindicación 24, la cual comprende además polisorbato 89 (TweenTM80), donde la con-

centración final del polisorbato 80 en la formulación es por lo menos del 0,01% al 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

27. La formulación de la Reivindicación 24, en la cual el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococo.

28. La formulación de la Reivindicación 24, la cual comprende además uno o más polisacáridos de meningococo, una o más proteínas antigénicas de meningococo o una combinación de los mismos.

29. La formulación de la Reivindicación 24, la cual comprende además uno o más polisacáridos, una o más proteínas antigénicas de estreptococo o una combinación de los mismos.

30. La formulación de la Reivindicación 24, en la cual la formulación comprende además un adyuvante.

31. Una formulación que inhibe la agregación 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 a de 3,5 aproximadamente a 6,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) una peptidasa C5a de estreptococo.

32. La formulación de la Reivindicación 31, en la cual el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH 5,8 a 6,0.

33. La formulación de la Reivindicación 31, la cual comprende además polisorbato 80 (TweenTM80), donde la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es por lo menos del 0,01% al 10% de polisorbato 80 peso/volumen de la formulación.

34. La formulación de la Reivindicación 31, en la cual 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.

35. La formulación de la Reivindicación 31, en la cual 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.

36. La formulación de la Reivindicación 31, en la cual la formulación comprende además un adyuvante.

37. una formulación que estabiliza la 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 7,5, (ii) un surfactante y (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086.

38. La formulación de la Reivindicación 37, en la

cual el surfactante es polisorbato 80.

39. La formulación de la Reivindicación 37, en la cual la formulación comprende además un adyuvante de sal de aluminio.

40. Una formulación que inhibe la agregación inducida por silicona de una composición de proteína de *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 aproximadamente a 7,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) una proteína de *N. meningitidis* 2086.

1/9

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

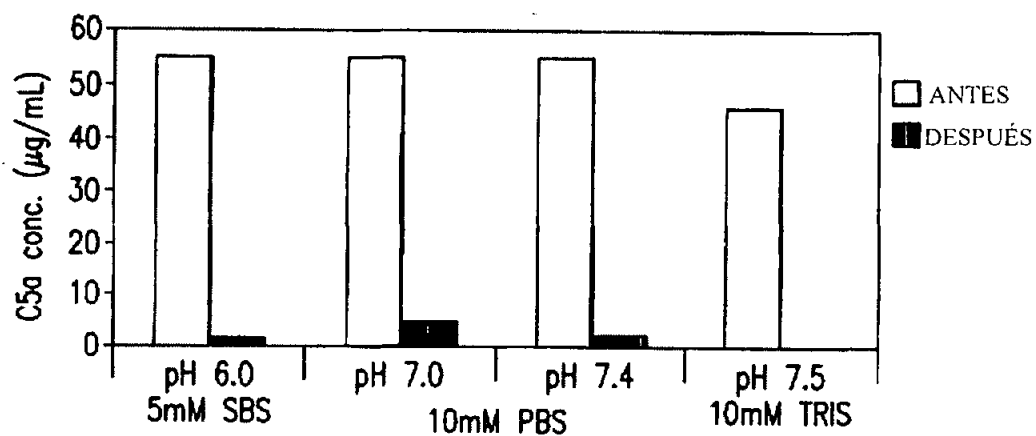


FIG.1A

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

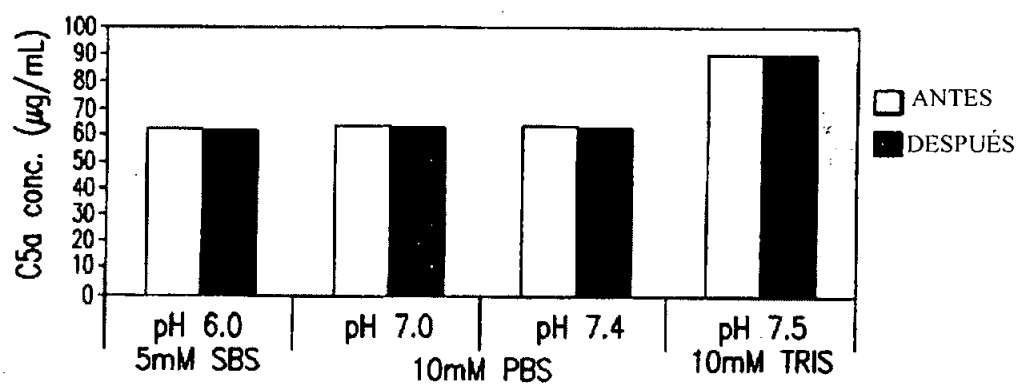


FIG.1B

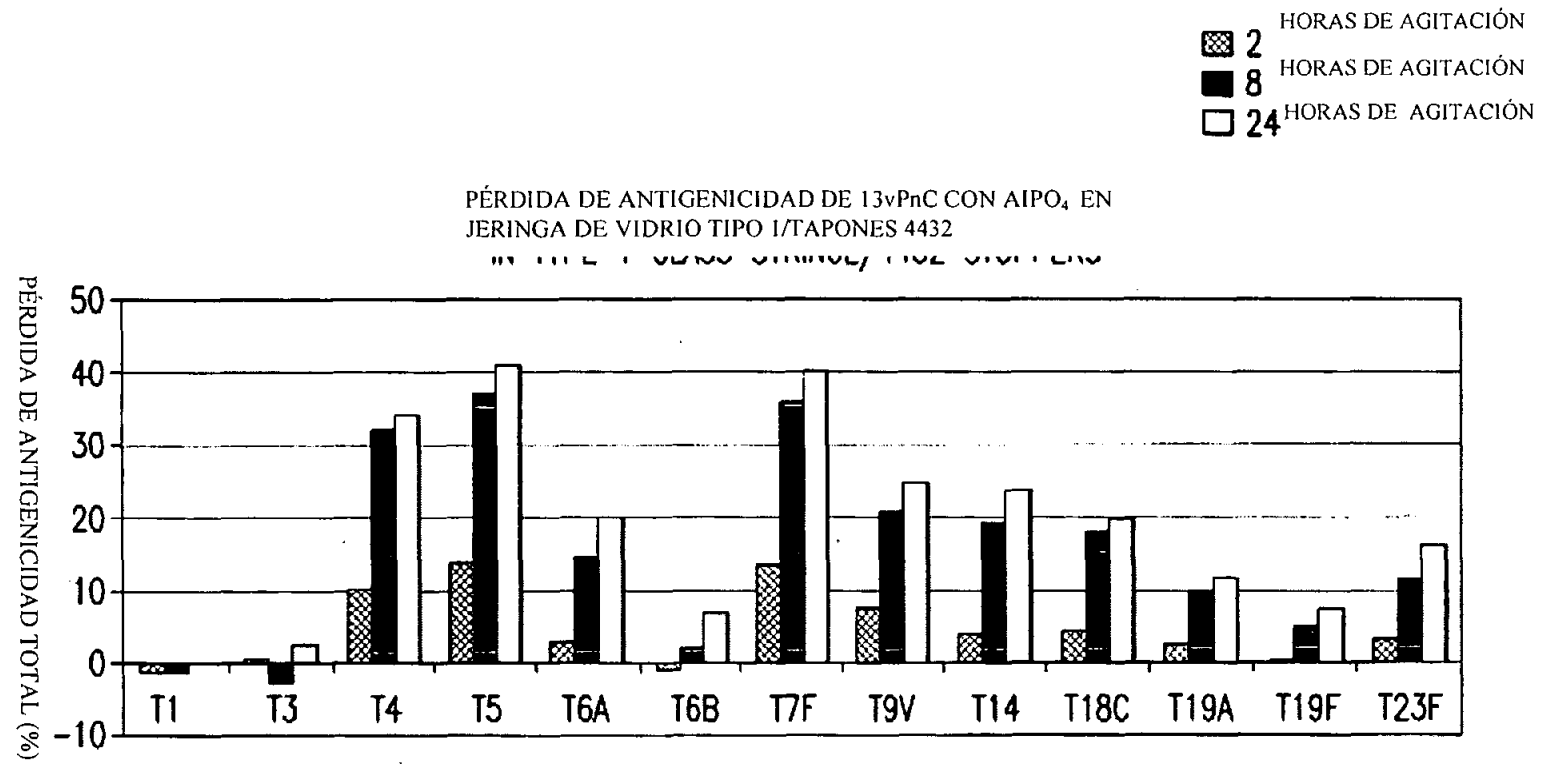


FIG.2

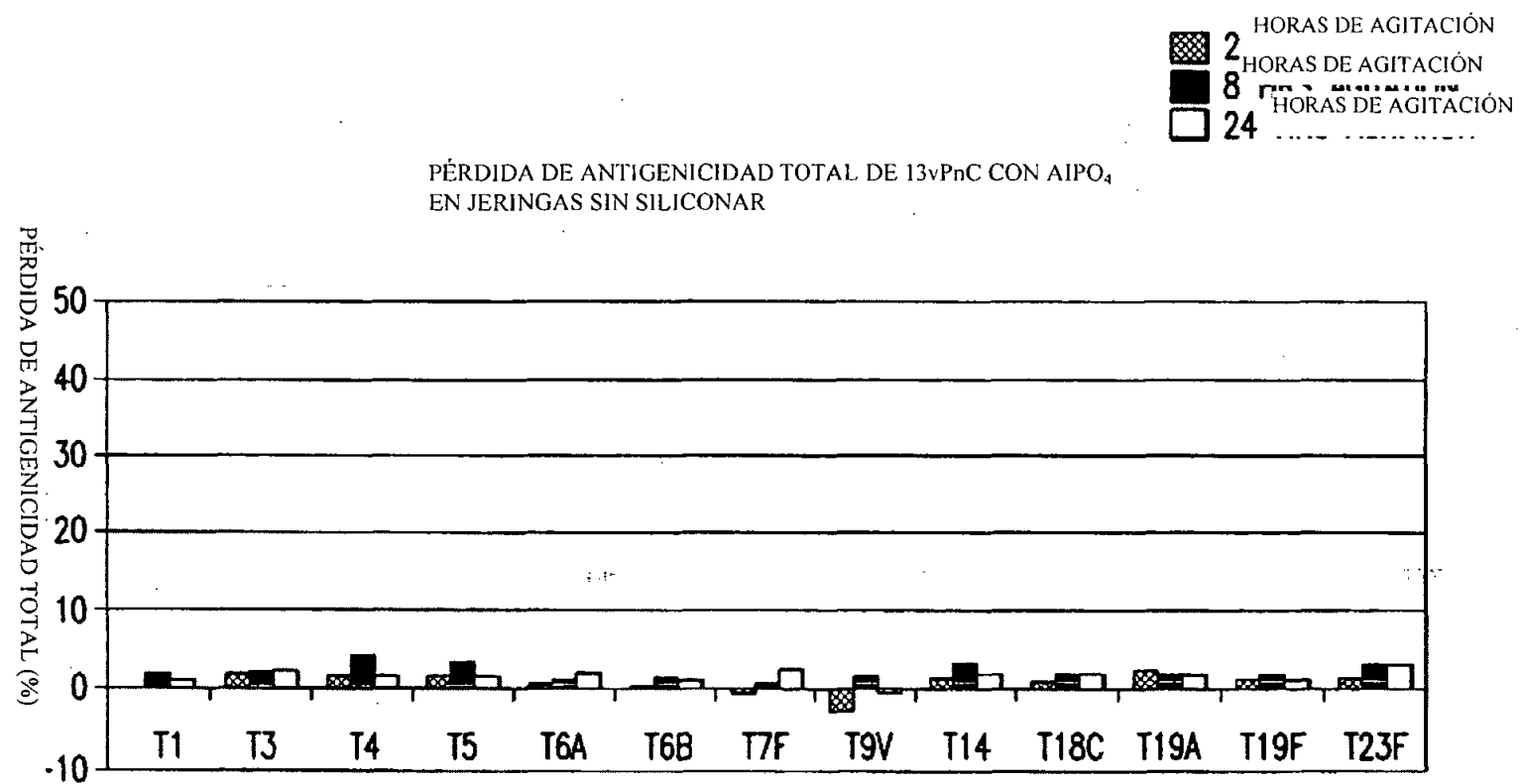


FIG.3

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

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

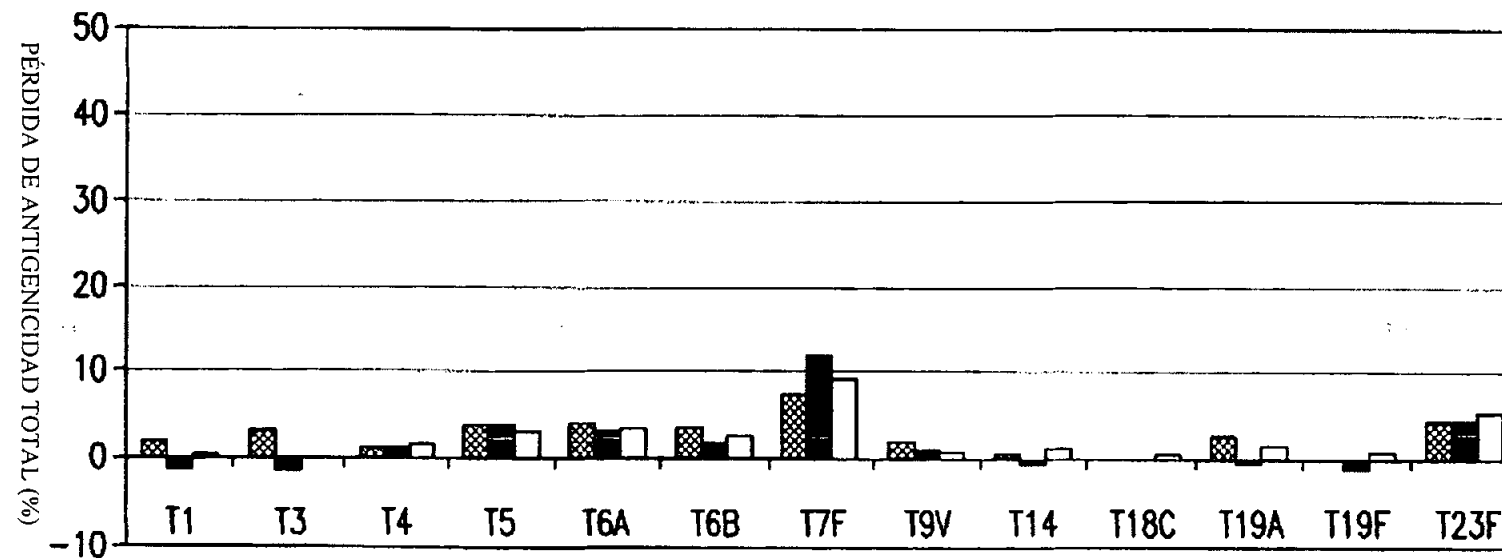
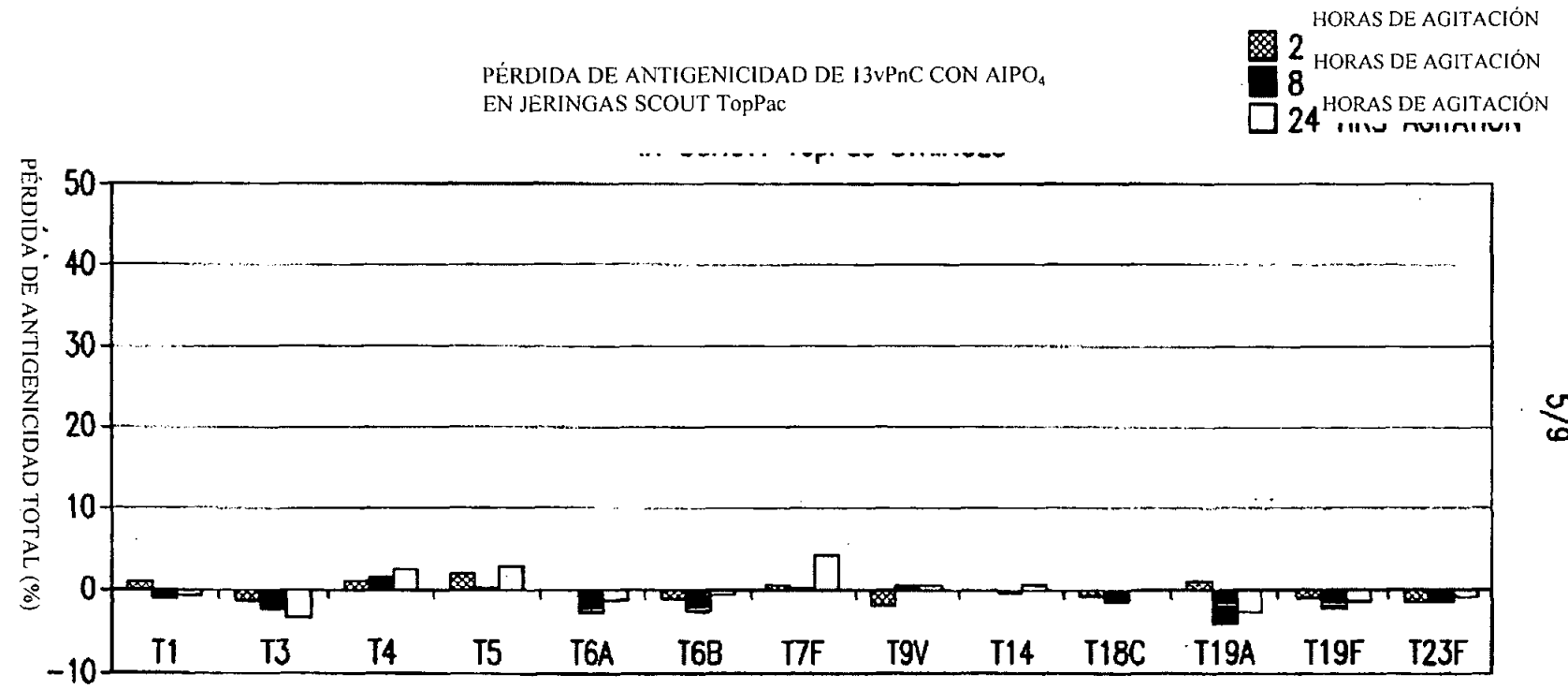


FIG.4

95



5/9

FIG.5

00172

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPnC CON AlPO_4
EN JERINGAS BD ESTUFADAS DE 0,04 mg Si

■ 2 HORAS DE AGITACIÓN
■ 8 HORAS DE AGITACIÓN
□ 24 HORAS DE AGITACIÓN

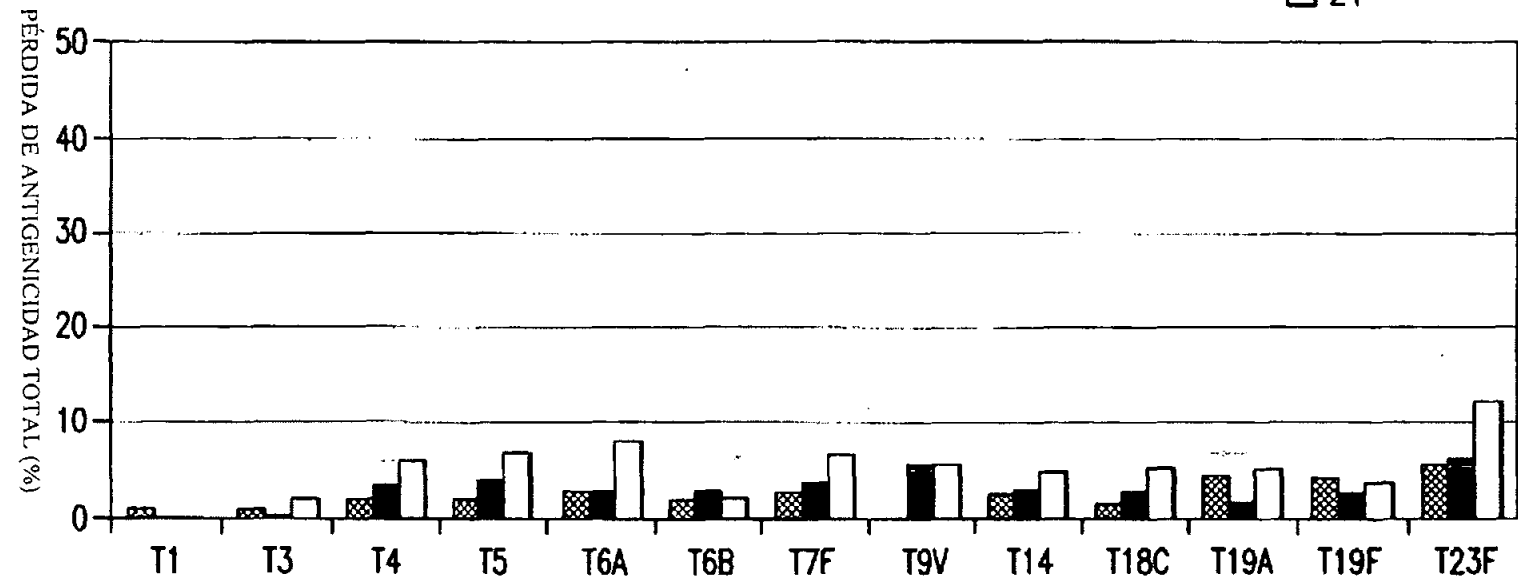


FIG.6A

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD DE 13vPnC SIN AlPO_4 EN
JERINGAS BD ESTUFADAS DE 0,04 mg Si

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

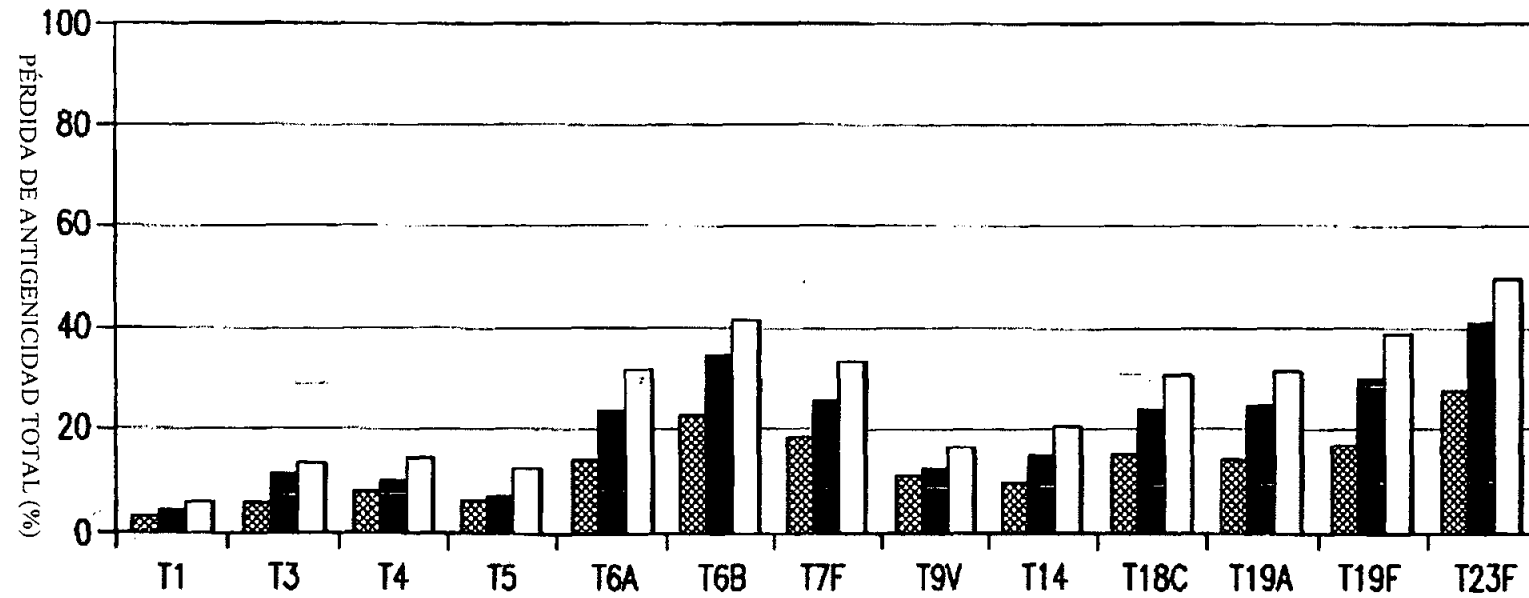


FIG.6B

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

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

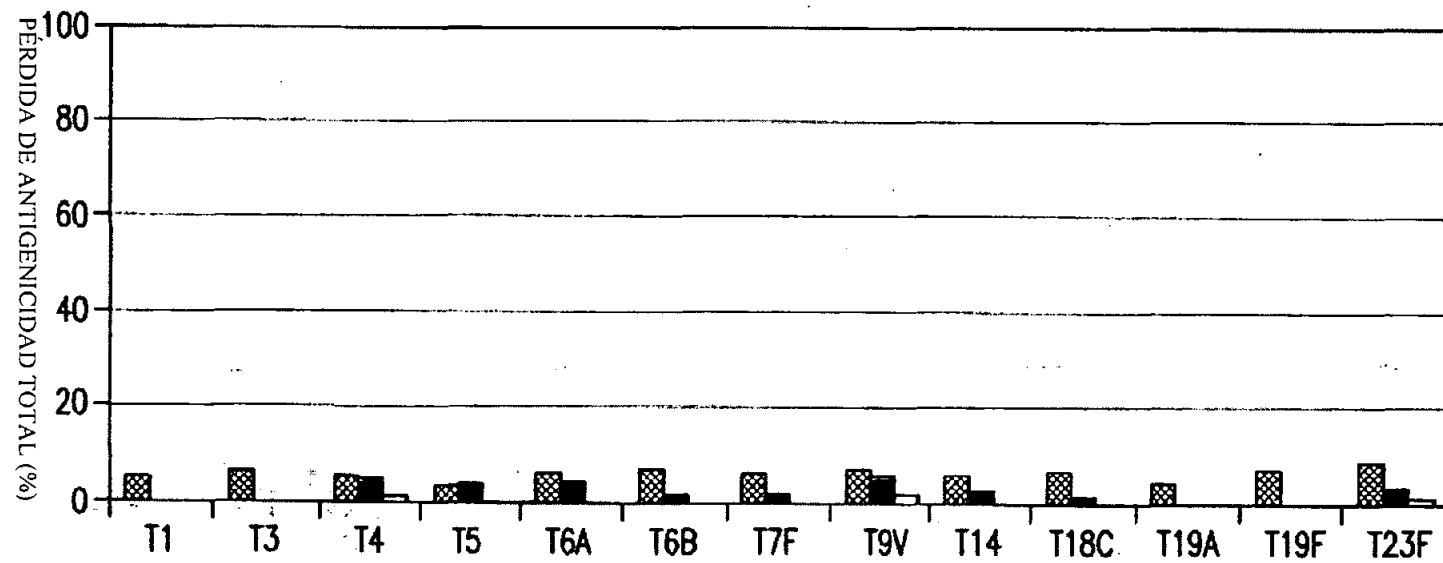


FIG.7A

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

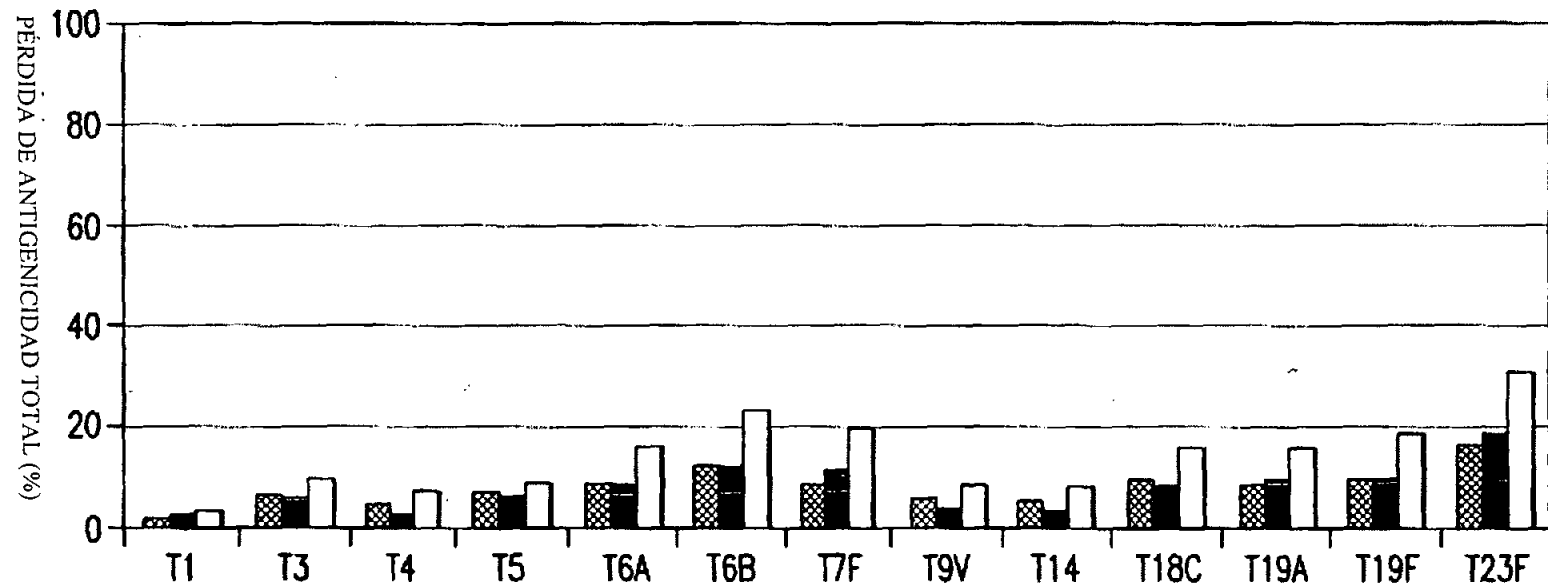


FIG.7B



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 47/12 , A61K 47/48
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) WYETH
(30) Prioridad	(31) No. 60/795,261	32) Fecha 26.04.2006	(33) País US	(72) Inventor(es) KHANDKE, Lakshmi; CHEN, Ying; HAN, Y OTROS
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 26/11/2008			(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha: 08.11.2007
	Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2007			N° publicación: WO/2007/127665
	No. de solicitud : PCT/US2007/066959			
(54) Título: FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACION DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS				

Reivindicación(es):

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 aproximadamente de 3,5 aproximadamente a 7,5, (ii) un surfactante y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína.


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **DISEÑO INDUSTRIAL** ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: A61K 47/12, A61K 47/48

(71) Solicitante(s) WYETH

(72) Inventor(es): KHANDKE, Lakshmi; CHEN, Ying; HAN, Y OTROS

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

(32) Fecha

(33) País

60/795,261

26.04.2006

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 26/11/2008

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 08.11.2007

Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2007

N° publicación: WO/2007/127665

No. de solicitud: PCT/US2007/066959

(54) Título: FORMULACIONES NOVEDOSAS QUE ESTABILIZAN E INHIBEN LA PRECIPITACION DE COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐			
(21) N° de solicitud: _____ (22) Fecha de solicitud: _____ (51) Clasificación Internacional : A61K 47/12 , A61K 47/48 (71) Solicitante(s) WYETH			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125423- -00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:21:58 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTEIYI Lve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 179



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	☒	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	☒	()
-Descripción de la invención.	☒	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	☒	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	☒	()
COMPLETA ☒ INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:

Claudia M. Nova Cortes

Fecha:

25 NOV - 2008

181

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

REFERENCIA	Radicación No.	8 125423
	Solicitud internacional	PCT/US2007/066959
	Fecha inicio fase nacional	26/11/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	15764

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha **12 DIC. 2008**
jfernand