



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

**(21) BR 112013027057-8 A2**



**(22) Data do Depósito: 23/04/2012**

**(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020**

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A ESTABILIZAÇÃO DE AGENTES ATIVOS

**(51) Int. Cl.:** A61K 47/42; A61K 39/12; A61J 1/00; B82Y 5/00; A61K 35/76; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 21/04/2011 US 61/477,737.

**(71) Depositante(es):** TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE.

**(72) Inventor(es):** DAVID L. KAPLAN; FIORENZO OMENETTO.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2012034643 de 23/04/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/145739 de 26/10/2012

**(85) Data da Fase Nacional:** 21/10/2013

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A ESTABILIZAÇÃO DE AGENTES ATIVOS. O presente documento provê métodos e composições para estabilização de agentes ativos. Os agentes ativos são distribuídos, misturados ou encapsulados em uma matriz de fibroína de seda, desse modo retendo a bioatividade dos agentes ativos quando do armazenamento e/ou transporte. Em algumas modalidades, as composições de vacina em seda estáveis em armazenamento são também providas no presente documento.

Relatório descritivo da patente de invenção para:  
"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A ESTABILIZAÇÃO DE AGENTES  
ATIVOS"

#### REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS CORRELATOS

5       Esse pedido reivindica o benefício de acordo com 35 USC  
§119(e) do Pedido Provisório US número 61/477.737,  
depositado em 21 de abril de 2011, que é incorporado ao  
presente documento como referência em sua totalidade.

#### APOIO DO GOVERNO

10       Essa invenção foi realizada com o apoio do Governo sob  
subsídios EB002520 concedidos pelo National Institutes of  
Health e FA9550-07-1-0079 concedido pela US Air Force. O  
Governo detém determinados direitos sobre a invenção.

#### CAMPO TÉCNICO

15       A presente invenção se refere, genericamente, aos  
métodos e composições para a estabilização de agentes ativos.

#### ANTECEDENTES

A estabilização de agentes ativos é um fator crítico  
para muitas aplicações, porque os agentes ativos são  
20       geralmente instáveis e sensíveis a alterações nas condições  
ambientais, por exemplo, temperatura, umidade e/ou luz.  
Mesmo se um agente ativo for identificado como sendo útil  
para uma dada reação, a sua aplicação é frequentemente  
prejudicada pela falta de estabilidade a longo prazo sob

condições de processo.

Vários modos para estabilizar os agentes ativos, por exemplo, enzimas e proteínas terapêuticas, têm sido estudados, a partir da liofilização para a imobilização covalente em diferentes aplicações. Em geral, muitos agentes  
5 ativos imobilizados demonstram uma estabilidade melhorada, provavelmente devido a redução da mobilidade para prevenir alterações na hidratação hidrófoba e assim a agregação e perda de atividade. As técnicas para a imobilização de  
10 agentes ativos, por exemplo, enzimas, geralmente agrupadas em quatro categorias: (1) adsorção não covalente de enzimas para o transporte para as superfícies do material, (2) ligação covalente às superfícies de materiais, (3) aprisionamento físico dentro de uma matriz de material, e  
15 (4) reticulação de uma enzima para "bloquear" a estrutura. Todas essas abordagens são um compromisso entre manter a atividade catalítica elevada enquanto obtendo as vantagens acima enumeradas. A ausência de materiais que proporcionam sítios de ligação de superfície específicos ou  
20 microambientes hidrófilos/hidrófobos relativos para retenção de carga elevada e a atividade de agentes ativos limita a aplicação das abordagens de imobilização à base transportador acima. Além disso, para muitas aplicações, materiais de transporte precisam ser biodegradáveis e

biocompatíveis para aplicações biomédicas, o que exclui o uso da maioria dos materiais de polímeros sintéticos.

Recentemente, as novas abordagens de imobilização têm sido desenvolvidas para melhorar a estabilidade e atividade do agente ativo, por exemplo, enzimas. Por exemplo, o microambiente do material de suporte pode ser manipulado pelo uso de agentes de bloqueio para reduzir os sítios de ligação não específicos. Alternativamente, as macromoléculas hidrófilas podem ser introduzidas próximas ao agente ativo, ou espaçadores hidrofílicos usados entre o agente ativo e a superfície do material. Além disso, os materiais sol-gel têm sido utilizados para a imobilização e verificou-se que aumentam a atividade das enzimas, por exemplo, lipases, até 100 vezes, devido aos efeitos de confinamento microambiental.

Além disso, os métodos de reticulação enzimáticos foram combinados com cristalização de proteínas para gerar cristais de enzima reticulados (CLECs) com o aumento da estabilidade da enzima e a seletividade quando comparados à enzima nativa. Embora este método tenha sido usado por indústrias farmacêuticas para formular medicamentos de proteínas terapêuticas, a cristalização de proteínas é complicado e muitas vezes imprevisível. Os agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) podem ser obtidos por



precipitação de proteínas, seguido por reticulação com glutaraldeído. Os CLEA da penicilina acilase apresentaram a mesma atividade que um CLEC na síntese da ampicilina. As nanopartículas magnéticas foram também utilizadas para a  
5 imobilização covalente das enzimas e assim melhoria da estabilidade da enzima. No entanto, nenhum destes métodos de imobilização é biocompatível/biodegradável ou simples de utilizar, proporcionando estabilidade em condições ambientais de armazenamento (por exemplo, temperatura  
10 ambiente) durante longos períodos de tempo.

Em específica, a estabilização da vacina tem sido um desafio de longa duração e grandes quantidades de vacinas foram desperdiçadas devido ao armazenamento inadequado. Embora a imunização global, atualmente salve a vida de 2-3  
15 milhões de crianças por ano, das 10,5 milhões de mortes de crianças que ocorrem anualmente, 2,5 milhões se devem as doenças que podem ser prevenidas por vacinas. Sarampo, caxumba e rubéola são três doenças comuns da infância, causadas por vírus do sarampo, vírus da caxumba  
20 (paramyxoviruses) e vírus da rubéola (togavirus), respectivamente, que podem estar associadas a complicações graves e/ou morte. Por exemplo, a pneumonia e a encefalite são causadas por sarampo. A caxumba está associada à meningite asséptica, surdez e orquite; e rubéola durante a

gravidez pode causar a síndrome da rubéola congênita em recém-nascidos de mães infectadas. O impacto da vacinação contra sarampo, caxumba e rubéola na história natural de cada doença nos US pode ser quantificado através da  
5 comparação do número máximo de casos de sarampo, caxumba e rubéola notificados em determinado ano antes do uso da vacina em relação ao número de casos de cada uma das doenças relatados em 1995. Para o sarampo, 894.134 casos relatados em 1941, em comparação com 288 casos relatados em 1995  
10 resultaram em uma diminuição de 99,97% nos casos relatados; para a caxumba, 152.209 casos relatados em 1968, em comparação com 840 casos relatados em 1995 resultaram em uma diminuição de 99,45% nos casos relatados; e para a rubéola, 57.686 casos notificados em 1969 em comparação com 200 casos  
15 notificados em 1995 resultaram em uma redução de 99,65%. *Monthly Immunization Table*, 45 MMWR 24 (1996).

As vacinas são substâncias biológicas que podem perder a sua eficácia rapidamente se forem muito aquecidas ou resfriadas, especialmente durante o transporte e  
20 armazenamento. O congelamento inadvertido, aquecimento acima de 8°C ou outras rupturas na cadeia de resfriamento podem resultar em falha de eficácia ou desperdício da vacina. De acordo com a OMS, entre 2006-2015, os US terão contribuído com 35.000 milhões de dólares para programas globais de

vacinação. Cerca de um terço será gasto em vacinas e o restante será gasto em sistemas de distribuição de vacinas. Fica claro que mesmo 1% do desperdício de vacinas em virtude de falha da cadeia de resfriamento é uma soma considerável.

5 De fato, para cinco estados dos Estados Unidos, o desperdício médio de 1% a 5% custa cerca de 6 a 31 milhões de dólares americanos. Em outras partes do mundo, o desperdício de vacina pode atingir 10%. As duas formas mais comuns de desperdício se referem à estabilidade térmica e vida útil,  
10 com o congelamento inadvertido permanecendo como outro problema importante. Desse modo, existe uma grande necessidade de agentes ativos estáveis em armazenamento, por exemplo, vacinas estáveis em armazenamento, com vida útil mais longa que possam manter a eficácia em várias condições  
15 ambientais adversas, por exemplo, sem a necessidade de adequação da cadeia de resfriamento.

## SUMÁRIO

Diversas modalidades descritas no presente documento proporcionam uma composição estável em armazenamento que  
20 compreende uma matriz de fibroína de seda e um agente ativo nela distribuído, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é submetida, pelo menos, a um ciclo de mudança de estado e/ou é mantida por um período de tempo em uma condição de

estado ciclo de mudança, e/ou é mantida durante um período de tempo, sob uma condição especificada. Em uma modalidade, o ciclo de mudança de estado é um ciclo de congelamento-descongelamento. Em uma modalidade, o período de tempo para  
5 manter o agente ativo é de pelo menos, por cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, a condição indicada pode ser uma condição ambiental de acordo com a qual um agente ativo é armazenado e/ou transportado. Exemplos não limitantes das condições ambientais incluem temperaturas, pressões do ar,  
10 umidade e exposição à luz. Em algumas modalidades, o agente ativo é um imunógeno. Em algumas modalidades, o agente ativo é uma vacina.

Kits e dispositivos de distribuição, por exemplo, úteis na área biomédica, são também proporcionados no presente  
15 documento. Exemplos de dispositivos de distribuição incluem, mas não estão limitados a seringas, injetores de pó seco, sprays nasais, nebulizadores, e implantes. Tais kits e dispositivos compreendem uma composição estável ao armazenamento descrita no presente documento e,  
20 opcionalmente, uma solução farmacologicamente aceitável. Em uma modalidade, o kit inclui ainda pelo menos um dispositivo de distribuição para a administração a um indivíduo de uma composição estável ao armazenamento descrita no presente documento e/ou um desinfetante.

### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a relação linear entre a diluição do  $\log_{10}$  da amostra de vacina e valores Ct para sarampo, caxumba e rubéola. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

5 A figura 2 mostra os resultados da vacina MMR reconstituída em 24, 18, 12 e 6 horas em água, antes da inoculação, protegida da luz, das células armazenadas a 25°C. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

10 A figura 3 mostra a estabilidade do vírus do sarampo, caxumba e rubéola armazenados em 9% (peso/volume) de películas de seda por mais de 3 meses. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

A figura 4 é um gráfico de barras que compara a potência inicial recuperada dos vírus de sarampo, caxumba e rubéola em películas de seda com a adição de aditivos estabilizantes de  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  e sacarose. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

20 A figura 5 mostra a vacina de MMR reconstituída em 24, 18, 12 e 6 horas em 70% de sacarose antes da inoculação, protegida da luz, das células armazenadas a 25°C. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 6A-6D apresentam comparações da potência residual da vacina de MMR reconstituída em água a 4°C (figura 6A) ou 37°C (figura 6C), ou 70% de sacarose a 4°C (figura

6B) ou 37°C (figura 6D). As vacinas foram reconstituídas em 24, 18, 12 e 6 horas em água ou 70% de sacarose antes da inoculação, protegida da luz, das células armazenadas a 25°C. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

5 A figura 7 mostra um esquema da fabricação de películas de seda que encapsulam a vacina e ensaio de efetividade. (1) Pó para vacina liofilizado é reconstituído em uma solução aquosa de seda esterilizada. (2a) As películas de seda que encapsulam a vacina foram preparadas por fusão de uma  
10 alíquota da mistura de vacina-seda sobre uma superfície revestida de Teflon e deixadas secar em uma câmara estéril, durante 12 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. (2b) As películas secas individuais foram armazenadas em tubos de Eppendorf nas temperaturas adequadas para estudos  
15 de estabilidade. (3a) Após ser liofilizado o pó de vacina foi reconstituído em solução aquosa de seda esterilizada, as películas de seda que encapsulam a vacina liofilizada foram preparadas por moldagem de uma alíquota da mistura de vacina-seda em uma placa de 96 poços e liofilizada. (3b) As  
20 películas liofilizadas individuais foram removidas da placa do poço e transferidas para frascos de soro de vidro, vedadas com uma rolha de liofilização e vedação de alumínio sob nitrogênio e condições a vácuo. (4) Para os estudos de infecciosidade, as películas foram redissolvidas em água

esterilizada isenta de nuclease e a solução foi adicionada diretamente as células Vero cultivadas em meios M199 cultivados em uma placa de 24 poços. As células foram incubadas durante 3 dias, para permitir que o vírus se replicasse, em seguida, o RNA foi isolado, convertido em DNAc e quantificado por PCR em tempo real. (5) O RNA foi isolado a partir de células Vero usando Trizol/clorofórmio, o RNA foi purificado e transcrição reversa foi realizada para sintetizar DNAc para RT-PCR em tempo real.

As figuras 8A-8C mostram gráficos da potência residual dos componentes do vírus do sarampo, caxumba e rubéola da vacina liofilizada reconstituída em água por períodos de tempo diferentes, armazenada a 4°C (figura 8A), 25°C (figura 8B) e 37°C (figura 8C) (♦) sarampo, (○) caxumba, (■) rubéola, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 9A-9D mostram gráficos da estabilidade do componente de vírus do sarampo da vacina de MMR armazenada nas películas de seda a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses a 4°C (figura 9A), 25°C (figura 9B), 37°C (figura 9C), e 45°C (figura 9D). (♦) MMR em películas de seda, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 10A-10D mostram gráficos da estabilidade do componente de vírus da caxumba da vacina de MMR armazenada em películas de seda a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses

a 4°C (figura 10A), 25°C (figura 10B), 37°C (figura 10C), e 45°C (figura 10D). (♦) MMR em películas de seda, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 11A-11D mostram gráficos da estabilidade do componente de vírus da rubéola da vacina de MMR armazenada em películas de seda a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses a 4°C (figura 11A), 25°C (figura 11B), 37°C (figura 11C), e 45°C (figura 11D). (♦) MMR em películas de seda, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 12A-12D mostram gráficos da estabilidade do componente de vírus do sarampo da vacina de MMR armazenada em películas de seda liofilizadas a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses a 4°C (figura 12A), 25°C (figura 12B), 37°C (figura 12C), e 45°C (figura 12D). (♦) MMR em películas de seda liofilizadas, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 13A-13D mostram gráficos da estabilidade do componente de vírus do sarampo da vacina de MMR armazenada em películas de seda liofilizadas a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses a 4°C (figura 13A), 25°C (figura 13B), 37°C (figura 13C), e 45°C (figura 13D). (♦) MMR em películas de seda liofilizadas, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 14A-14D mostram gráficos da estabilidade do



componente do vírus da rubéola da vacina MMR armazenada em películas de seda liofilizadas a 9% (peso/volume) por mais de 6 meses a 4°C (figura 14A), 25°C (figura 14B), 37°C (figura 14C), e 45°C (figura 14D). (♦) MMR em películas de  
5 seda liofilizadas, (□) MMR em pó, barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

As figuras 15A-15C mostram gráficos de Arrhenius das taxas de degradação dos componentes de vacina para sarampo (figura 15a), caxumba (figura 15B) e rubéola (figura 15C),  
10 como uma função do inverso da temperatura absoluta. (♦) Películas de seda liofilizadas, películas de seda (o), (■) pó.

As figuras 16A-16C mostram gráficos das meias vidas previstas dos componentes virais do sarampo (figura 16<sup>a</sup>),  
15 caxumba (figura 16B) e rubéola (figura 16C) como uma função da temperatura e os limites superiores e inferiores correspondentes da meia-vida. As meias-vidas previstas representam o tempo estimado necessário para o componente viral degradar para 50% do valor inicial. (♦) Películas de  
20 seda liofilizadas, películas de seda (o), (■) pó.

A figura 17 mostra um gráfico da calorimetria exploratória diferencial, DSC, em estado sólido. DSC em estado sólido de uma película de seda liofilizada mostra transição vítrea (T<sub>g</sub>) a 178°C. A T<sub>g</sub> do fabricante forneceu

vacina MMR em pó (contendo uma ampla variedade de excipientes e estabilizantes) como sendo de 68,9°C. As MMR em películas de seda liofilizadas mostraram uma Tg de 89,2°C, indicando que a adição da seda à MMR em pó aumentou a estabilidade da  
5 vacina refletida no aumento da Tg. A curva da MMR em película de seda liofilizada, no entanto, mostrou dois picos a 116,6°C e 164,8°C o que poderia indicar uma Tm e Td, descrevendo o desdobramento ou a degradação dos componentes da vacina.

A figura 18 mostra um gráfico da nano calorimetria  
10 exploratória diferencial, nano-DSC. A Tm de partículas virais purificadas aparece em torno 16,8°C. A presença da seda aumenta a Tm das partículas virais para 68,3°C. A queda acentuada seguindo-se a Tm é um evento exotérmico muito provavelmente devido à agregação, como resultado do  
15 desdobramento da proteína na Tm. A Tg de seda foi de cerca de 178°C, assim os valores da Tg elevados foram devidos ao efeito da seda sobre as proteínas virais encapsuladas.

A Figura 19 mostra um gráfico indicando a comparação da dispersão dinâmica de luz de partículas virais purificadas  
20 em água e partículas virais purificadas em solução de seda. O diâmetro médio efetivo das partículas virais da MMR foi de cerca de 250 nm. O diâmetro médio efetivo da solução de MMR purificada começou a aumentar em cerca de 16°C, indicando a agregação de partículas virais, devido ao aumento da potência

térmica. A solução de seda da MMR não mostrou sinais de agregação até 70°C, indicando que a seda forneceu a estabilidade estrutural para impedir a agregação das proteínas virais.

5        As figuras 20A-20B mostram gráficos de liberação da MMR (figura 20-A) das películas de seda e (figura 20B) películas de seda liofilizadas. Barras de erro N=3 representam os desvios padrão.

10        As figuras 21A-21B mostram gráficos (figura 21A) da liberação de hidrogéis de MMR em seda e microesferas de seda (figura 21B). Barras de erro, N=3 representam os desvios padrão.

15        As figuras 22A-22D mostram diagramas esquemáticos. Na figura 22A, caxumba e sarampo pertencem à família *Paramyxoviridae* e suas estruturas consistem em RNA de sentido negativo, de filamento simples encapsulado em nucleocapsídeos dentro de uma bicamada de lipídeos. O envelope viral é formado pela proteína de matriz (M), proteína de hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F). As  
20        proteínas H e F estruturalmente intactas são as proteínas responsáveis pela ligação e fusão das partículas virais às células animais. Na figura 22B, por uma combinação de interação hidrófoba e mobilidade de cadeia limitada, as partículas virais de seda aprisionadas mantêm a atividade

estrutural em temperaturas elevadas. Na figura 22C, as proteínas F e H se ligam aos receptores CD46 e CD150 (coletivamente conhecidos como SLAM) para entrarem nas células de modo a iniciar a replicação viral. Na figura 22D, a desnaturação das proteínas de superfície pode causar agregação das partíulas virais. A perturbação das proteínas pode fazer com que não sejam reconhecidas pela célula e a entrada é negada.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

Deve ser entendido que essa invenção não está limitada à metodologia específica, protocolos e reagentes, etc., descritos no presente documento e como tal, pode variar. A terminologia empregada no presente documento tem o propósito de descrever apenas modalidades específicas, e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, que é definido exclusivamente pelas reivindicações.

Tal como empregado no presente documento e nas reivindicações, as formas singulares incluem a referência ao plural e vice-versa, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Excepto nos exemplos operativos ou onde indicado em contrário, todos os números que expressam quantidades de ingredientes ou condições de reação empregadas no presente documento devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo "cerca de".

Todas as patentes e outras publicações identificadas são expressamente incorporadas ao presente documento como referência, com a finalidade de descrever e revelar, por exemplo, as metodologias descritas em tais publicações que  
5 possam ser utilizadas em conexão com a presente invenção.

Essas publicações são fornecidas unicamente para a sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada a este respeito deve ser interpretado como uma admissão de que os inventores não têm direito de antecipar a  
10 divulgação em virtude de invenção prévia ou por qualquer outro motivo. Todas as declarações quanto à data ou representação quanto ao conteúdo desses documentos se baseiam na informação disponível aos depositantes e não constituem qualquer admissão quanto à exatidão das datas ou  
15 conteúdo desses documentos.

A menos que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos empregado no presente documento têm o mesmo significado que os normalmente compreendidos por um versado na técnica comum a qual essa invenção pertence.  
20 Embora quaisquer métodos conhecidos, dispositivos e materiais possam ser utilizados na prática ou experimento da presente invenção, os métodos, dispositivos e materiais relacionados são descritos no presente documento.

Um aspecto proporcionado no presente documento se

refere aos métodos e composições de manutenção ou estabilização da bioatividade de um agente ativo. O método inclui a manutenção de uma composição, em que a composição compreende uma matriz de fibroína de seda, e pelo menos um  
5 agente ativo distribuído, misturado, ou integrado à mesma e em que o pelo menos um agente ativo estabiliza ou retém, pelo menos, por cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é submetida a uma condição especificada, que inibe ou reduz a bioatividade do agente ativo, por um  
10 período de tempo. Essas condições podem incluir, porém não estão limitadas a um ciclo de mudança de estado, temperaturas, pressões de ar, umidade e exposição à luz. Em uma modalidade, o ciclo de mudança de estado é um ciclo de congelamento-descongelamento.

15 As modalidades dos vários aspectos descritos no presente documento fornecem agentes ativos estabilizados, onde a estabilização de um agente ativo é obtida através da distribuição, mistura, ou a incorporação de um agente ativo a uma matriz de fibroína de seda. A matriz de fibroína de  
20 seda pode ser uma solução de fibroína de seda ou uma matriz de fibroína de seda em estado sólido. Esta abordagem prevê que agente ativo mantenha a bioatividade, independentemente da cadeia de resfriamento e/ou condições ambientais nas quais o agente ativo é armazenado e/ou transportado. Condições

ambientais exemplares incluem, mas não estão limitadas as temperaturas, pressões de ar, umidade e exposição à luz. Por exemplo, a cadeia de resfriamento é uma prática padrão para estabilizar os agentes ativos na indústria farmacêutica: a  
5 manutenção da cadeia de resfriamento assegura que os agentes ativos sejam transportados e armazenados de acordo com a faixa de temperatura recomendada pelo fabricante (por exemplo, 2°C a 8°C ou a temperaturas abaixo de zero), até à sua utilização.

10       Em certas modalidades, os agentes ativos descritos no presente documento são imunógenos. Em uma modalidade, o imunógeno é uma vacina. A maioria das vacinas é sensível às condições ambientais em que são armazenadas e/ou transportadas. Por exemplo, a congelamento pode aumentar  
15 reactogenicidade (por exemplo, a capacidade de provocar uma reação imunológica) e/ou de perda de potência para algumas vacinas (por exemplo, HepB, DTaP/IPV/HIB), ou provocar fissuras no recipiente, conduzindo à contaminação. Além disso, algumas vacinas (por exemplo, a BCG, Varicela, e MMR)  
20 são sensíveis ao calor. Muitas vacinas (por exemplo, BCG, tríplice viral, varicela, meningocócica C conjugada, e a maioria das vacinas contendo Tdap) são sensíveis à luz. Vide, por exemplo, Galazka e outros, *Thermostability of vaccines*, in Global Programme for Vaccines & Immunization (World Health

Organization, Geneva, 1998); Peetermans e outros, *Stability of freeze-dried rubella virus vaccine (Cendehill strain) at various temperatures*, I J. Biological Standardization 179 (1973). Assim, as composições e métodos descritos no presente

5 documento também fornecem estabilização de vacinas independentemente da cadeia de resfriamento e/ou de outras condições ambientais.

#### *Estabilização de Agentes Ativos*

Os termos "estabilização", "estabilizar", e  
10 "estabilidade" são empregados no presente documento com referência a manutenção ou retenção da bioatividade de pelo menos um agente ativo em uma matriz de fibroína de seda. A expressão "agentes ativos de estabilização", tal como empregada no presente documento, significa que um ou mais  
15 agentes ativos distribuídos, misturados ou incorporados a uma matriz de fibroína de seda retêm pelo menos cerca de 30% de sua bioatividade original, incluindo, pelo menos, por cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo  
20 menos cerca de 90% da sua bioatividade original ou mais. Os termos "estabiliza" e "mantém" com referência a bioatividade dos agentes ativos são empregados alternadamente no presente documento.

Tal como empregado no presente documento, os termos



"manter", "mantém" e "manutenção", quando se referem às composições ou agentes ativos significam manter, sustentar ou reter a bioatividade de pelo menos um agente ativo em uma matriz de fibroína de seda, quando o agente ativo é submetido a determinadas condições. Em algumas modalidades, um ou mais agentes ativos, distribuídos em uma matriz de fibroína de seda retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original, incluindo, pelo menos, por cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% da sua bioatividade original ou mais.

O termo "bioatividade", como empregado no presente documento com referência a um agente ativo, em geral, se refere à capacidade de um agente ativo de interagir com um alvo biológico e/ou produzir um efeito sobre um alvo biológico. Por exemplo, a bioatividade pode incluir, sem limitação, a elicitação de uma resposta estimuladora, inibidora, reguladora, tóxica ou letal em um alvo biológico. O alvo biológico pode ser uma molécula ou uma célula. Por exemplo, uma bioatividade pode se referir a capacidade de um agente ativo de modular o efeito/atividade de uma enzima, bloquear um receptor, estimular um receptor, modular o nível de expressão de um ou mais genes, modular a proliferação das células, modular a divisão celular, modular a morfologia

celular, ou qualquer combinação dessas. Em alguns casos, a bioatividade pode se referir à capacidade de um composto de produzir um efeito tóxico em uma célula.

A bioatividade pode ser determinada através da análise de uma resposta celular. Respostas celulares exemplares incluem, mas não estão limitadas a lise, apoptose, inibição de crescimento e promoção do crescimento; produção, secreção e exposição da superfície de uma proteína ou outra molécula de interesse pela célula; ativação da molécula de superfície da membrana incluindo ativação do receptor; transporte de íon da transmembrana; regulamentos transcricionais; alterações na viabilidade da célula, alterações na morfologia celular, mudanças na presença ou expressão de um componente interno da célula; mudanças na presença ou expressão de um ácido nucléico produzido dentro da célula; alterações na atividade de uma enzima produzida dentro da célula; e alterações na presença ou expressão de um receptor. Os métodos para ensaiar diferentes respostas celulares são bem conhecidos de um versado na técnica, por exemplo, western blot para determinar as mudanças na presença ou expressão de uma proteína endógena da célula, ou microscopia de controle da morfologia celular, em resposta ao agente ativo.

Com referência a um anticorpo, o termo "bioatividade" inclui, porém não está limitado a afinidade de ligação ao

epítopo ou antígeno, a estabilidade *in vivo* e/ou *in vitro* do anticorpo, as propriedades imunogênicas do anticorpo, por exemplo, quando administrado a um indivíduo humano, e/ou a capacidade de neutralizar ou antagonizar a bioatividade de uma molécula alvo *in vivo* ou *in vitro*. As propriedades ou características acima referidas podem ser observadas ou medidas usando técnicas reconhecidas na arte, incluindo, porém não limitado aos ensaios de proximidade de cintilação, ELISA, imunoensaios ORIGEN (IGEN), saturação da fluorescência, ELISA de fluorescência, ELISA competitiva, análise de SPR, incluindo, porém não limitado a análise SPR utilizando um biossensor BIAcore, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* (vide, por exemplo, a Publicação Internacional No. WO 2006/062685), ligação ao receptor, e imuno-histoquímica com seções de tecidos provenientes de diferentes fontes, incluindo ser humano, primata, ou qualquer outra fonte conforme necessário. Com referência a um imunógeno, a "bioatividade" inclui imunogenicidade, a definição da mesma sendo discutida em detalhe adiante. Com referência a um vírus, a "bioatividade" inclui infecciosidade, a definição da mesma sendo discutida em detalhes adiante. Com referência a um agente de contraste, por exemplo, um corante, a "bioatividade" se refere à capacidade de um agente de contraste, quando administrado a

um indivíduo de aumentar o contraste das estruturas ou fluidos dentro do corpo do indivíduo. A bioatividade de um agente de contraste também inclui, mas não está limitada a sua capacidade de interagir com um ambiente biológico e/ou influenciar a resposta de outra molécula em determinadas condições.

A expressão "bioatividade original", com referência a um agente ativo significa, de modo geral, a bioatividade de um agente ativo quando medida imediatamente antes ou imediatamente após o agente ativo ser introduzido em uma matriz de fibroína de seda. Isto é, a bioatividade original de um agente ativo pode ser medida, por exemplo, dentro de aproximadamente 20 minutos, antes ou depois do agente ativo ser introduzido em uma matriz de fibroína de seda. Em alguns casos, a bioatividade inicial de um agente ativo pode ser medida, por exemplo, por cerca de 10 segundos, cerca de 15 segundos, cerca de 20 segundos, cerca de 25 segundos, cerca de 30 segundos, cerca de 1 minuto, cerca de 2 minutos, cerca de 3 minutos, cerca de 4 minutos, cerca de 5 minutos, cerca de 6 minutos, cerca de 7 minutos, cerca de 8 minutos, cerca de 9 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 11 minutos, cerca de 12 minutos, cerca de 13 minutos, cerca de 14 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 16 minutos, cerca de 17 minutos, cerca de 18 minutos, cerca de 19 minutos, ou cerca

de 20 minutos, antes ou depois do agente ativo ser introduzido em uma matriz de fibroína de seda. Em uma modalidade, a matriz de fibroína de seda é uma matriz de fibroína de seda em estado sólido. Em tal modalidade, um agente ativo pode perder um pouco da sua bioatividade durante o manuseio antes de ser distribuído em uma matriz de fibroína de seda em estado sólido. Em outra modalidade, o termo "bioatividade original", como empregado no presente documento, pode ser usado para descrever a bioatividade de um agente ativo antes do agente ativo ser introduzido em uma matriz de fibroína de seda. Em algumas modalidades, o termo "bioatividade original" se refere à bioatividade máxima de um agente ativo, por exemplo, a bioatividade medida imediatamente após a ativação do agente ativo, por exemplo, por reconstituição, ou por aumento da temperatura. Por exemplo, se o agente ativo estiver inicialmente em pó, a bioatividade inicial do agente ativo pode ser medida imediatamente após a reconstituição. Em algumas modalidades, o termo "bioatividade original" se refere à bioatividade de um agente ativo quando armazenado ou transportado, na ausência de uma matriz de fibroína de seda nas condições especificadas pelo fabricante. Em algumas modalidades, o termo "bioatividade original" se refere à bioatividade de um agente ativo quando armazenado ou transportado em uma

composição estável em armazenamento, tal como descrito no presente documento, nas condições especificadas pelo fabricante. As definições do termo "bioatividade original" descritas no presente documento são também aplicadas aos  
5 termos "imunogenicidade original" e "infecciosidade original" tal como utilizado adiante no presente documento.

De acordo com os métodos descritos no presente documento, a distribuição, mistura ou incorporação de um agente ativo em uma matriz de fibroína de seda retém ou  
10 estabiliz a bioatividade do agente ativo, por exemplo, pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade inicial, independentemente das condições ambientais ou de armazenamento (por exemplo, os ciclos de mudança de estado, temperatura, umidade ou exposição à luz). A matriz de  
15 fibroína de seda pode ser uma solução ou se apresentar no estado sólido. Em várias modalidades, quando um agente ativo for distribuído em uma matriz de fibroína de seda, tal composição for submetida a um ciclo de mudança de estado e/ou for mantida durante um período de tempo, sob uma  
20 condição especificada, o agente ativo poderá reter pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original é, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% do

bioatividade original ou mais. Em uma modalidade, o agente ativo pode reter pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial. Dita de outra forma, a estabilidade de um agente ativo em uma matriz de fibroína de seda (isto é, a capacidade de um agente ativo de manter a sua bioatividade (por exemplo, pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade inicial) em uma matriz de fibroína de seda) pode ser aumentada em, pelo menos, por cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, em relação à estabilidade de um agente ativo na ausência de uma matriz de fibroína de seda. Em uma modalidade, o agente ativo pode reter pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial.

As composições descritas no presente documento podem ser mantidas por qualquer período de tempo, por exemplo, horas, dias, semanas, meses ou anos. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas a uma temperatura acima de 0°C durante pelo menos cerca de 3 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos, por cerca de 9 horas, pelo menos, por cerca de 12 horas, pelo menos, por cerca de 24 horas ou mais. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas durante, pelo menos, por cerca de 1 dia,

pelo menos cerca de 2 dias, pelo menos cerca de 3 dias, pelo menos cerca de 4 dias, no mínimo cerca de 5 dias, pelo menos cerca de 6 dias, pelo menos, por cerca de 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas durante, pelo menos, por cerca de 1 semana, pelo menos cerca de 2 semanas, pelo menos cerca de 3 semanas, pelo menos cerca de quatro semanas ou mais. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas durante pelo menos cerca de 1 mês, pelo menos, por cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 7 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 11 meses, pelo menos cerca de 12 meses ou mais.

Nos métodos e composições descritos no presente documento, as composições descritas podem ser mantidas em qualquer temperatura ou a uma temperatura recomendada pelo fabricante especificada para um agente ativo. Em algumas modalidades, as composições podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou em gelo seco. Em algumas modalidades, as composições podem ser mantidas, por exemplo, entre cerca de -80°C e cerca de -20°C, inclusive, ou entre cerca de -20°C e cerca de 0°C, inclusive. Em algumas modalidades, as



composições podem ser mantidas a uma temperatura acima de 0°C. Nestas modalidades, as composições podem ser mantidas a uma temperatura de cerca de 0°C a cerca da temperatura ambiente. Tal como empregado no presente documento, o termo

5 "temperatura ambiente" é utilizado para descrever uma temperatura em torno da qual as composições descritas no presente documento são mantidas e inclui temperaturas entre 0°C e 60°C, entre 0°C e 50°C, ou entre 0°C e 40°C. Em algumas modalidades, a temperatura ambiente é a temperatura do

10 refrigerador (por exemplo, entre 0°C e 15°C, inclusive). Em algumas modalidades, a temperatura ambiente está em torno da temperatura corpórea de um indivíduo (por exemplo, entre 36°C e 38°C, inclusive, para um indivíduo humano, ou uma faixa de temperaturas corpóreas mais altas ou mais baixas

15 para outros animais). Em algumas modalidades, a temperatura ambiente é a temperatura ambiente, por exemplo, entre 20°C e 35°C, e pode variar de acordo com as condições geográficas. Por exemplo, a temperatura ambiente em regiões de clima quente, por exemplo, na África, pode ser geralmente mais

20 quente que em regiões de clima frio, por exemplo, os Estados Unidos ou Reino Unido. Em algumas modalidades, as composições podem ser mantidas a uma temperatura de pelo menos cerca de 37°C ou mais a 37°C. Em algumas modalidades, as composições podem ser mantidas a uma temperatura de pelo menos cerca de

40°C ou mais a 40°C. Em algumas modalidades, as composições podem ser mantidas a uma temperatura de pelo menos cerca de 45°C ou mais a 45°C.

Algumas modalidades descritas no presente documento são  
5 úteis para o desenvolvimento de dispositivos implantáveis para distribuição de medicamentos, em que um agente ativo pode reter pelo menos 30% (incluindo, pelo menos, por cerca de 40%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 80% ou mais) de sua bioatividade original ou mais durante um período  
10 de tempo. Em algumas modalidades, uma composição ou um agente ativo em um dispositivo implantável para medicamento pode reter pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original ou mais durante pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca de 24 horas, pelo menos cerca  
15 36 horas, pelo menos cerca de 48 horas, pelo menos 3 dias, pelo menos cerca de 4 dias, pelo menos cerca de 5 dias, pelo menos cerca de 6 dias, pelo menos cerca de uma semana, pelo menos cerca de duas semanas, pelo menos cerca de três semanas, pelo menos, por cerca de 4 semanas, pelo menos cerca  
20 de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, ou pelo menos após 1 ano ou mais, após a implantação.

Em algumas modalidades, um ou mais agentes ativos, por exemplo, imunógenos tais como vacinas, encapsulados em uma

forma injetável de matriz de fibroína de seda (por exemplo, mas não limitado ao hidrogel, partículas do tipo gel, e/ou microesferas) podem ser administrados a um indivíduo (por exemplo, por injeção, como a injeção subcutânea), como um

5 depósito de agente ativo (por exemplo, um depósito de vacina) de tal modo que o agente ativo (por exemplo, uma vacina) pode ser liberado de forma contínua ou intermitentemente, a partir do depósito por um período de tempo prolongado, por exemplo, por um período de horas, dias, semanas ou meses. Em

10 algumas modalidades, o agente ativo (por exemplo, uma vacina) pode ser liberado a uma taxa na qual, pelo menos, por cerca de 1% (incluindo, pelo menos, por cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo

15 menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou mais) do agente ativo encapsulado são liberados ao longo de um período de pelo menos 1 hora, pelo menos 2 horas, pelo menos 3 horas, pelo menos cerca de 4 horas, pelo menos cerca

20 de 5 horas, de pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 12 horas, pelo menos cerca 24 horas ou mais. Em algumas modalidades, o agente ativo (por exemplo, uma vacina) pode ser liberado a uma taxa na qual, pelo menos, por cerca de 10% (incluindo, pelo menos, por cerca de 20%, pelo menos

cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou mais) do agente ativo encapsulado são liberados  
5 durante um período de 5 dias, a um período de 1 semana, pelo menos cerca de 2 semanas, pelo menos cerca de 3 semanas, pelo menos cerca de 1 mês, pelo menos, por cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses ou mais.

Em algumas modalidades, o agente ativo retém pelo menos  
10 cerca de 30% da sua bioatividade original, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% da bioatividade original ou atividade mais elevada a cerca de  
15 4°C, cerca de 25°C, cerca de 37°C, cerca de 45°C, ou mais, durante pelo menos até 6 meses. Em algumas modalidades, o agente ativo retém pelo menos cerca de 8% da bioatividade inicial a temperaturas de cerca de 37°C ou mais, durante pelo menos 6 meses.

20 Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas sob exposição à luz, por exemplo, luz de diferentes comprimentos de onda e/ou a partir de diferentes fontes. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser

mantidas expostas à radiação UV ou de infravermelhos. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas sob luzes visíveis.

Em algumas modalidades, a composição descrita no presente documento, quando armazenada ou transportada, pode ser submetida à pelo menos um ciclo de mudança de estado.

O termo "ciclo de mudança de estado" tal como é empregado no presente documento se refere a uma mudança de um estado da matéria, incluindo, mas não limitado a de um estado sólido para um estado líquido, ou a partir de um estado fluido para um estado sólido. Um estado fluido pode incluir, mas não está limitado aos líquidos, gases, pastas, pasta fluida, plasmas, e quaisquer combinações dos mesmos.

Um estado sólido se refere a um estado que não é fluido e pode também incluir os semissólidos, por exemplo, um gel. A composição descrita no presente documento pode ser mantida em um determinado estado por qualquer período de tempo, por exemplo, segundos, minutos, horas, semanas, meses ou anos, antes de mudar para outro estado. Um ciclo de mudança de estado pode ser resultado de, pelo menos, uma mudança de uma condição ambiental descrita no presente documento, por exemplo, uma mudança de temperatura, uma mudança na pressão do ar ambiente, condições de luz, umidade, ou quaisquer combinações das mesmas.

Em uma modalidade, o ciclo de mudança de estado se refere a um ciclo de congelamento-descongelamento. Em tais modalidades, a composição descrita no presente documento, quando armazenada ou transportada, pode ser submetida à pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, pelo menos dois ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos três ciclos de congelamento-descongelamento, pelo menos quatro ciclos de congelamento-descongelamento, pelo menos cinco ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos seis ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos sete ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos oito ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos nove ciclos de congelamento e descongelamento, pelo menos, dez ciclos de congelamento-descongelamento ou mais. O termo "ciclos de congelamento-descongelamento" é empregado no presente documento para descrever uma série alternada de congelamento e descongelamento, e também engloba uma série alternada de estado congelado (sólido) e fluido. Por exemplo, um ciclo de congelamento-descongelamento envolve uma mudança de estado entre um estado congelado (sólido) e um estado fluido. O intervalo de tempo entre o congelamento e descongelamento, ou estado congelado e líquido, pode ser qualquer período de tempo, por exemplo, horas, dias, semanas ou meses. Por exemplo, uma vez que uma composição de agente

ativo ter sido congelada ou estiver em um estado congelado, a mesma pode ser continuamente armazenada no estado congelado a temperaturas abaixo de zero, por exemplo, entre cerca de -20°C e -80°C, até que precise ser descongelada para uso novamente. O congelamento de uma composição pode ser realizado rapidamente, por exemplo, em nitrogênio líquido, ou gradualmente, por exemplo, a uma temperatura de congelamento, por exemplo, entre cerca de -20°C e -80°C. O descongelamento de uma composição congelada pode ser realizado a qualquer temperatura acima de 0°C rapidamente, por exemplo, à temperatura ambiente, ou de forma gradual, por exemplo, em gelo. Tipicamente, um agente ativo na matriz de fribroína diferente de seda pode perder a sua bioatividade ao longo de um ou mais ciclos de congelamento-descongelamento. Tal como descrito no presente documento, a distribuição de um agente ativo em uma matriz de fibroína de seda pode aumentar a estabilidade do agente ativo e, assim, reter a sua bioatividade, durante um ou mais ciclos de congelamento-descongelamento.

Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas a uma umidade relativa de pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% ou mais. O termo "umidade

relativa", tal como empregado no presente documento é uma medida da quantidade de vapor de água em uma mistura de ar e vapor de água. A mesma é geralmente definida como a pressão parcial de vapor de água na mistura de ar-água, dada como  
5 uma percentagem da pressão de vapor saturado sob essas condições.

Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser liofilizadas para se diminuir a umidade residual durante o armazenamento. Em algumas  
10 modalidades, a umidade residual é reduzida em pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou  
15 pelo menos cerca de 95%.

Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser mantidas sob ou submetidas a qualquer tipo de pressão de ar. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser  
20 mantidas sob ou submetidas em torno da pressão atmosférica, ou mais, por exemplo, cerca de 1 atm, cerca de 2 atm, cerca de 3 atm, cerca de 4 atm, cerca de 5 atm, cerca de 6 atm, cerca de 7 atm, cerca de 8 atm, cerca de 9 atm ou cerca de 10 atm. Em algumas modalidades, as composições descritas no



presente documento podem ser mantidas sob ou submetidas ao vácuo.

Em uma modalidade, a composição é mantida em duas ou mais condições especificadas no presente documento.

5        Sem querer estar limitado pela teoria, a seda pode reduzir a taxa de degradação de um imunógeno (por exemplo, vacina), a uma temperatura elevada (por exemplo, à temperatura ambiente ou acima, incluindo, pelo menos, por cerca de 20°C, pelo menos cerca de 30°C, pelo menos cerca de 10 40°C ou mais). Assim, um imunógeno (por exemplo, vacina), distribuído em uma matriz de fibroína de seda pode ter uma meia-vida mais longa a uma temperatura elevada (por exemplo, à temperatura ambiente ou acima, incluindo, pelo menos, por cerca de 20°C, pelo menos cerca de 30°C, pelo menos cerca de 15 40°C ou mais) pelo menos, por cerca de 1,5 vezes (por exemplo, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, em menos cerca de 15 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 25 20 vezes, pelo menos cerca de 30 vezes, ou mais), em relação a um imunógeno, sem a matriz de seda. Tal como empregado no presente documento, o termo "meia-vida" se refere ao tempo no qual um agente retém cerca de 50% da sua bioatividade inicial (incluindo imunogenicidade original ou

infecciosidade inicial). Consequentemente, um método para estender a meia-vida de um imunógeno (por exemplo, vacina), por exemplo, a uma temperatura elevada (por exemplo, à temperatura ambiente ou acima, incluindo, pelo menos, por  
5 cerca de 20°C, pelo menos cerca de 30°C, pelo menos cerca de 40°C ou mais) também é fornecido no presente documento. O método compreende a manutenção de uma composição imunogênica, em que a composição compreende uma matriz de fibroína de seda, e pelo menos um imunógeno (por exemplo,  
10 vacina) distribuída na mesma, e em que o imunógeno (por exemplo, vacina) retém pelo menos cerca de 30% de sua imunogenicidade inicial (por exemplo, infecciosidade) quando a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 24 horas a uma temperatura de, pelo menos, em torno da  
15 temperatura ambiente ou mais. Em algumas modalidades, o imunógeno (por exemplo, vacina) pode reter pelo menos cerca de 80% de sua imunogenicidade inicial (por exemplo, infecciosidade). Em algumas modalidades, a composição pode ser mantida durante pelo menos até cerca de 6 meses. Em  
20 algumas modalidades, a composição pode ser mantida a uma temperatura superior a 37°C, superior a 45°C, ou mais alta.

#### *Composições de armazenamento estável*

Outros aspectos descritos no presente documento são as composições estáveis em armazenamento que compreendem uma

matriz de fibroína de seda e um agente ativo distribuído, misturados ou incorporados a ela, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é submetida, pelo menos, a um ciclo de mudança de estado, e/ou é mantida durante um período de tempo, sob uma ou mais das condições especificadas no presente documento. Em uma modalidade, o ciclo de mudança de estado é um ciclo de congelamento-descongelamento. Em uma modalidade, o período de tempo para manter o agente ativo é, pelo menos, de cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, a condição indicada pode ser uma condição ambiental sob a qual um agente ativo é armazenado e/ou transportado. Exemplos não limitantes das condições ambientais incluem temperaturas, pressões de ar, umidade e exposição à luz. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser imunogênicas. Em tais modalidades, o agente ativo é um imunógeno. Em algumas modalidades, o agente ativo é uma vacina.

Quaisquer composições descritas no presente documento podem estar presentes em qualquer estado de matéria, por exemplo, uma película, uma fibra, uma partícula, um gel, uma microesfera ou um hidrogel. Nas várias modalidades, o estado do material das composições descritas no presente documento pode variar de acordo com o estado da matriz de fibroína,

por exemplo, uma película, uma fibra, uma partícula, um gel, uma microesfera, ou um hidrogel de seda. Em algumas modalidades, a matriz de fibroína de seda está presente em um estado sólido. Em outras modalidades, a matriz de fibroína de seda pode ser uma solução.

Qualquer razão de fibroína de seda de agente ativo pode ser usada. Nas várias modalidades, a razão de uma matriz de fibroína de seda de um agente ativo é de cerca de 1:1.000 até cerca de 1.000:1, cerca de 1:500 a cerca de 500:1, cerca de 1:250 a cerca de 250:1, cerca de 1:125 a cerca de 125:1, cerca de 1:100 a cerca de 100:1, cerca de 1:50 a cerca de 50:1, cerca de 1:25 a cerca de 25:1, cerca de 1:10 a cerca de 10:1, cerca de 1:5 a cerca de 5:1, cerca de 1:3 a cerca de 3:1 ou de cerca de 1:1. A razão da matriz de fibroína de seda para o agente ativo pode variar de acordo com determinado número de fatores, incluindo a seleção de um agente ativo, a condição do armazenamento, e de duração, a concentração da matriz de fibroína de seda e a forma da matriz de seda. Um versado na técnica pode determinar a relação apropriada da matriz de fibroína de seda para o agente ativo, por exemplo, pela medição da bioatividade do agente ativo mantido nas várias razões descritas no presente documento ao longo de um valor pré-determinado de tempo, sob uma condição definida, por exemplo, a uma temperatura acima

de 0°C. Os métodos para a medição da bioatividade dos diversos agentes ativos descritos no presente documento, por exemplo, enzimas, vacinas, proteínas, anticorpos e ácidos nucleicos, são bem conhecidos na arte. A título de exemplo, a estabilidade ou a bioatividade de um dado agente ativo na fibroína de seda pode ser determinada com base na combinação de tempo e temperatura. Por exemplo, estudos de estabilização podem ser conduzidos durante 6 meses. Ensaaios de atividade podem ser realizados, por exemplo, ao fim de 2 semanas, 4 semanas, e depois mensalmente. As amostras podem ser preparadas para proporcionar N=3 para cada ponto de tempo. A faixa de condições de temperatura de armazenamento a ser avaliada inclui 4°C (refrigeração), 25°C (temperatura ambiente), 37°C (temperatura corpórea), 45°C e/ou 50°C, inclusive. Adicionalmente, a atividade pode ser ensaiada após um, dois, três ou mais ciclos de congelamento-descongelamento. Essas variáveis podem ser combinadas de forma exaustiva para caracterizar completamente a formulação ótima para a estabilidade a longo prazo do(s) agente ativo(s). Em algumas modalidades, os resultados da estabilidade do agente ativo com relação a seda podem ser comparados, por exemplo, com as preparações de agente ativo liofilizado nas mesmas condições de armazenamento, com o objetivo de melhorar a estabilidade das condições de armazenamento recomendadas

pelo fabricante (por exemplo, 4°C) de preparações de agente ativo liofilizado.

Quando a matriz de fibroína de seda está em estado sólido, a mesma pode ser adicionalmente processada. Em  
5 algumas modalidades, as composições compreendendo uma matriz de fibroína de seda em estado sólido podem ser ainda mais micronizadas. O termo "micronizado" é empregado no presente documento com referência a partículas com um tamanho médio de cerca de 1.000  $\mu\text{m}$  ou menos e engloba nanopartículas e/ou  
10 micropartículas. Tal como empregado no presente documento, o termo "nanopartículas" é definido como partículas com um tamanho médio compreendido entre cerca de 1 nm a cerca de 1.000 nm, a partir de cerca de 5 nm a cerca de 900 nm, ou de cerca de 10 nm a cerca de 800 nm. O termo "micropartículas"  
15 se refere às partículas com um tamanho médio variando entre cerca de 1  $\mu\text{m}$  a 1.000  $\mu\text{m}$ , de cerca de 5  $\mu\text{m}$  a cerca de 900  $\mu\text{m}$  ou de cerca de 10  $\mu\text{m}$  a cerca de 800  $\mu\text{m}$ . Deve ser entendido que "micronizado" não se refere apenas às partículas que tenham sido produzidas pela divisão fina, tal como, moagem  
20 mecânica, tri trituração ou colisão de jato, de materiais que estejam na forma em volume ou outra forma, por exemplo, uma película de fibroína de seda em estado sólido. Em algumas modalidades, as partículas micronizadas podem também ser formadas por outros métodos mecânicos, químicos ou

físicos conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, a formação em solução ou *in situ*. A composição descrita no presente documento pode ser micronizada, por exemplo, por pulverização, esmagamento, moagem, liofilização, ou  
5 quaisquer combinações dos mesmos.

#### *Fibroína de seda*

A fibroína de seda é um biopolímero candidato especificamente atraente para ser usado em modalidades dos vários aspectos descritos no presente documento, por  
10 exemplo, por causa de todo seu processamento aquoso (Sofia e outros, 54 J. Biomed. Mater. Res. 139 (2001); Perry e outros, 20 Adv. Mater. 3070-72 (2008)), funcionalização relativamente fácil (Murphy e outros, 29 Biomat. 2829-38 (2008)), e biocompatibilidade (Santin e outros, 46 J. Biomed.  
15 Mater. Res. 382-9 (1999)). Por exemplo, a seda foi aprovada pela U.S. Food and Drug Administration como um tecido que constrói uma plataforma em implantes humanos. Vide Altman e outros, 24 Biomaterials: 401 (2003).

A seda pode proporcionar uma matriz de  
20 imobilização capaz de estabilizar moléculas bioativas. Relatórios anteriores sobre o aprisionamento de enzimas, anticorpos e antibióticos nas matrizes de seda indica estabilização e atividade recuperadas mesmo em temperaturas elevadas e sem condições de armazenamento especiais ou

acréscimo de aditivos (Pritchard e outros, "Silk fibroin encapsulated powder reservoirs for sustained release of adenosine" *Journal of Controlled Release* (2010) 144:159-167; Lu e outros, "Stabilization of enzymes in silk films" *Biomacromolecules* (2009) 10:1032-1042). Contudo, esses relatórios não descrevem que a fibroína de seda possa estabilizar a vacina (por exemplo, uma vacina viva) que é uma preparação biológica e é sensível à temperatura.

Conforme empregado no presente documento, o termo "fibroína de seda" inclui fibroína de seda e proteína da seda de insetos ou de aranha. Vide, por exemplo, Lucas e outros, 13 *Adv. Protein Chem.* 107 (1958). Qualquer tipo de fibroína de seda pode ser usado de acordo com os vários aspectos descritos no presente documento. A fibroína de seda produzida por bichos da seda, tais como, *Bombyx mori*, é a mais comum e representa um recurso ecologicamente correto, renovável. Por exemplo, a fibroína de seda usada em uma película de seda pode ser alcançada através da extração de sericina dos casulos de *B. mori*. Casulos orgânicos dos bichos da seda são também comercialmente disponíveis. Existem muitas sedas diferentes, no entanto, incluindo a seda de aranha (por exemplo, obtida a partir de *Nephila clavipes*), sedas transgênicas, sedas geneticamente modificadas, tais como sedas de bactérias, leveduras, células de mamífero,



animais transgênicos ou plantas transgênicas (vide, por exemplo, WO 97/08315, Patente US número 5.245.012) e as suas variantes, que podem ser usadas.

Em muitas modalidades, a matriz de fibroína de seda  
5 pode ser modificada para diferentes aplicações biomédicas. Por exemplo, para manter a estabilidade de um agente ativo distribuído em uma matriz de fibroína de seda, quando implantado *in vivo* para engenharia de tecidos ou para fins de distribuição de medicamentos, as partículas de seda podem  
10 ser geneticamente modificadas, o que prevê uma nova modificação da seda, tal como a inclusão de um polipeptídeo de fusão compreendendo um domínio de proteína fibrosa e um domínio de mineralização, o qual pode ser utilizado para formar um compósito orgânico-inorgânico. Vide WO  
15 2006/076711. Além disso, a matriz de seda pode ser combinada com um ou mais polímeros biocompatíveis, tais como óxido de polietileno, polietilenoglicol, colágeno, fibronectina, queratina, ácido poliaspártico, polilisina, alginato, quitina, quitosano, ácido hialurônico e semelhantes. Vide,  
20 por exemplo, WO 04/062697, WO 05/012606. Em algumas modalidades, a fibroína de seda pode ser também quimicamente modificada, por exemplo, através de diazônio ou reações de acoplamento de carbodiimida, a interação de avidina-biodina, ou a modificação de genes e semelhantes, para alterar as

propriedades físicas e funcionalidades da proteína de seda. Vide, por exemplo, WO 2011/011347, *Functionalization of Silk Material by Avidin-Biotin Interaction*; WO 2010/057142, *Surface Modification of Silk Fibroin Matrices with PEG Useful as Anti-Adhesion Barriers & Anti-Thrombotic Materials*; 5 document US número de série 12/192,588, *Diazonium Salt Modification of Silk Polymer*. Adicionalmente, a matriz de fibroína de seda pode ser combinada com uma substância química, tal como, lícero, que afeta, por exemplo, a 10 flexibilidade da matriz, Vide, por exemplo, WO 2010/042798, *Modified Silk films Containing Glycerol*.

#### *Agentes ativos*

Conforme empregado no presente documento, o termo "agente ativo" se refere a qualquer molécula, composto ou 15 composição, no qual se deseja que a bioatividade do mesmo seja estabilizada quando tal molécula, composto ou composição for submetido à pelo menos um ciclo de mudança de estado e/ou for mantido sob certas condições, tal como descrito no presente documento. Para os métodos e composições 20 descritos no presente documento, qualquer agente ativo pode ser mantido dentro de uma matriz de fibroína de seda. Exemplos de agentes ativos incluem, mas não estão limitados as proteínas, peptídeos, antígenos, imunógenos, vacinas, anticorpos ou partes deles (por exemplo, moléculas

semelhantes ao anticorpo), enzimas, ácidos nucleicos (por exemplo, oligonucleotídeos, polinucleotídeos, siRNA, shRNA), aptâmeros, vírus, bactérias, pequenas moléculas, células foto sintéticas e compostos de captação de energia, agentes  
5 aromatizantes, antibióticos, agentes terapêuticos, agentes de diagnóstico, tais como agentes de contraste ou corante, vetores virais e antiveneno.

Tal como empregado no presente documento, os termos "proteínas" e "peptídeos" são empregados indiferentemente  
10 para designar uma série de resíduos de aminoácidos ligada à outra através de ligações peptídicas entre os grupos alfa-amino e carbóxi de resíduos adjacentes. Os termos "proteína" e "peptídeo", que são empregados indiferentemente no presente documentos se referem a um polímero de aminoácidos  
15 de proteínas, incluindo aminoácidos modificados (por exemplo, fosforilados, glicosilados, etc.) e análogos de aminoácidos, independentemente do seu tamanho ou função. Embora "proteína" seja frequentemente usada com referência aos polipeptídeos relativamente grandes, e "peptídeo" seja  
20 frequentemente usado com referência aos pequenos polipeptídeos, o uso desses termos na técnica se sobrepõe e varia. O termo "peptídeo" tal como é empregado no presente documento se refere aos peptídeos, polipeptídeos, proteínas e fragmentos de proteínas, a menos que indicado de outra

maneira. Os termos "proteína" e "peptídeo" são termos empregados no presente documento de forma indiferente para se referir a um produto de gene e seus fragmentos. Assim, os peptídeos ou proteínas exemplificares incluem os produtos dos genes, proteínas que ocorrem naturalmente, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos e outros equivalentes, variantes, fragmentos e análogos dos precedentes.

O termo "ácidos nucléicos" empregado no presente documento se refere aos polinucleotídeos, tais como, ácido desoxirribonucléico (DNA) e, quando apropriado, ácido ribonucléico (RNA), ou polímeros dos mesmos no modo simples ou duplo filamentado. A menos que especificamente limitado, o termo engloba ácidos nucléicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação semelhantes às do ácido nucléico de referência e são metabolizados de forma semelhante aos nucleotídeos de ocorrência natural. Salvo indicação em contrário, uma sequência de ácidos nucléicos específica, engloba implícita e de forma conservadora as variantes modificadas dos mesmos (por exemplo, substituições de códon degenerado) e sequências complementares, assim como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, as substituições de códons degenerados podem ser obtidas por geração de sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons

selecionados (ou todos) é substituída com resíduos mistos de base e/ou desoxiinosina (Batzner e outros, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka, e outros, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985), e Rossolini e outros, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). O termo "ácidos nucleicos" também deve ser entendido como incluindo, como equivalentes, os derivados, variantes e análogos de RNA ou de DNA obtidos a partir de análogos de nucleotídeos, e, polinucleotídeos de filamento simples (sentido ou antissentido) e de cadeia dupla.

O termo "pequeno RNA de interferência" (siRNA), também referido no presente documento como "pequeno RNA interferente" é definido como um agente que funciona de modo a inibir a expressão de um gene alvo, por exemplo, por RNAi. Um siRNA pode ser sintetizado quimicamente, o mesmo pode ser produzidos por transcrição *in vitro*, ou pode ser produzido dentro de uma célula hospedeira. As moléculas de siRNA também podem ser geradas por clivagem de RNA de cadeia dupla, em que um filamento é idêntico à mensagem a ser inativada. O termo "siRNA" se refere ao dúplex de pequeno RNA inibitório que induz a via de RNA interferente (RNAi). Essas moléculas podem variar em comprimento (geralmente 18-30 pares de bases) e contêm vários graus de complementaridade em relação ao RNAm alvo na cadeia de antissentido. Alguns, mas não todos, os siRNA têm bases desemparelhadas pendendo sobre a

terminação 5' ou 3' dos 60 filamentos de sentido e/ou filamentos antissentido. O termo "siRNA" inclui dúplex de dois filamentos separados, bem como filamentos simples que podem formar estruturas de grampo que compreendem uma região  
5 de dúplex.

O termo "shRNA", tal como empregado no presente documento se refere ao RNA pequeno de estrutura de grampo, que funciona como espécie RNAi e/ou siRNA, mas difere, pelo que, as espécies shRNA são de estrutura semelhante a grampo  
10 duplo filamentada para aumentar a estabilidade. O termo "RNAi", tal como empregado no presente documento se refere ao RNA de interferência, ou moléculas de RNA de interferência são moléculas de ácidos nucleicos ou seus análogos, por exemplo, moléculas à base de RNA que inibem a expressão  
15 gênica. RNAi se refere a um meio de silenciamento do gene pós-transcricional seletivo. RNAi pode resultar na destruição de RNAm específico, ou prevenir o processamento ou tradução de RNA, tal como RNAm.

O termo "enzimas", como usado no presente documento se  
20 refere a uma molécula de proteína que catalisa reações químicas de outras substâncias, sem que seja destruída ou substancialmente alterada após a conclusão das reações. O termo pode incluir enzimas que ocorrem naturalmente e as enzimas de bioengenharia ou suas misturas. Exemplos de

famílias de enzimas incluem cinases, desidrogenases, oxidoredutases, GTPases, carboxil transferases, acil transferases, descarboxilases, transaminases, racemases, metil transferases, formil transferases e  $\alpha$ -  
5 cetodecarboxilases.

O termo "vacinas" como empregado no presente documento se refere a qualquer preparação de microrganismos mortos, organismos vivos atenuados, antígenos de subunidade, antígenos de toxóide, antígenos conjugados ou outro tipo de  
10 molécula antigênica que, quando introduzida no corpo dos indivíduos produz imunidade a uma doença específica, causando a ativação do sistema imune, formação de anticorpos e/ou a criação de uma resposta de célula T e/ou célula B. Em geral, as vacinas contra microrganismos são dirigidas a pelo  
15 menos, parte de um vírus, bactérias, parasitas, micoplasma, ou outro agente infeccioso. Em uma modalidade, a vacina encapsulada em uma matriz de fibroína de seda é uma vacina viva.

Conforme empregado no presente documento, o termo  
20 "aptâmeros" significa uma sequência de nucleotídeo de filamento simples, parcialmente de filamento simples, parcialmente duplo filamentada ou duplo filamentada capaz de reconhecer especificamente uma molécula não oligonucleotídeo selecionada ou grupo de moléculas. Em algumas modalidades,

o aptâmero reconhece a molécula não oligonucleotídeo ou grupo de moléculas através de um mecanismo diferente da formação triplex ou de emparelhamento de bases de Watson. Os aptâmeros podem incluir, sem limitação, os segmentos de sequências  
5 definidos e sequências compreendendo nucleotídeos, ribonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos, análogos de nucleotídeos, nucleotídeos modificados e os nucleotídeos que compreendem modificações de estrutura, pontos de ramificação e resíduos de nucleotídeo, grupos ou pontes. Métodos de  
10 seleção de aptâmeros para ligação a uma molécula são bem conhecidos na técnica e facilmente acessíveis a um versado na técnica comum.

Conforme empregado no presente documento, o termo "anticorpo" ou "anticorpos" se refere a uma imunoglobulina  
15 intacta ou a um fragmento de ligação ao antígeno monoclonal ou policlonal com a região Fc (fragmento cristalizável) ou fragmento de ligação FcRn da região Fc. O termo "anticorpos" inclui também "as moléculas semelhantes a anticorpo", tais como, os fragmentos de anticorpos, por exemplo, fragmentos  
20 de ligação ao antígeno. Fragmentos de ligação ao antígeno podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. "Fragmentos de ligação ao antígeno" incluem, inter alia, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb e fragmentos da região



determinante de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFv), os anticorpos de domínio simples, os anticorpos quiméricos, diacorpos e poliptídeos que contenham pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que seja  
5 suficiente para conferir ligação do antígeno específico ao polipeptídeo. Anticorpos lineares também estão incluídos para os fins descritos no presente documento. Os termos Fab, Fc, pFc', F(ab')<sub>2</sub> e Fv são empregados com os significados imunológicos convencionais (Klein, Immunology (John Wiley,  
10 New York, N.Y., 1982); Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology (Wiley & Sons, Inc., New York); e Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford)). Anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno específicos para vários  
15 antígenos se encontram disponíveis comercialmente de vendedores, tais como, R&D Systems, BD Biosciences, e Biosciences and Miltenyi, ou podem ser produzidos contra esses marcadores da superfície das células por meio de métodos conhecidos pelos versados na técnica. na arte.

20 Conforme empregado no presente documento, o termo "regiões determinantes de complementaridade" (CDRs, ou seja, CDR1, CDR2 e CDR3) se refere aos resíduos de aminoácidos de um domínio variável de anticorpo cuja presença é necessária para a ligação ao antígeno. Cada domínio variável tipicamente

apresenta três regiões CDR identificadas como CDR1, CDR2 e CDR3. Cada região determinante de complementaridade pode compreender resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade", tal como definido por Kabat (isto é, com relação os resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "laço hipervariável" (isto é, com relação aos resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Em alguns casos, uma região determinante de complementaridade pode incluir aminoácidos, de ambos uma região CDR, definida de acordo com Kabat e um laço hipervariável.

A expressão "anticorpos lineares" se refere aos anticorpos descritos em Zapata e outros, Protein Eng., 8 (10):1057-1062 (1995). Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Fd em tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, juntamente com os polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação ao

antígeno. Os anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

A expressão fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "scFv", como empregada no presente documento  
5 significa os fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios VH e VL do anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. De preferência, o polipeptídeo Fv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite que o scFv forme a  
10 estrutura desejada para ligação ao antígeno. (Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315 (1994)).

O termo "diacorpos", como empregado no presente documento, se refere aos pequenos fragmentos de anticorpo  
15 com dois sítios de ligação ao antígeno, fragmentos que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Utilizando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois  
20 domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação ao antígeno. (EP 404.097, WO 93/11161; Hollinger e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)).

Conforme empregado no presente documento, o termo "moléculas pequenas" se refere às moléculas naturais ou sintéticas, incluindo, mas não limitado aos peptídeos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleotídeos, análogos polinucleotídicos, aptâmeros, nucleotídeos, análogos de nucleotídeos, orgânicos ou compostos inorgânicos (isto é, incluindo compostos organometálicos e heteroorgânicos) possuindo um peso molecular inferior a cerca de 10.000 gramas por mol, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a cerca de 5.000 gramas por mol, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a cerca de 1.000 gramas por mol, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a cerca de 500 gramas por mol, e sais, ésteres, e outras formas farmacêuticamente aceitáveis de tais compostos.

O termo "bactérias", como empregado no presente documento abrange todas as variantes de bactérias, por exemplo, organismos procarióticos e cianobactérias. As bactérias são pequenas (dimensões lineares típicas de cerca de 1  $\mu$ m), não compartimentadas, com DNA circular e ribossomas de 70S.

O termo "antibióticos" é empregado no presente documento para descrever um composto ou composição que

diminui a viabilidade de um microrganismo, ou que inibe o crescimento ou a reprodução de um microrganismo. Tal como é usado nesta descrição, um antibiótico pretende ainda incluir um agente antimicrobiano, bacteriostático ou bactericida.

5 Exemplos de antibióticos incluem, mas não se limitam às penicilinas, cefalosporinas, penemas, carbapenemas, monobactamas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, lincosídeos, cloranfenicol, vancomicina, metronidazol, rifanpicina,  
10 isoniazida, espectinomicina, trimetoprima, sulfametoxazol e semelhantes.

O termo "células" empregado no presente documento se refere a qualquer célula, procariota ou eucariota, incluindo plantas, fungos, vermes, insetos e mamíferos. As células de  
15 mamíferos incluem, sem limitação as de primatas, humanos e uma célula de um animal de interesse, incluindo, sem limitação, rato, hamster, coelho, cão, gato, animais domésticos, tais como equinos, bovinos, murinos, ovinos, caninos, felinos, etc. As células podem ser de uma ampla  
20 variedade de tipos de tecidos, tais como, sem limitação; hematopoiético, neural, mesenquimal, cutâneo, mucosa, estromal, baço muscular, retículoendotelial, epitelial, endotelial, hepáticas, renais, gastrintestinais, pulmonares, células T etc. As células estaminais, células estaminais

embrionárias (ES), as células derivadas de ES e progenitores de células estaminais também são incluídos, incluindo, sem limitação, hematopoética, neural, estroma, músculo, cardiovasculares, hepáticas, as células-tronco pulmonares, gastrintestinal, etc. As células de levedura também podem ser utilizadas como células em algumas modalidades. Em algumas modalidades, as células podem ser *ex vivo*, ou células cultivadas, por exemplo, *in vitro*. Por exemplo, para as células *ex vivo*, as células podem ser obtidas a partir de um indivíduo, em que o indivíduo é saudável e/ou afetado com uma doença. As células podem ser obtidas, como um exemplo não limitativo, por biópsia ou outros meios cirúrgicos conhecidos dos especialistas na técnica.

O termo "compostos fotossintéticos e de captação de energia" se refere a moléculas que podem obter ou absorver a energia da luz, por exemplo, a clorofila.

Conforme empregado no presente documento, o termo "vetor viral" inclui tipicamente DNA estranho que se deseja inserir em uma célula hospedeira e, geralmente, inclui uma cassete de expressão. O DNA estranho pode compreender uma unidade de transcrição inteira, gene poli-A promotor ou o vetor pode ser manipulado para conter sequências de terminação promotoras/de transcrição de tal modo que apenas o gene de interesse necessita de ser inserido. Esses tipos

de sequências de controle são conhecidos na arte e incluem promotores para a iniciação da transcrição, opcionalmente com um operador, juntamente com sequências de sítios de ligação ao ribossoma. Os vetores virais incluem, mas não  
5 estão limitados aos vetores lentivírus, vetores retrovirais, vetores lentivirais, vetores virais de herpes simplex, vetores adenovirais, vetores virais adeno-associados (AAV), EPV, EBV, ou variantes ou seus derivados. Várias empresas produzem tais vetores virais comercialmente, incluindo,  
10 porém não limitado ao Avigen, Inc. (Alameda, Calif.; vetores AAV), Cell Genesys (Foster City, Calif.; vetores retroviral, adenovírus, AAV, e lentivirais), Clontech (vetores retrovirais e baculoviral), Genovo, Inc. (Sharon Hill, Pa.; vetores de adenovírus e AAV), Genvec (França; vetores  
15 adenovírus), IntroGene (Leiden, Países-Baixos; vetores adenovírus), Molecular Medicine (vetores retrovirais, adenovírus, AAV, herpes viral), Norgen (vetores de adenovírus), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; lentivirais), e Transgene (Estrasburgo, França; vetores  
20 adenovírus, vacina, retrovírus e lentivirais).

Conforme empregado no presente documento, o termo "antígenos" se refere a uma molécula ou uma porção de uma molécula capaz de ser ligada por um agente de ligação seletivo, tal como um anticorpo, e, adicionalmente, capaz de

ser utilizada em um animal para induzir a produção de anticorpos capazes de se ligarem a um epítopo daquele antígeno. Um antígeno pode ter um ou mais epítopos. O termo "antígeno" também pode se referir a uma molécula capaz de  
5 ser ligada por um anticorpo ou um receptor de células T (TCR) se apresentado por moléculas MHC. O termo "antígeno", tal como é empregado no presente documento, engloba também os epítopos de células-T. Um antígeno é adicionalmente capaz de ser reconhecido pelo sistema imune e/ou de ser capaz de  
10 induzir uma resposta imune humoral e/ou a resposta imune celular que conduz à ativação de linfócitos B e/ou T. No entanto, isso pode requerer que pelo menos em certos casos, o antígeno contenha, ou esteja ligado a um epítopo de célula Th e é fornecido no adjuvante. Um antígeno pode ter um ou  
15 mais epítopos (epítopos B e T). A reação específica referida acima pretende indicar que o antígeno reagirá, de preferência, normalmente de uma maneira altamente seletiva, com o seu anticorpo correspondente, ou TCR e não com os vários outros anticorpos ou TCRs que podem ser evocados por  
20 outros antígenos. Antígenos, como empregado no presente documento, podem também ser misturas de vários antígenos individuais.

Conforme empregado no presente documento, o termo "vírus" se refere a um agente infeccioso composto de ácido



nucléico encapsulado em uma proteína. Tais agentes infecciosos são incapazes de replicação autônoma (isto é, a replicação requer o uso de maquinaria da célula hospedeira). Genomas virais podem ser de filamento simples (ss) ou de  
5 filamento duplo (ds), RNA ou DNA, e podem ou não empregar transcriptase reversa (RT). Além disso, os vírus RNAss podem ser tanto de sentido (+) quanto de antissentido (-). Exemplos de vírus incluem, mas não estão limitados aos vírus DNAs (por exemplo, Adenovírus, vírus do herpes, poxvírus), vírus  
10 de DNAss (por exemplo, Parvovírus), vírus RNAds (por exemplo, Reovírus), vírus (+)RNAss (por exemplo, Picornavírus, Togaviruses), vírus (-) RNAss (por exemplo, Ortomioxivírus, Rhabdovírus), vírus RNAss-RT, isto é, RNA(+) sentido com DNA intermediário no ciclo de vida (por exemplo, Retrovírus),  
15 e vírus DNAds-RT (por exemplo, Hepadnavírus). Em algumas modalidades, os vírus também podem incluir vírus de tipo selvagem (natural), vírus mortos, os vírus vivos atenuados, vírus modificados, vírus recombinantes ou quaisquer combinações dos mesmos. Outros exemplos de vírus incluem,  
20 mas não estão limitados aos vírus envelopados, vírus sincicial respiratório, vírus sem envelope, bacteriófagos, vírus recombinantes e vetores virais. O termo "bacteriófagos" como empregado no presente documento se refere aos vírus que infectam bactérias.

O termo "antiveneno", como empregado no presente documento, se refere a um produto biológico utilizado no tratamento de picadas ou mordeduras venenosas. O antiveneno é criado por retirada do veneno da cobra, aranha ou inseto  
5 desejado. O veneno é, então, diluído e injetado em um cavalo, ovelha, cabra ou gato. O indivíduo animal sofrerá uma resposta imune ao veneno, produzindo anticorpos contra a molécula ativa do veneno que pode então ser colhida a partir de sangue do animal e usada para tratar o envenenamento.

10 O termo "agentes terapêuticos" é reconhecido na técnica e se refere a qualquer fração química que é uma substância biológica, fisiológica ou farmacologicamente ativa que atua local ou sistemicamente em um indivíduo. Exemplos de agentes terapêuticos, também conhecidos como "medicamentos" estão  
15 descritos em referências bibliográficas bem conhecidas, tais como, Merck Index, Physicians Desk Reference, and The Pharmacological Basis of Therapeutics e incluem, sem limitação, medicamentos, vitaminas; suplementos minerais, substâncias utilizadas para o tratamento, prevenção,  
20 diagnóstico, cura ou mitigação de uma doença ou enfermidade, substâncias que afetam a estrutura ou função do corpo; ou pró-medicamentos, que se tornam biologicamente ativos ou mais ativos depois de terem sido colocados em um ambiente fisiológico. Várias formas de um agente terapêutico podem

ser usadas as quais são capazes de ser liberadas a partir da composição alvo nos tecidos adjacentes ou fluidos por administração a um indivíduo. Exemplos incluem esteróides e ésteres de esteróides (por exemplo, estrogênio, progesterona, testosterona, androsterona, colesterol, noretindrona, digoxigenina, ácido eólico (cólico), ácido deoxicólico e ácido quenodesoxicólico), compostos contendo boro (por exemplo, carborano), nucleotídeos quimioterapêuticos, medicamentos (por exemplo, antibióticos, antivirais, antifúngicos), enodinas (por exemplo, caliqueamicinas, esperamicinas, dinemicina, cromóforo neocarzinostatina e cromóforos de kedarcidin), complexos de metais pesados (por exemplo, cisplatina), antagonistas de hormônios (por exemplo, tamoxifeno), proteínas não específicas (não anticorpo) (por exemplo, oligômeros de açúcar), oligonucleotídeos (por exemplo, oligonucleotídeos antissentido que se ligam a uma sequência de ácido nucléico alvo (por exemplo, sequência de RNAm)), peptídeos, proteínas, anticorpos, agentes fotodinâmicos (por exemplo, rodamina 123), radionuclídeos (por exemplo, I-131, Re-186, Re-188, Y-90, Bi-212, A-211, Sr-89, Ho-166, Sm-153, Cu-67 e Cu-64), toxinas (por exemplo, ricina), e substâncias farmacêuticas à base de transcrição.

Um "agente de diagnóstico" é qualquer fração química

que possa ser usada para o diagnóstico. Por exemplo, os agentes de diagnóstico incluem agentes de imageamento de contendo radioisótopos, tais como, índio ou tecnécio; agentes de contraste ou corantes contendo iodo, gadolínio ou cianina; enzimas tais como peroxidase de rábano, GFP, fosfatase alcalina, ou  $\beta$ -galactosidase, substâncias fluorescentes, tais como, derivados de európio, substâncias luminescentes, tais como, derivados de N-metilacrídio ou semelhantes.

#### 10        *Imunógeno e Vacinas*

Em certas modalidades, os agentes ativos são imunógenos. Em algumas modalidades, o imunógeno é uma vacina. Como demonstrado no presente documento, um modelo de vacina aprisionado, a vacina MMR é constituída de vírus vivo, atenuado e subsequentemente recuperado de um veículo de seda mantido em atividade biológica significativa em comparação à vacina não encapsulada em seda. Em uma modalidade, é provida no presente documento uma vacina de MMR estabilizada que pode ser armazenada à temperatura ambiente durante várias semanas, enquanto mantém em uma proporção substancial a atividade original. A estabilização das vacinas vivas atenuadas fornece um importante avanço nos programas de imunização, reduzindo os custos de transporte, equipamentos e treinamento, reduzindo o desperdício e ampliando programas

de imunização.

O termo "imunógeno" se refere a qualquer substância, por exemplo, vacinas, capazes de induzir uma resposta imune em um organismo. Um "imunógeno" é capaz de induzir uma  
5 resposta imunológica contra si próprio por administração a um indivíduo. O termo "imunológica" tal como é empregado no presente documento em relação a uma resposta imunológica, se refere ao desenvolvimento de uma resposta humoral (mediada por anticorpos) e/ou uma resposta celular (mediada pelas  
10 células T específicas de antígenos ou os seus produtos de secreção) dirigida contra um imunógeno em um indivíduo receptor. Tal resposta pode ser uma resposta ativa induzida pela administração de um imunógeno ou peptídeo imunogênico a um indivíduo ou uma resposta passiva induzida pela  
15 administração de anticorpo ou células T iniciadas que são direcionadas ao imunógeno. Uma resposta imune celular é provocada pela apresentação de epítopos polipeptídicos em associação com moléculas MHC da Classe I ou Classe II para ativar células T auxiliares CD4+ específicas para o antígeno  
20 e/ou células T citotóxicas CD8+. Tal resposta pode também envolver a ativação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células da microglia, eosinófilos ou outros componentes da imunidade inata.

O termo "imunogenicidade" se refere à capacidade de uma substância, tal como um antígeno ou epítopo, de provocar uma resposta imunológica humoral e/ou mediada por células em um indivíduo. Um versado na técnica pode facilmente avaliar a  
5 imunogenicidade de uma substância. A presença de uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada por qualquer método reconhecido na técnica, por exemplo, ensaios de proliferação (células T CD4+), ensaios CTL (linfócitos T citotóxicos) (vide Burke, supra; Tigges, supra) ou imuno-  
10 histoquímica com seção de tecido de um indivíduo para determinar a presença de células ativadas, tais como monócitos e macrófagos, após a administração de um imunógeno. Um versado na técnica pode prontamente determinar a presença da resposta imune mediada humoral mediada em um indivíduo  
15 por quaisquer métodos bem estabelecidos. Por exemplo, o nível de anticorpos produzidos em uma amostra biológica tal como o sangue pode ser medido por western blot, ELISA ou outros métodos conhecidos para a detecção de anticorpos.

Os imunógenos úteis em algumas modalidades dos vários  
20 aspectos descritos no presente documento incluem agentes patogênicos mortos, vivos patogênicos vivos atenuados, subunidades protéicas e seus conjugados, toxinas inativadas e peptídeos sintéticos, carboidratos e os seus conjugados, e antígenos. O termo "agente patogênico", tal como empregado

no presente documento significa qualquer agente produtor de doença (especialmente um vírus ou bactéria ou outro microorganismo).

O termo "agentes patogênicos mortos" é empregado no presente documento com referência aos agentes patogênicos que eram previamente virulentos (ou seja, capazes de causar a doença) mas foram destruídas com produtos químicos ou calor. Exemplos de vacinas compreendendo agentes patogênicos mortos incluem, sem limitação, a vacina contra a gripe, a vacina contra o cólera, a vacina contra a peste bubônica, vacina contra poliomielite, vacina contra hepatite A e vacina contra a raiva.

O termo "agentes patogênicos vivos atenuados" como empregado no presente documento se refere aos agentes patogênicos que não foram inativados, ou seja, agentes patogênicos capazes de se replicar em células permissivas e induzindo uma resposta imunológica específica, mas não induzem as doenças causadas por agentes patogênicos do tipo selvagem correspondentes em um indivíduo. Agentes patogênicos atenuados, vivos podem ser produzidos por um versado na técnica, por exemplo, por cultura dos agentes patogênicos do tipo selvagem sob condições que desativam suas propriedades virulentas, ou usando organismos menos virulentos, porém proximamente relacionados para produzir

tal resposta imunológica. Exemplos de agentes patogênicos vivos, atenuados, incluem, mas não estão limitados as doenças virais, febre amarela, sarampo, rubéola e caxumba e febre tifóide doença bacteriana. Em algumas modalidades, a vacina viva de *Mycobacterium tuberculosis* não é obtida de uma cepa contagiosa, mas contém uma cepa virulenta modificada denominado "BCG" usado para induzir uma resposta imune à vacina. A vacina viva atenuada contendo a cepa *Yersinia pestis* EV é utilizada para imunização de praga.

10        Em algumas modalidades, um imunógeno usado nas composições descritas no presente documento pode ser toxina inativada que causa doenças em vez do agente patogênico. Tais composições não limitantes incluem tétano e difteria.

15        Em algumas modalidades, enquanto que um imunógeno pode compreender um composto inativado, por exemplo, uma toxina inativada, a partir de um agente patogênico, peptídeos sintéticos, carboidratos ou antígenos podem também ser usados como um imunógeno em composições imunogênicas descritas no presente documento.

20        Em certas modalidades, um imunógeno utilizado nas composições descritas no presente documento pode incluir uma subunidade de proteína, isto é, um fragmento de um agente patogênico morto ou vivo, atenuado ou um seu conjugado. Tais exemplos incluem, sem limitações, a vacina de subunidade



contra o vírus da Hepatite B, que é composta apenas das proteínas superficiais do vírus (previamente extraído do soro do sangue de pacientes cronicamente infectados, mas agora produzido por recombinação dos genes virais na levedura), a vacina de partícula semelhante a vírus (VLP) contra o papilomavírus humano (HPV), que é composta da principal proteína da capsídeo viral, e as subunidades de hemaglutinina e neuraminidase do vírus da gripe. Em tais modalidades, determinados agentes patogênicos apresentam revestimentos externos de polissacarídeo, que são fracamente imunogênicos. Ao ligar esses revestimentos externos às proteínas (por exemplo, toxinas), o sistema imune é capaz de reconhecer o polissacarídeo como se fosse um antígeno de proteína. Um imunógeno conjugado exemplar é o utilizado na vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B. Assim, conjugados imunógenos também são incluídos nos aspectos descritos no presente documento.

Exemplos adicionais de imunógenos incluem os que podem ser derivados do vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliovírus, *Neisseria meningitides* C, influenza, *Varicella*, *Mycobacteria tuberculosis* ou Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico, toxóide da difteria, ou *Bordetella pertussis*. O imunógeno também pode ser uma combinação de imunógeno, tal como, DTaP, DTwP, DTPwP hepatite B, DTP

hepatite B Hib ou DTaP hepatite B Hib IPV.

Em algumas modalidades, o imunógeno é uma bactéria, tal como *Mycobacteria tuberculosis*, *bacille Calmette-Guérin* ou *Bordetella pertussis*. O imunógeno bacteriano pode ser morto ou atenuado. O imunógeno pode compreender uma subunidade bacteriana. Exemplo de subunidades bacterianas imunogênicas incluem aquelas derivadas de *Neisseria meningitidis* Tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, *streptococos* do grupo B, ou *Bordetella pertussis*. O imunógeno bacteriano pode ser recombinante. A subunidade bacteriana pode ser ou incluir um polissacarídeo. Ainda em outras modalidades, o imunógeno é uma subunidade viral, por exemplo, derivada de vírus da hepatite B ou papilomavírus humano. O imunógeno viral também pode ser recombinante. O imunógeno viral também pode compreender vírus mortos.

O imunógeno estabilizado conforme descrito no presente documento pode ser um produto de vacina, por exemplo, BIOTHRAX® (vacina adsorvida contra antraz, Emergent Biosolutions, Rockville, MD); TICE® BCG Live (*Bacillus Calmette-Guérin* para uso intravesical, Organon Tekina Corp. LLC, Durham, NC); MYCOBAX® BCG Live (Sanofi Pasteur Inc.); Daptacel® (vacina adsorvida contra toxóides da difteria, tétano e coqueluche acelular [Tdap], Sanofi Pasteur Inc.); INFANRIX® (vacina tríplice (Tdap) adsorvida,

GlaxoSmithKline); TRIPEDIA® (vacina tríplice (Tdap), Sanofi Pasteur); TRIHIBIT® (Tdap/Hib#, Sanofi Pasteur); KINRIX® (vacina contra toxóides de difteria e tétano, adsorvida, acelular contra coqueluche e vírus da poliomielite inativado, GlaxoSmithKline); PEDIARIX® (Tdap-HepB-IPV, GlaxoSmithKline); PENTACEL® (vacina contra toxóides da difteria e tétano, adsorvida, acelular contra coqueluche e vírus da poliomielite e *Haemophilus b* conjugados, inativados [conjugado de toxóide tetânico] Sanofi Pasteur), Toxóides da difteria e tétano, adsorvida (para uso pediátrico, Sanofi Pasteur); DECAVAC® (toxóides de difteria e tétano, adsorvida, para uso adulto, Sanofi Pasteur); ACTHIB® (vacina conjugada toxóide tetânico e *Haemophilus b*, Sanofi Pasteur); PEDVAXHIB® (vacina Hib, Merck); Hiberix (vacina conjugada toxóide tetânico e *Haemophilus* tipo b, dose de reforço, GlaxoSmithKline); Comvax® (vacina contra Hepatite B-Hib, Merck); HAVRIX® (vacina contra hepatite A, pediátrica, GlaxoSmithKline); VAQTA® (vacina contra Hepatite A, pediátrica, Merck); ENGERIX-B® (Hep B, pediátrica, adolescente, GlaxoSmithKline); RECOMBIVAX HB® (vacina contra a hepatite B, Merck); TWINRIX® (vacina contra HepA/HepB B, 18 anos ou mais, GlaxoSmithKline); CERVARIX® (vacina contra papilomavírus humano bivalente [tipos 16 e 18] recombinante, GlaxoSmithKline); GARDASIL® (vacina contra papilomavírus

humano bivalente [tipos 6, 11, 16 e 18], recombinante, Merck); AFLURIA® (Vacina contra a gripe, 18 anos ou mais, CSL); AGRIFLU™ (vacina contra vírus da gripe para injeção intramuscular, Novartis Vaccines); FLUARIX® (Vacina contra a gripe, 18 anos ou mais, GaxoSmithKline); FLULAVAL® (Vacina contra a gripe, 18 anos ou mais, GaxoSmithKline); FLUVIRIN® (vacina contra a gripe, 4 anos e acima, Novartis Vaccine); FLUZONE® (Vacina contra gripe, 6 meses ou mais, Sanofi Pasteur); FLUMIST® (vacina contra gripe, 2 anos ou mais, MedImmune); IPOL® (vacina e-IPV contra poliomielite, Sanofi Pasteur); JE-VAX® (vacina contra vírus da encefalite japonesa, inativada, BIKEN, Japão); IXIARO® (vacina contra vírus da encefalite japonesa, inativada, Novartis); MENACTRA® (vacina meningocócica [Grupos A, C, Y e W-135] e contra a difteria, Sanofi Pasteur); MENOMUNE®-A/C/Y/W-135 (vacina polissacarídica meningocócica, Sanofi Pasteur); MMRII® (vacina MMR, Merck); MENVEO® (vacina conjugada meningocócica [Grupos A, C, Y e W-135] e difteria oligossacarídica CRM<sub>197</sub>, Novartis Vaccines); PROQUAD® (vacina MMR e varicela, Merck); PNEUMOVAX 23® (vacina polissacarídeo pneumocócica, Merck); PREVENAR® (vacina pneumocócica 7-valente, Wyeth/Lederle); PREVENAR-13® (vacina pneumocócica 13-valente, Wyeth/Lederle), POLIOVAX™ (vírus da poliomielite inativado, sanofi pasteur); IMOVAX® (vacina contra a raiva,

Sanofi Pasteur); RABAVERT™ (Vacina antirrábica, Chiron); ROTATEQ® (Vacina contra o rotavírus, vivo, oral, pentavalente, Merck); ROTARIX® (Rotavirus, vivo, vacina oral, GlaxoSmithKline); DECAVAC™ (vacina contra toxóides tetânicos e diftéricos, sanofi pasteur), Td (genérico) (toxóides tetânicos e diftéricos, adsorvida, Massachusetts Biol. Labs); TYPHIMVI® (vacina polissacarídea contra febre tifóide Vi, Sanofi Pasteur); ADACEL® (toxóide tetânico, toxóide diftérico reduzido e coqueluche acelular, sanofi pasteur); Boostrix® (toxóide tetânico, toxóide diftérico reduzido e coqueluche acelular, GlaxoSmithKline); VIVOTIF® (vacina contra tifo, vivo, oral, Berna Biotech); ACAM2000™ (vacina contra varíola (vaccinia), vivo, Acambis, Inc.); Dryvax® (vacina contra varíola (vaccinia)); VARIVAX® (vacina contra varicela, vivo, Merck); YF-VAX® (vacina contra a febre amarela, Sanofi Pasteur); ZOSTAVAX® (Varicela-zóster, Merck), ou combinações dos mesmos. Quaisquer produtos de vacinas listados na base de dados do Center for Disease Control and Prevention (CDC) também podem ser incluídos nas composições descritas no presente documento.

Em algumas modalidades, as vacinas de animais, tais como vacinas caninas e felinas podem também ser incluídas nos métodos e composições descritos no presente documento. Exemplos de vacinas de animais incluem, mas não estão

limitados a DURAMUNE® MAX 5 (vacina contra cinco  
enfermidades: cinomose canina, hepatite canina infecciosa,  
adenovírus tipo 2, parainfluenza, e parvovírus, Fort Dodge);  
NEO PAR® (parvovírus, Neo Tech); VANGUARD® PLUS 5 (cinomose  
5 canina, adenovírus tipos 1 e 2, Parainfluenza e Parvovirose,  
Pfizer); BRONCHI-SHIELD® III (Canina, Parainfluenza, Fort  
Dodge) e ECLIPSE 4® (rinotraqueíte felina, Calici vírus  
felino e vírus da panleucopenia e Chlamydia psittaci,  
Schering-Plough/Intervet). Quaisquer vacinas para animais  
10 disponíveis comercialmente podem ser incluídas nas  
composições descritas no presente documento.

#### *Vírus Vivos Atenuados*

Composições imunogênicas atenuadas vivas, por exemplo,  
vacinas de vírus vivos atenuados, geralmente podem provocar  
15 respostas imunológicas mais duradouras. Assim, as mesmas são  
por vezes as composições preferidas para administração a um  
indivíduo, por exemplo, um mamífero saudável. Em algumas  
modalidades, os imunógenos utilizados nas composições  
descritas no presente documento são agentes patogênicos  
20 vivos, atenuados. Nas modalidades específicas, os imunógenos  
são vírus vivos atenuados. Assim, os métodos e as composições  
imunogênicos compreendendo pelo menos um vírus atenuado,  
vivo, (incluindo, pelo menos, dois vírus vivos atenuados,  
pelo menos, três vírus vivos atenuados, ou mais) são também

descritos no presente documento. As composições imunogênicas incluem uma matriz de fibroína de seda, e pelo menos um vírus vivo atenuado (incluindo pelo menos dois vírus vivos atenuados, pelo menos, três vírus vivos atenuados ou mais) distribuídos nas mesmas, em que o vírus vivo atenuado (s) retém pelo menos cerca 30% da sua infecciosidade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de mudança de estado, e/ou (b), mantida durante um período de tempo, sob uma condição especificada. Em algumas modalidades, o(s) vírus vivo atenuado pode reter pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, em menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% de infectividade original ou mais.

Tal como empregado no presente documento, o termo "infectividade" em referência a um vírus significa a característica de um vírus que incorpora a capacidade de entrar, sobreviver e se multiplicar ou provocar uma resposta imunológica em um hospedeiro susceptível. Quaisquer métodos conhecidos de um versado na técnica para a determinação da infecciosidade do vírus podem ser utilizados para os fins descritos no presente documento, por exemplo, o ensaio de infecciosidade in vitro descrito no Exemplo 1 pode ser empregado.

Nas modalidades específicas, o vírus vivo atenuado pode ser um vírus envelopado, como *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdo* vírus ou *Retroviridae*. Esses vírus envelopados, vivos, atenuados  
5 podem ser da varicela, sarampo, vírus da caxumba, vírus do sarampo alemão, vírus sincicial respiratório, vírus da febre amarela, ou vírus influenza. A expressão "vírus envelopado" significa um vírus que compreende uma membrana lipidica ou lipoproteína que circunda seus capsídeos protéicos. Esses  
10 envelopes virais podem ser derivado de porções das membranas das células hospedeiras (fosfolipídeos e proteínas), porém incluem algumas glicoproteínas virais. Funcionalmente, os envelopes virais podem ser usados para ajudar os vírus a entrar nas células hospedeiras. Por exemplo, as  
15 glicoproteínas na superfície do envelope servem para identificar e se ligarem aos sítios receptores na superfície da membrana do hospedeiro. O envelope viral então se funde com a membrana do hospedeiro, permitindo que o capsídeo e o genoma viral entrem e infectem o hospedeiro. No entanto,  
20 como o envelope viral é relativamente sensível à dessecação, calor e detergentes, estes vírus envelopados podem ser esterilizados com mais facilidade que os vírus sem envelope e, portanto, apresentam sobrevivência limitada fora dos ambientes hospedeiros. Consequentemente, os métodos e as



composições imunogênicas fornecidos no presente documento são de importância específica para manter a sobrevivência do vírus vivo, atenuado, envelopado fora dos ambientes hospedeiros e, assim, a sua infectividade, uma vez  
5 introduzido em uma célula hospedeira.

Em outras modalidades, o vírus vivo, atenuado pode ser um vírus sem envelope, ou seja, um vírus sem envelope viral, tal como descrito acima. O vírus sem envelope pode ser rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, o vírus da raiva  
10 e/ou o vírus da poliomielite.

Além disso, o presente documento proporciona uma preparação de vírus estabilizada, isenta de células, compreendendo uma matriz de fibroína de seda e vírus infecciosos distribuídos, misturados ou incorporados à  
15 mesma, em que o vírus retém pelo menos cerca de 30% da sua infecciosidade original, quando a preparação é (a) submetida a pelo menos um ciclo de mudança de estado, e/ou (b) é mantida por um período de tempo, sob uma condição especificada no presente documento.

#### 20 *Aditivos e Veículos Farmaceuticamente Aceitáveis*

Diversas modalidades das composições descritas no presente documento podem ainda compreender um aditivo distribuído, misturado ou incorporado na matriz de fibroína de seda. Em algumas modalidades, o aditivo é um agente de

estabilização. A adição do "agente de estabilização" às composições descritas no presente documento pode aumentar ainda mais a estabilidade do agente ativo, isto é, o agente ativo pode reter uma bioatividade mais elevada, em relação  
 5 à bioatividade na ausência do agente de estabilização. Em algumas modalidades, o agente de estabilização é selecionado a partir do grupo consistindo em um sacarídeo, um álcool de açúcar, um íon, um agente tensoativo, e quaisquer combinações destes. Em uma modalidade, o sacarídeo, por exemplo, a  
 10 sacarose, é adicionada nas composições descritas no presente documento.

A título de exemplo, os agentes estabilizadores adicionais podem ser adicionados à solução de fibroína de seda ou matriz. Exemplo de estabilizadores que demonstraram  
 15 previamente sua eficácia na vacina da poliomielite oral, bem como aqueles revelados no presente documento podem ser usados. Agentes estabilizadores podem incluir estabilizadores catiônicos (listados da maior para a menor estabilização):  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$  >  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  >  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  >  $\text{Li}^+$ ;  
 20 estabilizadores aniônicos (da maior para a menor estabilização):  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_4^{4-}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  >  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ , e água dura ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Dorval e outros, 1989). Vide, por exemplo, Mirchamsy e outros, *Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine*, 41 Devel. Biol.

Standardization 255 (1978); Rapp e outros, *Protection of measles virus by sulfate ions against thermal inactivation*, 90 J. Bact. 132 (1965). Outros agentes estabilizadores conhecidos na arte, por exemplo, para a estabilização de  
5 outras vacinas, podem também ser incluídos nas composições descritas no presente documento, por exemplo, aminoácidos, tais como, glutamato de sódio, arginina, lisina e cisteína; monossacarídeos, tais como glicose, galactose, frutose e manose; dissacarídeos, tais como sacarose, maltose e  
10 lactose, alcoóis de açúcar, tais como, sorbitol e manitol; polissacarídeos, tais como, oligossacarídeos, amido, celulose, e seus derivados, albumina do soro humano e albumina de soro bovino, gelatina, e derivados de gelatina, tal como, gelatina hidrolisada e ácido ascórbico como um  
15 antioxidante. Estes materiais são descritos nas publicações, por exemplo, "Toketsu-Kanso To Hogo Busshitsu (Lyophilization And Protective Materials)" escrita por Nei, p. 1-176, publicada por Tokyo Daigaku Shuppan Kai (Publishing Association of the University of Tokyo), Japão em 1972; e  
20 "Shinku Gijutsu Koza (8): Sinku Kanso (Lecture on Vacuum Technology (8): Vacuum Drying)" escrita por Ota e outros, p.176-182, publicada por Nikkan Kogyo Shimbun Co., Ltd., Japão em 1964.

Em algumas modalidades, as composições ou preparações

descritas no presente documento podem ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável. Dependendo da via de administração selecionada, as composições ou preparações podem estar em qualquer forma, por exemplo, comprimido, 5 pastilha, suspensão, pó que flui livremente, aerossol, e uma cápsula. O termo "farmacêuticamente aceitável", tal como é empregado no presente documento, se refere a aqueles compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que, dentro do âmbito do bom juízo médico, são adequados 10 para utilização em contato com os tecidos de seres humanos e animais, sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, mensurável com uma relação benefício/risco razoável.

Tal como empregado no presente documento, o termo 15 "veículo farmacêuticamente aceitável" se refere a um material farmacêuticamente aceitável, composição ou veículo para administração de um agente ativo descrito no presente documento. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, 20 revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção, e afins que sejam compatíveis com a atividade do agente ativo e fisiologicamente aceitáveis para o indivíduo. Alguns exemplos de materiais que podem servir como veículos

farmaceuticamente aceitáveis incluem: (i) açúcares, tais como, lactose, glicose e sacarose, (ii) amidos, tais como, amido de milho e amido de batata, (iii) celulose, e seus derivados, tais como, carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, etil-celulose, celulose microcristalina e acetato de celulose, (iv) tragacanto em pó, (v) malte, (vi) gelatina, (vii) agentes lubrificantes, tais como, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio e talco, (viii) excipientes, tais como, manteiga de cacau e ceras para supositório; (ix) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja, (x) glicóis, tais como, propileno glicol; (xi) polióis, tais como, glicerina, sorbitol, manitol e polietileno-glicol (PEG), (xii), ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila, (xiii) ágar, (xiv) agentes tampão, tais como, hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio, (xv), ácido algínico, (xvi) água isenta de pirogênio, (xvii) solução salina isotônica; (xviii) a solução de Ringer, (xix) álcool etílico, (xx) soluções de pH tamponado, (xxi), poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; (xxii) agentes de volume, tais como polipeptídeos e aminoácidos, (xxiii) componente do soro, tais como, albumina de soro, HDL e LDL; (xxiv) alcoóis C2-C12, tais como, etanol; e (xxv) outras substâncias

compatíveis atóxicas empregadas nas formulações farmacêuticas. Os agentes umectantes, agentes corantes, agentes de liberação, agentes de revestimento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes e antioxidantes podem também estar presentes na formulação. Para as composições ou preparações descritas no presente documento sejam administradas oralmente, os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados aos excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como, diluentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubrificantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes corantes e conservantes. Os diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio e de cálcio, fosfato de sódio e de cálcio, e lactose, enquanto amido de milho e ácido alginico são agentes desintegrantes adequados. Os agentes de ligação podem incluir amido e gelatina, enquanto o agente lubrificante, se presente, será geralmente estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Caso desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila, para retardar a absorção no trato gastrointestinal.

Os veículos farmacêuticamente aceitáveis podem variar de uma preparação descrita no presente documento, dependendo

da via de administração e da formulação. As composições e preparações descritas no presente documento podem ser distribuídas através de qualquer modo de administração conhecido por um versado na técnica. Por exemplo, as

5 composições e preparações descritas no presente documento podem ser distribuídas de um modo sistêmico, por vias de administração, tais como, mas não limitadas as vias oral e parentérica, incluindo administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica e subcutânea.

10 Em algumas modalidades, as composições e preparações descritas no presente documento estão em uma forma que é adequada para injeção. Em outras modalidades, as composições e preparações descritas no presente documento são formuladas para administração oral.

15 Quando da administração parentérica, uma composição e preparação descritas no presente documento podem ser geralmente formuladas em uma forma de unidade de dosagem injetável (solução, suspensão, emulsão). As composições e preparações adequadas para injeção incluem soluções ou

20 dispersões aquosas estéreis. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, meio de cultura celular, tampões (por exemplo, solução de salmoura tamponada com fosfato), poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido, e semelhantes)

e misturas adequadas dos mesmos. Em algumas modalidades, o veículo farmacêutico pode ser uma solução tamponada (por exemplo, PBS).

Uma composição oral pode ser preparada em qualquer forma  
5 de dosagem oralmente aceitável incluindo, mas não limitada  
aos comprimidos, cápsulas, emulsões e suspensões aquosas,  
dispersões e soluções. Veículos comumente utilizados para  
comprimidos incluem lactose e amido de milho. Agentes  
lubrificantes, tais como estearato de magnésio, são também  
10 tipicamente adicionados aos comprimidos. Para administração  
oral em uma forma de cápsula, os diluentes úteis incluem  
lactose e amido de milho seco. Quando as suspensões ou  
emulsões aquosas são administradas oralmente, o ingrediente  
ativo pode ser suspenso ou dissolvido em uma fase oleosa  
15 combinada com agentes emulsionantes ou de suspensão. Caso  
desejado, certos agentes edulcorantes, saborizantes ou  
corantes podem ser adicionados. As preparações líquidas para  
administração por via oral também podem ser preparadas sob  
a forma de um pó seco a ser reconstituído com um solvente  
20 adequado antes da utilização.

As composições podem também conter substâncias  
auxiliares, tais como, agentes umectantes ou emulsionantes,  
agentes tamponantes de pH, aditivos de melhora da viscosidade  
ou gelificação, conservantes, corantes e semelhantes,



dependendo da via de administração e da preparação pretendida. Textos padrão, tais como, "REMINGTONS PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edição, 1985, incorporado ao presente documento como referência, podem ser consultados para obtenção dos preparativos adequados, sem experimentação indevida. No que diz respeito às composições descritas no presente documento, contudo, qualquer veículo, diluente ou aditivo utilizado deve ser biocompatível com os agentes ativos descritos no presente documento. Os versados na técnica reconhecerão que os componentes das composições deverão ser selecionados de modo a serem biocompatíveis com o agente ativo. Isto não apresenta nenhum problema aos versados nos princípios químicos e farmacêuticos, ou os problemas podem ser facilmente evitados por referência aos textos padrão ou por experimentos simples (não envolvendo experimentação indevida).

Em algumas modalidades, as composições e preparações descritas no presente documento podem ser formuladas em uma emulsão ou um gel. Tais composições e preparações de gel podem ser implantadas no local a uma região de tecido de um indivíduo doente.

Para administração *in vivo*, as composições ou preparações descritas no presente documento podem ser administradas com um dispositivo de distribuição, por

exemplo, uma seringa. Por conseguinte, um aspecto adicional descrito no presente documento proporciona dispositivos de distribuição que compreendem pelo menos uma câmara com uma saída, em que pelo menos uma câmara compreende uma quantidade  
5 pré-determinada de qualquer composição descrita no presente documento e a saída fornece uma saída para a composição encapsulada dentro da câmara. Em algumas modalidades, um dispositivo de distribuição descrito no presente documento pode ainda compreender um acionador para controlar a  
10 liberação da composição através da saída. Tal dispositivo de distribuição pode ser qualquer dispositivo que facilite a administração de qualquer composição descrita no presente documento a um indivíduo, por exemplo, uma seringa, um injetor de pó seco, um spray nasal, um nebulizador ou um  
15 implante, tal como, um circuito integrado, por exemplo, por liberação prolongada ou liberação controlada de qualquer composição descrita no presente documento.

Em algumas modalidades das composições descritas no presente documento, a própria matriz de fibroína de seda  
20 pode ser modificada para controlar sua degradação e, assim, a liberação de agentes ativos, por exemplo, tal que a liberação ocorre ao longo de um período de tempo variando de horas a dias ou meses. Em algumas modalidades, as composições descritas no presente documento podem ser combinadas com

outros tipos de sistemas de distribuição disponíveis e conhecidos dos versados na técnica.

Os mesmos incluem, por exemplo, os sistemas à base de polímeros, tais como, ácido poliláctico e/ou ácidos poliglicólico, polianidridos, policaprolactonas, copolioxalatos, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico e/ou suas combinações. As microcápsulas dos polímeros precedentes contendo medicamentos são descritas, por exemplo, na Patente US 5.075.109. Outros exemplos incluem os sistemas não poliméricos que são à base de lipídeos, incluindo esteróis, tais como, colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos ou gorduras neuka 1, tais como, mono, di e triglicerídeos, sistemas de liberação de hidrogel; sistemas com base em lipossomas; sistemas à base de fosfolipídeos; sistemas silásticos; sistemas à base de peptídeos ou implantes parcialmente fundidos. Os exemplos específicos incluem, mas não estão limitados aos sistemas de erosão, nos quais a composição está contida em uma forma dentro de uma matriz (por exemplo, como descrito nas Patentes US números 4.452.775, 4.675.189, 5.736.152, 4.667.014, 4.748.034 e - 29 5.239.660), ou sistemas de difusão nos quais um componente ativo controla a velocidade de liberação (por exemplo, como descrito nas Patentes US Números 3.832.253, 3.854.480, 5.133.974 e 5.407.686). A formulação pode ser

como, por exemplo, microesferas, hidrogéis, reservatórios poliméricos, matrizes de colesterol ou os sistemas poliméricos. Em algumas modalidades, o sistema pode permitir a ocorrência da liberação prolongada ou controlada da  
5 composição, por exemplo, através do controle da taxa da formulação que contém a composição de difusão ou de erosão/degradação. Além disso, um sistema de distribuição de hardware à base de bomba pode ser utilizado para distribuir uma ou mais modalidades das composições ou preparações  
10 descritas no presente documento. A utilização de formulações de liberação prolongada de longo prazo ou de implantes pode ser especificamente adequada para o tratamento de doenças crônicas, tais como diabetes. A liberação de longo prazo, tal como é empregada no presente documento, significa que  
15 uma formulação ou um implante é realizado e disposto para distribuir as composições ou preparações descritas no presente documento, em um nível terapêutico durante pelo menos 30 dias, ou pelo menos 60 dias. Em algumas modalidades, a liberação a longo prazo se refere a uma formulação ou um  
20 implante a ser configurado para fornecer um agente ativo a um nível terapêutico ao longo de vários meses.

#### *Métodos para Preparação de uma Composição Estável ao Armazenamento*

Métodos para a preparação de composições estáveis em

armazenamento são fornecidos conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, as composições estáveis em armazenamento são imunogênicas. O método inclui o fornecimento de uma matriz ou obtenção de fibroína da seda

5 que compreende pelo menos um agente ativo, em que o pelo menos um agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quanto transportado ou durante o armazenamento um período de tempo, sob uma condição especificada. Em algumas modalidades, o método compreende

10 ainda a mistura ou a adição de pelo menos um agente ativo a uma matriz de fibroína da seda. Em algumas modalidades, o método compreende ainda a secagem da matriz de fibroína de seda que compreende pelo menos um agente ativo, para formar uma fibroína de seda em estado sólido, em que o pelo menos

15 um agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade inicial após armazenamento ou transportado durante um período de tempo, sob uma condição especificada. Nessas modalidades, a matriz de fibroína de seda pode ser uma solução ou uma solução semelhante a gel. A matriz de

20 fibroína de seda, contendo, pelo menos, um agente ativo pode ser seca ao ar ou nitrogênio, ou por meio de liofilização. Em uma modalidade, a matriz de fibroína de seda (por exemplo, solução de seda), contendo, pelo menos, um agente ativo pode ser submetida à liofilização para formar fibroína de seda em

estado sólido, liofilizada, carregado com o agente ativo, em que o pelo menos um agente ativo retém, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial (por exemplo, potência viral, vide, por exemplo, Exemplo 3), durante o armazenamento ou transporte por um período de tempo (por exemplo, durante pelo menos 6 meses, ou até um máximo de 6 meses), sob uma condição especificada (por exemplo, armazenamento ou transporte a 37°C, a 45°C ou superior a 45°C).

10        Em algumas modalidades, o método pode compreender, adicionalmente, a liofilização de fibroína de seda em estado sólido ou seca compreendendo pelo menos um agente ativo, por exemplo, para diminuir ainda mais a umidade residual da composição, em que o pelo menos um agente ativo retém pelo  
15 menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial (por exemplo, potência viral, vide, por exemplo, Exemplo 3), durante o armazenamento ou transporte por um período de tempo (por exemplo, durante pelo menos 6 meses, ou até um máximo de 6  
20 meses), sob uma condição especificada (por exemplo, armazenamento ou transporte, a 37°C, a 45°C, ou superior a 45°C).

Em uma modalidade, o método de produção de uma composição estável ao armazenamento em estado sólido inclui

(a) provisão ou obtenção de uma matriz de fibroína de seda que compreende pelo menos um agente ativo, e (b) secagem da matriz de fibroína de seda que compreende pelo menos um agente ativo, para formar uma fibroína de seda em estado sólido, em que o pelo menos um agente ativo retém, pelo menos, por cerca de 30% da sua bioatividade original durante o transporte ou armazenamento por um período de tempo, sob uma condição especificada. Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa (c) de liofilização da fibroína de seda no estado sólido da etapa (b), por exemplo, para reter pelo menos, por cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 80% da bioatividade inicial do agente ativo em temperaturas acima de 0°C, por exemplo, mais de 30°C, mais de 37°C, mais de 40°C. Em algumas modalidades, a fibroína de seda no estado sólido, da etapa (b) é submetida a um tratamento posterior, por exemplo, tratamento com metanol, etanol, tensão de cisalhamento, campo elétrico, pressão, etc., antes da liofilização da etapa (c). Em algumas modalidades o agente ativo é uma composição imunogênica. Em uma modalidade, a composição imunogênica compreende uma vacina monovalente. Em outra modalidade, a composição imunogênica compreende uma vacina multivalente, ou polivalente, por exemplo, uma vacina bivalente ou trivalente.

Tal como empregado no presente documento, o termo "uma vacina monovalente" se refere a uma vacina que é concebida para imunização contra um único antígeno ou um único microorganismo.

5 Tal como empregado no presente documento, o termo "uma vacina polivalente ou multivalente" se refere a uma vacina que é concebida para imunizar contra duas ou mais cepas diferentes de um microorganismo, ou contra dois ou mais microorganismos diferentes. Por exemplo, uma vacina bivalente  
10 é geralmente uma vacina que é concebida para imunizar contra duas cepas diferentes de um microorganismo ou contra dois microorganismos diferentes. Uma vacina trivalente é geralmente uma vacina que é concebida para imunizar contra três cepas diferentes de um microorganismo ou contra três  
15 microorganismos diferentes. Uma vacina trivalente exemplar é uma vacina que se destina a imunizar contra o sarampo, caxumba e rubéola.

Sem querer estar limitado pela teoria, a seda pode impedir que as proteínas do vírus sofram agregação induzida  
20 pelo calor e/ou aumento da temperatura de transição vítrea da vacina (ou ponto de fusão de uma proteína viral), mantendo assim a infecciosidade em temperaturas elevadas. Por conseguinte, em algumas modalidades, o método de preparação de uma composição imunogênica descrita no presente documento



pode ser empregado para diminuir a probabilidade ou a prevenção de agregação de proteínas virais a uma temperatura à qual um vírus de outra forma se agregaria na ausência de matriz de seda. Por exemplo, em algumas modalidades, o método

5 de preparação de uma composição imunogênica descrita no presente documento pode ser utilizado para diminuir o risco de agregação das proteínas virais, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de

10 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou mais, em comparação com um imunógeno, sem a matriz de fibroína de seda. Em algumas modalidades, a agregação de proteínas virais, em uma composição imunogênica descrita no presente

15 documento pode ser reduzida em pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes ou mais, em comparação com um imunógeno, sem a matriz de fibroína de seda. A agregação de proteínas virais pode ser

20 determinada, por exemplo, através da medição do diâmetro efetivo das partículas virais através de dispersão dinâmica da luz, como mostrado no Exemplo 3.

Dito de outra maneira, em algumas modalidades, os métodos de preparação de uma composição imunogênica

descritos no presente documento podem ser empregados para aumentar a temperatura da agregação das proteínas virais, em pelo menos cerca de 10°C, pelo menos cerca de 20°C, pelo menos cerca de 30°C, pelo menos cerca de 40°C, pelo menos  
5 cerca de 50°C, pelo menos cerca de 60°C, pelo menos, por cerca de 70°C, pelo menos cerca de 80°C, pelo menos cerca de 90°C, pelo menos aproximadamente 100°C, ou mais, em relação a um imunógeno, sem a matriz de fibroína de seda. A temperatura de agregação das proteínas virais pode ser  
10 determinada, por exemplo, através da medição do diâmetro efetivo das partículas virais através de uma faixa de temperaturas usando dispersão dinâmica da luz, como mostrado no Exemplo 3. A temperatura na qual o diâmetro efetivo das partículas virais começa a aumentar pode ser a temperatura  
15 de agregação das proteínas virais.

Em algumas modalidades, os métodos de preparação de uma composição imunogênica descrita no presente documento podem ser empregados para aumentar a temperatura de transição vítrea e/ou ponto de fusão de uma vacina em, pelo menos, por  
20 cerca de 10°C, pelo menos cerca de 20°C, pelo menos cerca de 30°C, pelo menos cerca de 40°C, pelo menos cerca de 50°C, pelo menos cerca de 60°C, pelo menos, por cerca de 70°C, pelo menos cerca de 80°C, pelo menos cerca de 90°C, pelo menos aproximadamente 100°C, pelo menos, por cerca de 125°C,

pelo menos cerca de 150°C ou mais, em relação a um imunógeno, sem a matriz de fibroína de seda. A temperatura de transição vítrea e/ou ponto de fusão de uma vacina podem ser determinados, por exemplo, por meio de calorimetria exploratória diferencial como se mostra no Exemplo 3.

A solução aquosa de fibroína de seda usada para fazer uma fibroína de seda em estado sólido pode ser preparada utilizando técnicas conhecidas na arte. A concentração de fibroína de seda nas soluções utilizadas para incorporar ou transportar agente ativo pode ser adequada para o agente ativo específica. Qualquer concentração da solução de fibroína de seda pode ser utilizada. Em uma modalidade, por exemplo, para a estabilização de vacinas, as concentrações de seda podem ser, pelo menos, de cerca de 2%, pelo menos cerca de 4%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 6%, pelo menos cerca de 7%, pelo menos cerca de 8%, pelo menos cerca de 9%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 18%, ou pelo menos cerca de 20% (peso/volume), inclusive. Os processos adequados para a preparação da solução de fibroína de seda são descritos, por exemplo, no Pedido de Patente US número 11/247.358; WO/2005/012606 e WO/2008/127401. A solução aquosa de seda pode então ser transformada em matriz de seda,

tal como películas de seda, revestimentos isolantes ou camadas, ou plataformas tridimensionais, ou fibras eletrofiadas para processamento adicional nos refletores de seda. Uma etapa de microfiltração pode ser empregada no  
5 presente documento. Por exemplo, a solução preparada de fibroína de seda pode ser ainda processada por centrifugação e microfiltração com base em seringa antes do processamento adicional na matriz de seda.

Os polímeros adicionais, por exemplo, polímeros  
10 biocompatíveis e biodegradáveis, podem também ser misturados com a fibroína de seda. Por exemplo, os biopolímeros adicionais, tais como, por exemplo quitosano, apresentam propriedades mecânicas desejáveis, podendo ser processados em água, misturados com fibroína de seda, e formam películas  
15 em geral. Outros biopolímeros, tais como o quitosano, o colágeno, gelatina, agarose, quitina, polihidroxialcanoatos, pululano, amido (amilose amilopectina), celulose, alginato, fibronectina, queratina, ácido hialurônico, pectina, ácido poliaspártico, polilisina, pectina, dextranos e biopolímeros  
20 relacionados ou uma combinação dos mesmos; podem ser utilizados em aplicações específicas e polímeros sintéticos biodegradáveis, tais como, óxido de polietileno, polietileno glicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, poliortoéster, policaprolactona,

polifumarato, polianidridos e copolímeros relacionados também podem ser utilizados seletivamente.

Uma matriz de fibroína de seda pode estar no estado de solução ou no estado sólido. A matriz de fibroína de seda em  
5 estado sólido pode estar em qualquer formato de material, tais como, as fibras de seda, fibras eletrofiadas, películas, esteiras, plataformas tridimensionais, géis secos, esferas (incluindo microesferas e/ou nanoesferas), partículas ou compostos de um ou mais formatos diferentes dos materiais de  
10 seda, como descrito no presente documento. Em outras modalidades, a fibroína de seda em estado sólido é uma partícula.

Em uma modalidade, a fibroína de seda em estado sólido é uma película de seda. Por exemplo, uma película de fibroína  
15 de seda pode ser preparado por deposição de uma solução de fibroína de seda aquosa contendo (por exemplo, a concentração de seda de cerca de 3% (peso/volume) a cerca de 30% (peso/volume) ou cerca de 5% (peso/volume) a cerca de 15% (peso/volume)) sobre um substrato de suporte e permitindo  
20 que a solução de fibroína de seda seque em uma película. A este respeito, o substrato revestido com uma solução à base de fibroína de seda pode ser exposto ao ar durante um período de tempo, tal como 12 horas. A deposição da solução de fibroína de seda pode ser efetuada, por exemplo, usando um

método de revestimento por rotação, em que a solução de fibroína de seda é revestida por rotação sobre o substrato para permitir a fabricação de membranas finas de altura não uniforme; ou simplesmente vertendo uma solução de fibroína de seda sobre a parte superior do substrato. As propriedades da película de fibroína de seda, tal como a espessura e teor de outros componentes, podem ser alteradas por meio da concentração e/ou o volume da solução de fibroína de seda aplicada ao substrato e as técnicas utilizadas para o processamento da solução de fibroína de seda na película de seda. Por exemplo, a espessura da película de seda pode ser controlada alterando a concentração da fibroína de seda na solução, ou por uso de volumes desejados de uma solução de fibroína de seda, resultando na película de fibroína de seda com uma espessura que varia de cerca de 2 nm a 1 mm. Em uma modalidade, pode-se revestir por rotação a fibroína de seda sobre um substrato para criar películas com espessuras de cerca de 2 nm a cerca de 100 utilizando várias concentrações de fibroína de seda e velocidades de fiação.

Em algumas modalidades, em vez de secagem da solução de fibroína de seda, contendo um ou mais agentes ativos (por exemplo, imunógenos) em gás, tal ar ou de nitrogênio, o agente ativo contendo uma solução de fibroína de seda pode ser submetido a liofilização para formar uma matriz de

fibroína de seda liofilizada, por exemplo, película de fibroína de seda liofilizada. A sujeição da solução de fibroína de seda, contendo um ou mais agentes ativos (por exemplo, imunógenos tais como vacinas) a liofilização para a secagem, não só melhora a recuperação inicial do agente ativo (por exemplo, imunógenos tais como vacinas) durante o processo de fabricação, mas também surpreendentemente proporciona uma maior estabilização do agente ativo (por exemplo, imunógenos, tais como vacinas) a temperaturas elevadas (por exemplo, à temperatura ambiente ou acima, ou 37°C ou mais, ou a 45°C ou acima) durante um período de tempo prolongado, por exemplo, durante pelo menos cerca de uma semana, pelo menos, por cerca de 2 semanas, pelo menos cerca de 3 semanas, pelo menos cerca de 4 semanas, pelo menos cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses ou mais.

Em algumas modalidades, a fibroína de seda em estado sólido pode ser uma composição de uma ou mais camadas de fibroína de seda. Cada camada de fibroína de seda pode ter a mesma composição ou propriedades ou diferentes. Por exemplo, cada camada de fibroína de seda pode ter a mesma concentração de fibroína de seda ou diferente e/ou cada camada pode possuir as mesmas ou diferentes propriedades

mecânicas e/ou degradação. Em uma modalidade, a fibroína de seda no estado sólido pode ser uma fibroína de seda de multicamadas, por exemplo, que podem ser ajustados para refletir comprimentos de onda específicos.

5        Em algumas modalidades, a fibroína de seda no estado sólido pode ser um hidrogel de seda. Os métodos para produzir um hidrogel de seda são conhecidos na técnica. Por exemplo, um hidrogel de seda pode ser produzido pela aplicação de uma tensão de cisalhamento a uma solução de fibroína de seda  
10        (que compreende um ou mais agentes ativos, tais como imunógenos e fibroína de seda, a uma concentração de cerca de 0,5% (peso/volume) a cerca de 20% (peso/volume), ou cerca de 1% (peso/volume) a cerca de 15% (peso/volume), ou cerca de 2% (peso/volume) a cerca de 10% (peso/volume)). Em tais  
15        modalidades, a proporção em peso do agente ativo (s) (por exemplo, imunógeno (s)) para uma solução de seda pode variar desde cerca de 1:10 a cerca de 10:1. Em uma modalidade, a proporção em peso do agente ativo (s) (por exemplo, imunógeno (s)) para uma solução de seda pode ser de aproximadamente  
20        1:1. Vide, por exemplo, Pedido Internacional Número: WO 2011/005381, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento como referência, para métodos de produção de gelificação de fibroína de seda induzida por vórtice para encapsulamento e distribuição. Sem limitações, os outros



métodos para a produção de um hidrogel de seda com um ou mais agentes ativos, tais como imunógenos distribuídos no presente também podem ser usados, tal como por sonicação (por exemplo, Pedido de Patente US número 2010/0178304 e 5 Pedido Internacional número: WO 2008/150861), ou por ajuste de pH (por exemplo, Pedido US número 2011/0171239). O conteúdo desses pedidos de patente é incorporado ao presente documento como referência.

Em algumas modalidades, a fibroína de seda em estado 10 sólido pode incluir uma microesfera de seda. Vários métodos de produção de microesferas ou nanoesferas de seda são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, as micropartículas de seda ou nanopartículas podem ser produzidas por um álcool polivinílico (PVA) O método de 15 separação de fase, tal como descrito, por exemplo, no Pedido Internacional número WO 2011/041395, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento como referência. Em tais modalidades, a concentração de seda empregada no método de separação de fases de PVA pode variar entre cerca de 0,5% 20 (peso/volume) a cerca de 20% (peso/volume), ou cerca de 1% (peso/volume) a cerca de 15% (peso/volume), ou cerca de 3% (peso/volume) a cerca de 10% (peso/volume). Em uma modalidade, a concentração de seda empregada no método de separação de fases de PVA pode ser de cerca de 5%

(peso/volume). Em algumas modalidades, a proporção em peso de agente (s) ativo (por exemplo, imunógeno (s)) para uma solução de seda pode ser de cerca de 1:300 a cerca de 1:2000, ou cerca de 1:500 até cerca de 1:1.500. Em uma  
5 modalidade, a proporção em peso de agente (s) ativo (por exemplo, imunógeno (s)) para uma solução de seda pode ser de cerca de 1:1.000. Outros métodos para produção de microesferas ou nanoesferas de seda, por exemplo, descritos no Pedido US número 2010/0028451 e Pedido Internacional  
10 número WO 2008/118133 (utilizando lipídeo como um molde para fazer microesferas ou nanoesferas de seda), e Wenk e outros J. Control Release 2008;132: 26-34 (utilizando o método de pulverização para produzir microesferas ou nanoesferas de seda) podem ser utilizados com o propósito de obter  
15 micropartículas ou nanopartículas de seda encapsulando um agente ativo, tal como um imunógeno descrito no presente documento.

Em algumas modalidades, as microesferas ou nanoesferas de seda podem ainda ser incorporadas em um biopolímero, por  
20 exemplo, para prolongar a liberação de um agente ativo, tal como um imunógeno, durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o biopolímero pode ser um hidrogel de seda que encapsula as microesferas ou nanoesferas de seda carregadas com agente ativo (por exemplo, imunógeno). Vide, por exemplo,

Pedido Internacional número 2010/141133 para os métodos de produção de plataformas de fibroína de seda para distribuição de antibióticos.

Em algumas modalidades, as composições de fibroína de  
5 seda de estado sólido (composições estáveis em armazenamento  
descritas no presente documento) podem ser submetidas a um  
pós-tratamento, por exemplo, para modificar a taxa de  
degradação da fibroína de seda. O tratamento adicional pode  
incluir, mas não está limitado ao, tratamento de solvente  
10 orgânico, tratamento mecânico ou tratamento eletromagnético.  
A título de exemplo, a taxa de degradação da fibroína de  
seda pode ser controlada, por exemplo, modificando a  
quantidade de cristal beta-folha, e/ou orientação do  
cristal. Por conseguinte, a quantidade de cristal beta-  
15 folha, e/ou orientação do cristal em uma fibroína de seda  
pode ser controlada por contato da fibroína de seda com o  
álcool, por exemplo, metanol ou etanol, como estabelecido na  
arte. Em algumas modalidades, a fibroína de seda pode ser  
submetida a uma força mecânica, por exemplo, estiramento ou  
20 tensão de corte para variar a quantidade de cristal beta-  
folha, e/ou alinhamento da orientação do cristal. Em algumas  
modalidades, a fibroína de seda pode ser submetida a um campo  
elétrico ou pressão. Em algumas modalidades, a fibroína de  
seda pode ser contatada com sal.

Sem querer estar limitado pela teoria, a taxa de liberação de um agente ativo a partir de uma matriz de fibroína de seda pode ser controlada pelo teor das estruturas de folha-beta cristalinas, a concentração de seda e/ou  
5 porosidade da matriz de fibroína de seda. Os métodos para a formação de poros em uma matriz de seda são conhecidos na técnica, por exemplo, o método de lixívia do pirogênio, o método de liofilização e/ou um método de formação de gás. Tais métodos são descritos, por exemplo, nos Pedidos de  
10 Patente US números 2010/0279112, 2010/0279112, e 7.842.780, o conteúdo dos mesmos sendo incorporado ao presente documento como referência.

Em algumas modalidades, os métodos de preparação das composições estáveis em armazenamento descritos no presente  
15 documento podem ainda compreender a redução da fibroína de seda em estado sólido, seco, por dispositivos mecânicos para obtenção de partículas micronizadas, como definido no presente documento. Exemplos de dispositivos mecânicos para obtenção de partículas micronizadas incluem micronização,  
20 pulverização, esmagamento, trituração, liofilização ou qualquer combinação destes.

Em conformidade com a prática convencional, as composições descritas no presente documento são desejavelmente processadas em condições assépticas,

utilizando os componentes que tenham se tornado preliminar e bacteriologicamente estéreis. A esterilidade em armazenamento pode ser mantida através da incorporação de uma substância germicida antígeno-compatível, tal como, 5 timerosal.

#### *Kits e Dispositivos*

Embalagens e kits que compreendem pelo menos uma composição estável ao armazenamento ou preparação são também descritos no presente documento. Os pacotes podem ser 10 preparados em vários tipos de recipientes, que podem ser selecionados entre o grupo constituído por um frasco, uma ampola, uma cápsula, um tubo, um dispositivo de distribuição, uma garrafa e uma embalagem. Em algumas modalidades, o dispositivo de distribuição é uma seringa. Em algumas 15 modalidades, a seringa pode ser sem agulha. A composição estável ao armazenamento contida em um pacote pode estar na forma de um hidrogel, partículas do tipo gel, pó, microesferas, nanoesferas, ou quaisquer combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a composição estável ao 20 armazenamento contida em um pacote pode ser liofilizada. Em algumas modalidades, a composição estável ao armazenamento pode ser carregada em uma seringa para injeção.

Os kits providos no presente documento compreendem uma embalagem descrita no presente documento, e uma solução

farmaceuticamente aceitável, por exemplo, PBS. Em algumas modalidades, os kits podem compreender adicionalmente, pelo menos, um dispositivo de distribuição para administração a um indivíduo de uma composição ou de uma preparação descrita  
5 no presente documento. Em outras modalidades, os kits podem compreender ainda um desinfetante. Em certas modalidades, tais embalagens e kits descritos no presente documento podem ser utilizados para fins de vacinação.

Tal como empregado no presente documento, um  
10 "indivíduo" significa um ser humano ou animal. Normalmente, o animal é um vertebrado, tal como um, primata, roedor, animal doméstico ou animal silvestre. Os primatas incluem chimpanzés, macacos cinomólogos, macacos aranha e macacos, por exemplo, Rhesus. Roedores incluem camundongos, ratos,  
15 marmotas, furões, coelhos e hamsters. Os animais domésticos e silvestres incluem vacas, cavalos, porcos, veados, bisontes, búfalos, espécies de felinos, por exemplo, gato doméstico, espécies caninas, por exemplo, cão, raposa, lobo, espécies de aves, por exemplo, frango, emu, avestruz e  
20 peixes, por exemplo, truta, peixe-gato e salmão. Em certas modalidades dos aspectos descritos no presente documento, o indivíduo é um mamífero, por exemplo, um primata, por exemplo, um ser humano. O indivíduo pode ser do sexo masculino ou feminino. De preferência, o indivíduo é um

mamífero. O mamífero pode ser um humano, primata não humano, camundongo, rato, cão, gato, cavalo ou vaca, mas não estão limitados a esses exemplos. Além disso, os métodos e composições descritos no presente documento podem ser  
5 utilizados para tratar animais domésticos e/ou animais de estimação.

Os dispositivos de distribuição pré-carregados com, pelo menos, uma composição ou preparação descritos no presente documento estão também dentro do âmbito dos vários  
10 aspectos descritos no presente documento. As modalidades de um dispositivo de distribuição compreendem pelo menos uma câmara com uma saída, em que a pelo menos uma câmara compreende uma quantidade pré-determinada da composição descrita no presente documento e a saída fornece uma saída  
15 para a composição.

O termo "câmara", tal como empregado no presente documento se refere a qualquer estrutura configurada para armazenar e/ou transmitir uma composição descrita no presente documento. A câmara pode ser de qualquer formato ou  
20 em qualquer tamanho, dependendo das aplicações, as necessidades dos utilizadores e/ou preferências. Uma câmara exemplar inclui, mas não está limitada a um tambor, um tubo, um cassete e uma depressão, por exemplo, uma microplaca.

Em algumas modalidades, o dispositivo de distribuição

descrito no presente documento pode compreender ainda um acionador para controlar a liberação da composição através da saída, administrando assim a composição dele a um indivíduo. Tal como empregado no presente documento, o termo

5 "um acionador" é um dispositivo mecânico que pode converter qualquer tipo de energia para mover a composição através da saída do dispositivo. A título de exemplo, um acionador pode converter energia elétrica para mover ou controlar a liberação da composição através da saída. Em algumas

10 modalidades, é possível converter um acionador de pressão para eliminar ou controlar a composição de liberação através da saída. Por exemplo, um êmbolo de uma seringa converte a força ou pressão para liberar uma composição a partir do cano (câmara), injetando assim a composição em um indivíduo.

15 Exemplos de dispositivos de distribuição descritos no presente documento incluem, mas não estão limitados a uma seringa, um injetor de pó seco, um spray nasal, um nebulizador e um implante. Em algumas modalidades, um implante pode ser um circuito integrado, por exemplo, os

20 descritos nas Patentes US números 5797898, 6669683, 7052488 e 7582080. Em algumas modalidades, os dispositivos de liberação podem ser utilizado para a vacinação. Em tais modalidades, os dispositivos/sistemas de distribuição de vacina podem incluir, mas não estão limitados aos descritos



nos Pedidos de Patente US números 2004/0133160, 2004/0096455, 2005/0112135, 2005/0123565, 2009/0043280 e 2009/0143724, bem como as s US números 5.346.481 e 5.900.238.

O termo "quantidade pré-determinada" é geralmente usado  
5 em referência a uma quantidade de uma composição desejada e/ou determinada por um utilizador, por exemplo, dependendo da aplicação ou tratamento. Em algumas modalidades, o termo "quantidade pré-determinada" se refere a uma quantidade de uma composição eficaz para tratar ou prevenir uma doença ou  
10 um transtorno, por exemplo, aumentando a imunidade contra a doença, reduzindo, inibindo ou retardando, pelo menos, um sintoma da doença, ou a obtenção de uma melhoria da doença, por exemplo, com resultados clínicos benéficos ou desejados.

Para os efeitos de vários aspectos descritos no presente  
15 documento, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados ao alívio de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado da doença estabilizado (por exemplo, não piora), atraso ou retardamento do progressão da doença, melhoria ou alívio do  
20 estado da doença, e remissão (quer parcial ou total), seja detectável ou não detectável. Em algumas modalidades, o tratamento pode se referir ao prolongamento da sobrevivência, em comparação com a sobrevivência esperada se não recebendo o tratamento. Assim, um versado na técnica

compreende que um tratamento pode melhorar a condição da doença, mas pode não ser uma cura completa da doença. No que se refere às composições imunogênicas ou de vacina, o termo "quantidade pré-determinada" pode significar uma quantidade da composição efetiva para fornecer ou aumentar a imunidade a uma doença específica. Um teste de sangue ou quaisquer métodos conhecidos de um versado na técnica pode ser utilizado para verificar a imunidade. Por conseguinte, em algumas modalidades, o dispositivo de liberação compreende uma dose eficaz da composição imunogênica ou vacina.

*Modalidades dos vários aspectos descritos no presente documento podem ser ilustradas pelos seguintes parágrafos numerados.*

1. Um método que compreende uma etapa de: manutenção de uma composição, em que a composição compreende uma matriz de fibroína de seda e pelo menos um agente ativo distribuído na mesma, e em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, ou (b) mantida durante, pelo menos, por cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c) ambos (a) e (b).

2. O método de acordo com o parágrafo 1, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 50% da sua bioatividade

inicial.

3. O método de acordo com o parágrafo 1 ou 2, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial.

5        4. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 1 mês.

10       5. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 4, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

6. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 5, em que a composição é uma película, uma fibra, uma partícula, um gel ou um hidrogel.

15       7. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 6, em que a composição é liofilizada.

8. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 7, em que a composição é micronizada.

20       9. O método de acordo com o parágrafo 8, em que a composição micronizada é constituída por nanopartículas ou micropartículas.

10. O método de acordo com o parágrafo 9, em que as nanopartículas ou micropartículas têm um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

11. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos

1 a 10, em que a composição compreende ainda um aditivo.

12. O método de acordo com o parágrafo 11, em que o aditivo é selecionado a partir de um agente estabilizador, um veículo farmacêuticamente aceitável, ou quaisquer  
5 combinações dos mesmos.

13. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12, em que a composição é mantida a uma temperatura de cerca de 0°C a acima da temperatura ambiente.

14. O método de acordo com a reivindicação 13, em que  
10 a composição é mantida a uma temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

15. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 14, em que a composição é mantida a uma temperatura superior a 37°C.

15 16. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 15, em que a composição é exposta à luz.

17. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 16, em que a composição é mantida a uma umidade relativa de pelo menos cerca de 10%.

20 18. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 17, em que o agente ativo é selecionado entre o grupo que consiste em proteínas, peptídeos, antígenos, imunógenos, vacinas, anticorpos ou partes deles, as moléculas semelhantes aos anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos,

siRNA, shRNA, aptâmeros, vírus, bactérias, pequenas moléculas, células, compostos fotossintéticos e captação de energia, saborizantes, antibióticos, agentes terapêuticos, agentes de diagnóstico, vetores virais e antiveneno.

5        19. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 18, em que o agente ativo é um imunógeno.

20. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o imunógeno é selecionado entre o grupo constituído por agentes patogênicos mortos, agentes patogênicos vivos atenuados,  
10 subunidades protéicas e seu conjugado, as toxinas inativadas e peptídeos sintéticos, carboidratos e antígenos.

21. O método de acordo com o parágrafo 19 ou 20, em que o imunógeno é derivado de vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, *poliovírus*, *Neisseria meningitidis* C,  
15 *Influenza*, *Varicela*, *Mycobacteria tuberculosis* ou Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico, toxóide diftérico e *Bordetella pertussis*.

22. O método de acordo com o parágrafo 19 ou 20, em que o imunógeno é uma combinação de imunógenos selecionados do  
20 grupo consistindo em DTdaP, DTwP, DTwP hepB, DTP hep B Hib, DTdap Hep B Hib IPV, e quaisquer combinações dos mesmos.

23. O método de acordo com o parágrafo 19 ou 20, em que o imunógeno é vírus vivo, atenuado.

24. O método de acordo com o parágrafo 23, em que o

vírus vivo, atenuado é um vírus envelopado.

25. O método de acordo com o parágrafo 24, em que o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*,  
5 *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdovirus*, *Retroviridae*, e quaisquer combinações dos mesmos.

26. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 25, em que o vírus é varicela.

27. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
10 23 a 25, em que o vírus é Influenza.

28. O método de acordo com o parágrafo 23, em que o vírus vivo atenuado provoca sarampo, caxumba ou rubéola.

29. O método de acordo com o parágrafo 19 ou 20, em que o imunógeno é um vírus vivo, atenuado, não envelopado.

15 30. O método de acordo com o parágrafo 29, em que o vírus não envelopado é o rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, vírus da raiva ou poliovírus.

31. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o imunógeno é uma bactéria.

20 32. O método de acordo com o parágrafo 31, em que a bactéria é *Mycobacteria tuberculosis*, bacilo Calmette-Guérin ou *Bordetella pertussis*.

33. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o imunógeno é uma subunidade bacteriana.

34. O método de acordo com o parágrafo 33, em que a subunidade bacteriana é derivada de *Neisseria meningitidis* tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, ou *Streptococcus* do grupo B.

5        35. O método de acordo com o parágrafo 33, em que a subunidade é um polissacarídeo bacteriano.

36. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o imunógeno é uma subunidade viral.

10       37. O método de acordo com o parágrafo 36, em que a subunidade viral é derivada do vírus da hepatite B ou papilomavírus humano.

38. O método de acordo com o parágrafo 19, onde o imunógeno é recombinante.

15       39. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o imunógeno é um produto de vacina selecionado do grupo consistindo em vacina contra o Antraz (BioThrax); BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Tice, Mycobax); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP (Tripedia); DTaP/Hib (TriHIBit); DTaP-IPV (Kinrix); DTaP-HepB-IPV (Pediarix); DTaP-IPV/Hib (Pentacel),  
20       DT (vacina contra difteria mais vacina contra o tétano) (Sanofi), vacina Hib (ACTHib); DT (Massachusetts), vacina Hib (PevaxHIB); Hib/Hep B (Comvax); Hep A (Havrix), Vacina contra hepatite A, hepatite A (Vaqta), Vacina contra hepatite A, hepatite B (Engerix-B), vacina contra hepatite B, Hep B

(Recombivax), vacina contra hepatite B; vacina contra HepA/HepB (Twinrix); Papilomavírus Humano (HPV) (Gardasil); vacina contra Influenza (Afluria); vacina contra Influenza (Fluarix); vacina contra Influenza (FluLaval); vacina contra Influenza (Fluvirin); Vacina contra influenza (Fluzone); vacina contra influenza (FluMist); IPV (Ipol), vacina contra a poliomielite, vacina contra a encefalite japonesa (JE-Vax); vacina contra a encefalite japonesa (Ixiaro); vacina meningocócica (Menactra); vacina tríplice viral (MMR-II);  
 5 vacina MMRV (ProQuad); vacina pneumocócica (Pneumovax); vacina pneumocócica (Prevenar); poliovírus inativado (Poliovax), vacina contra poliomielite; vacina antirábica (Imovax); vacina antirábica (RabAvert); vacina contra o rotavírus (RotaTeq); a vacina contra o rotavírus (Rotarix),  
 10 vacina Td (Decavac); vacina Td (Massachusetts); vacina DTaP (Adacel); vacina DTaP (Boostrix); tifoide (inativada-Typhim Vi), vacina contra o tifo; Tifoide (oral - Ty21a), vacina contra o tifo; Vaccinia (ACAM2000), vacina contra varicela (Varivax); vacina contra a febre amarela (YF-Vax); vacina  
 15 Zoster (Zostavax), e qualquer combinações.  
 20

40. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 39, em que a razão entre a matriz de fibroína de seda e o agente ativo é de cerca de 1:1.000 a cerca de 1.000:1.

41. Uma composição estável em armazenamento



compreendendo uma matriz de fibroína de seda e um agente ativo distribuído na mesma, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de  
5 congelamento-descongelamento, ou (b) mantida durante, pelo menos, por cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c) ambos (a) e (b).

42. A composição de acordo com o parágrafo 41, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 50% da sua  
10 bioatividade inicial.

43. A composição de acordo com o parágrafo 41 ou 42, em que o agente ativo retém pelo menos cerca de 80% da sua bioatividade inicial.

44. A composição de acordo com qualquer um dos  
15 parágrafos 41 a 43, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 1 mês.

45. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 44, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

20 46. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 45, em que a composição é uma película, uma fibra, uma partícula, um gel ou um hidrogel.

47. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 46, em que a composição é liofilizada.

48. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 47, em que a composição é micronizada.

49. A composição de acordo com o parágrafo 48, em que a composição micronizada é substituída por nanopartículas ou  
5 micropartículas.

50. A composição de acordo com o parágrafo 49, em que as nanopartículas ou micropartículas têm um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

51. A composição de acordo com qualquer um dos  
10 parágrafos 41 a 50, compreendendo ainda um aditivo distribuído através da matriz de fibroína de seda.

52. A composição de acordo com o parágrafo 51, em que o aditivo é selecionado a partir de um agente estabilizador, um veículo farmacêuticamente aceitável, ou quaisquer  
15 combinações dos mesmos.

53. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 52, em que a composição é mantida a uma temperatura de cerca de 0°C a acima da temperatura ambiente.

54. A composição de acordo com qualquer um dos  
20 parágrafos 41 a 53, em que a composição é mantida a uma temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

55. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 54, em que a composição é mantida a uma

temperatura superior a 37°C.

56. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 55, em que a composição é mantida sob à luz.

57. A composição de acordo com qualquer um dos  
5 parágrafos 41 a 56, em que a composição é mantida a uma umidade relativa de pelo menos cerca de 10%.

58. A composição de qualquer uma das reivindicações 41 a 57, em que o agente ativo é selecionado do grupo que consiste em proteínas, peptídeos, antígenos, imunógenos,  
10 vacinas, anticorpos ou partes deles, moléculas semelhantes aos anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos, siRNA, shRNA, aptâmeros, vírus, bactérias, moléculas pequenas, células, compostos fotossintéticos e de coleta de energia, aromatizantes, antibióticos, agentes terapêuticos, agentes  
15 de diagnóstico, vetores virais, anti-venenos e quaisquer combinações dos mesmos.

59. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 58, em que o agente ativo é um imunógeno.

60. A composição de acordo com o parágrafo 59, em que  
20 o imunógeno é selecionado entre o grupo constituído por agentes patogênicos mortos, agentes patogênicos vivos, atenuados, subunidades protéicas e conjugados das mesmas, toxinas inativadas e peptídeos sintéticos, carboidratos e antígenos.

61. A composição de acordo com o parágrafo 59 ou 60, em que o imunógeno é derivado do vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliovírus, *Neisseria meningitidis* C, Influenza, Varicela, *Mycobacteria tuberculosis* ou Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico, 5 toxóide diftérico e *Bordetella pertussis*.

62. A composição de acordo com o parágrafo 59 ou 60, em que o imunógeno é uma combinação de imunógenos selecionados do grupo consistindo em DTdaP, DTwP, DTwP hepB, DTP hep B 10 Hib, DTdaP Hep B Hib IPV e quaisquer combinações dos mesmos.

63. A composição de acordo com o parágrafo 59 ou 60, em que o imunógeno é vírus vivo, atenuado.

64. A composição de acordo com o parágrafo 63, em que o vírus vivo, atenuado é um vírus envelopado.

15 65. A composição de acordo com o parágrafo 64, em que o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em Paramyxoviridae, Togaviridae, Orthomyxoviridae, Flaviviridae, Herpesviridae, Rhabdovirus, Retroviridae, e quaisquer combinações destes.

20 66. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 63 a 65, em que o vírus é varicela.

67. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 25, em que o vírus é Influenza.

68. A composição de acordo com o parágrafo 63, em que

o vírus vivo atenuado provoca sarampo, caxumba ou rubéola.

69. A composição de acordo com o parágrafo 59 ou 60, em que o imunógeno é um vírus vivo, atenuado, não envelopado.

70. A composição de acordo com o parágrafo 69, em que  
5 o vírus não envelopado é o rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, vírus da raiva ou poliovírus.

71. A composição de acordo com o parágrafo 59, em que o imunógeno é uma bactéria.

72. A composição de acordo com o parágrafo 71, em que  
10 a bactéria é *Mycobacteria tuberculosis*, bacilo Calmette-Guérin ou *Bordetella pertussis*.

73. A composição de acordo com o parágrafo 59, em que o imunógeno é uma subunidade bacteriana.

74. A composição de acordo com o parágrafo 33, em que  
15 a subunidade bacteriana é derivada de *Neisseria meningitidis* tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, ou *streptococcus* do grupo B.

75. A composição de acordo com o parágrafo 73, em que a subunidade é um polissacarídeo bacteriano.

20 76. A composição de acordo com o parágrafo 59, em que o imunógeno é uma subunidade viral.

77. A composição de acordo com o parágrafo 76, em que a subunidade viral é derivada do vírus da hepatite B ou papilomavírus humano.

78. A composição de acordo com o parágrafo 59, onde o imunógeno é recombinante.

79. A composição de acordo com o parágrafo 59, em que o imunógeno é um produto de vacina selecionado do grupo  
5 consistindo em vacina contra o Antraz (BioThrax); BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Tice, Mycobax); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP (Tripedia); DTaP/Hib (TriHIBit); DTaP-IPV (Kinrix); DTaP-HepB-IPV (Pediarix); DTaP-IPV/Hib (Pentacel), DT (vacina contra difteria mais vacina contra o tétano)  
10 (Sanofi), vacina Hib (ACTHib); DT (Massachusetts), vacina Hib (PevaxHIB); Hib/Hep B (Comvax); Hep A (Havrix), Vacina contra hepatite A, hep A (Vaqta), Vacina contra hepatite A, hep B (Engerix-B), vacina contra hepatite B, Hep B (Recombivax), vacina contra hepatite B; vacina contra  
15 HepA/HepB (Twinrix); Papilomavírus Humano (HPV) (Gardasil); vacina contra Influenza (Afluria); vacina contra Influenza (Fluarix); vacina contra Influenza (FluLaval); vacina contra Influenza (Fluvirin); Vacina contra influenza (Fluzone); vacina contra influenza (FluMist); IPV (Ipol), vacina contra  
20 a poliomielite, vacina contra a encefalite japonesa (JE-Vax); vacina contra a encefalite japonesa (Ixiaro); vacina meningocócica (Menactra); vacina tríplice viral (MMR-II); vacina MMRV (ProQuad); vacina pneumocócica (Pneumovax); vacina pneumocócica (Prevenar); poliovírus inativado

(Poliovax), vacina contra poliomielite; vacina antirábica (Imovax); vacina antirábica (RabAvert); vacina contra o rotavírus (RotaTeg); a vacina contra o rotavírus (Rotarix), vacina Td (Decavac); vacina Td (Massachusetts); vacina DTaP (Adacel); vacina DTaP (Boostrix); tifoide (inativada-Typhim Vi), vacina contra o tifo; Tifoide (oral - Ty21a), vacina contra o tifo; Vaccinia (ACAM2000), vacina contra varicela (Varivax); vacina contra a febre amarela (YF-Vax); vacina Zoster (Zostavax), e qualquer combinações.

80. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 79, em que a razão entre a matriz de fibroína de seda que o agente ativo é de cerca de 1:1.000 a cerca de 1.000:1.

81. Um método para preparação de uma composição estável em armazenamento de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 80, o método compreendendo as etapas de:

a. fornecimento de uma solução de fibroína de seda que compreende pelo menos um agente ativo, e

b. secagem da solução de fibroína de seda da etapa (a) para formar uma fibroína de seda em estado sólido, obtendo-se assim uma composição em que o pelo menos um agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade inicial após armazenamento.

82. O método de acordo com o parágrafo 81, em que a

secagem é a liofilização.

83. Método de acordo com o parágrafo 81, onde a secagem é de ar seco.

84. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 5 81-83, compreendendo ainda a liofilização da fibroína de seda em estado sólido a partir da etapa (b).

85. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 81-84, compreendendo ainda pós-tratamento da composição.

10 86. O método de acordo com o parágrafo 85, caracterizado por o pós-tratamento altera a cristalinidade da composição.

87. O método de acordo com o parágrafo 85 ou 86, onde o pós-tratamento constitui no contato com a composição com metanol ou etanol.

15 88. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 85 a 87, em que o pós-tratamento é a sujeição da composição à tensão de cisalhamento.

89. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 85 a 88, em que o pós-tratamento constitui na sujeição da composição a um campo elétrico.

20 90. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 85 a 89, em que o pós-tratamento constitui na sujeição da composição à pressão.

91. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 85 a 90, em que o pós-tratamento está em contato com a



composição de sal.

92. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 81 a 91, compreendendo ainda a redução da fibroína de seda em estado sólido da etapa (b) por um dispositivo mecânico  
5 para obtenção de partículas micronizadas.

93. O método de acordo com o parágrafo 92, em que os dispositivos mecânicos são selecionados de micronização, pulverização, trituração, moagem, liofilização, ou quaisquer combinações dos mesmos.

10 94. O método de acordo com os parágrafos 92 ou 93, em que as partículas micronizadas têm um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

95. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 81 a 94, em que o pelo menos um agente ativo retém pelo menos  
15 cerca de 80% da sua bioatividade inicial após armazenamento.

96. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 81 a 95, em que o armazenamento é realizado por um período de pelo menos cerca de 6 meses.

97. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
20 81 a 96, em que o armazenamento é realizado a uma temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

98. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 81 a 97, em que o armazenamento é realizado a uma temperatura superior a 37°C.

99. Um método que compreende uma etapa de manutenção de uma composição imunogênica, em que a composição compreende uma matriz de fibroína de seda, e pelo menos um imunógeno distribuído na mesma e em que o imunógeno retém pelo menos  
5 cerca de 30% de sua imunogenicidade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, ou (b), mantida durante pelo menos cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c) ambos (a) e (b).

10 100. O método de acordo com o parágrafo 99, em que o imunógeno retém pelo menos cerca de 50% da sua imunogenicidade inicial.

15 101. O método de acordo com o parágrafo 99 ou 100, em que o imunógeno retém pelo menos cerca de 80% da sua imunogenicidade inicial.

102. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 101, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 1 mês.

20 103. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 102, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

104. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 103, em que a composição é uma película, uma fibra, uma partícula, um gel ou um hidrogel.

105. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 104, em que a composição é liofilizada.

106. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 105, em que a composição é micronizada.

5        107. Método de acordo com o parágrafo 106, em que a composição micronizada é substituída por nanopartículas ou micropartículas.

108. Método de acordo com o parágrafo 107, em que as nanopartículas ou micropartículas têm um tamanho de cerca de  
10 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

109. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 108, em que a composição compreende ainda um aditivo distribuído através da matriz de fibroína de seda.

110. Método de acordo com o parágrafo 109, em que o  
15 aditivo é selecionado a partir do grupo consistindo em um agente estabilizador, um veículo farmacêuticamente aceitável, e quaisquer combinações destes.

111. O método de acordo com o parágrafo 110, em que o agente de estabilização é selecionado a partir do grupo  
20 consistindo em um sacarídeo, um álcool de açúcar, um íon, um agente tensoativo e quaisquer combinações dos mesmos.

112. Método de acordo com o parágrafo 111, em que o sacarídeo é sacarose.

113. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos

99 a 112, em que a composição é mantida a uma temperatura de cerca de 0°C a acima da temperatura ambiente.

114. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 113, em que a composição é mantida a uma temperatura em  
5 torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

115. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 114, em que a composição é mantida a uma temperatura superior a 37°C.

116. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
10 99 a 115, em que a composição é mantida exposta a luz.

117. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 116, em que a composição é mantida a uma umidade relativa de pelo menos cerca de 10%.

118. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
15 99 a 117, em que o imunógeno é selecionado entre o grupo constituído por agentes patogênicos mortos, agentes patogênicos vivos atenuados, subunidades protéicas e seu conjugado, as toxinas inativadas, peptídeos sintéticos, carboidratos, antígenos, e quaisquer combinações dos mesmos.

20 119. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é derivado do vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliovírus, *Neisseria meningitidis* C, influenza, Varicela, *Mycobacteria tuberculosis*, Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico,

toxóide da difteria e *Bordetella pertussis*.

120. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é uma combinação de imunógeno selecionado dentre o grupo consistindo em DTaP, DTP, vacina  
5 DTP HepB, DTP hepatite B Hib, DTaP Hepatite B IPV Hib, e quaisquer combinações dos mesmos.

121. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é vírus vivo atenuado.

122. O método de acordo com o parágrafo 121, onde o, o  
10 vírus vivo atenuado é um vírus envelopado.

123. Método de acordo com o parágrafo 122, no qual o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdovirus*, *Retroviridae*, e  
15 quaisquer combinações dos mesmos.

124. O método de acordo com o parágrafo 121 a 123, em que o vírus é vírus da varicela.

125. O método de acordo com o parágrafo 121 a 123, em que o vírus é o vírus da gripe.

20 126. O método de acordo com o parágrafo 121, onde o, o vírus vivo atenuado provoca sarampo, caxumba ou rubéola.

127. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é um vírus vivo, atenuado, sem envelope.

128. O Método de acordo com o parágrafo 127, no qual o vírus não encapsulado é o rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, vírus da raiva ou poliovírus.

129. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é uma bactéria.

130. O Método de acordo com o parágrafo 129, no qual a bactéria é *Mycobacteria tuberculosis*, bacilo Calmette-Guérin ou *Bordetella pertussis*.

131. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é uma subunidade bacteriana.

132. O Método de acordo com o parágrafo 131, no qual a subunidade bacteriana é derivada de *Neisseria meningitidis* tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, ou *Streptococcus* do grupo B.

133. O Método de acordo com o parágrafo 131, no qual a subunidade é um polissacarídeo bacteriano.

134. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é uma subunidade viral.

135. O Método de acordo com o parágrafo 134, no qual a subunidade viral é derivada do vírus da hepatite B ou papilomavírus humano.

136. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 99 a 118, em que o imunógeno é recombinante.

137. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos

99 a 118, em que o imunógeno é um produto de vacina  
 selecionado entre o grupo consistindo em vacina contra o  
 antraz (BioThrax); BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Tice,  
 Mycobax); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP (Tripedia);  
 5 DTaP/Hib (TriHIBit); DTaP-IPV (Kinrix); DTaP-HepB-IPV  
 (Pediarix); DTaP-IPV/Hib (Pentacel), DT (vacina contra  
 difteria mais vacina contra o tétano) (Sanofi); vacina Hib  
 (ACTHib), DT (Massachusetts), vacina Hib (PedvaxHIB);  
 Hib/Hep B (Comvax); Hep A (Havrix), vacina contra Hepatite  
 10 A; hepatite A (Vaqta), vacina contra Hepatite A, hepatite B  
 (Engerix-B), vacina contra a hepatite B; Hepatite B  
 (Recombivax), vacina contra hepatite B; HepA/HepB vacina  
 (Twinrix); Papilomavírus Humano (HPV) (Gardasil); vacina  
 contra Influenza (Afluria); vacina contra Influenza  
 15 (Fluarix); vacina contra Influenza (FluLaval); vacina contra  
 Influenza (Fluvirin); vacina contra Influenza (Fluzone);  
 Vacina contra a gripe (FluMist); IPV (Ipol), vacina contra  
 a poliomielite, vacina contra a encefalite japonesa (JE-  
 Vax); vacina contra a encefalite japonesa (Ixiaro); vacina  
 20 meningocócica (Menactra); vacina tríplice viral (MMR-II);  
 vacina MMRV (ProQuad); vacina pneumocócica (Pneumovax);  
 vacina pneumocócica (Prevenar); poliovírus inativado  
 (Poliovax) vacina contra a poliomielite, vacina antirrábica  
 (Imovax); vacina antirrábica (RabAvert); vacina contra o

rotavírus (pentavalente), vacina contra o rotavírus (Rotarix); vacina Td (Decavac); vacina Td (Massachusetts); vacina DTaP (Adacel); vacina DTaP (Boostrix), febre tifóide (inativada-Typhim Vi), vacina contra o tifo, febre tifóide (oral - Ty21a), vacina contra o tifo; Vaccinia (ACAM2000);  
5 Vacina contra a varicela (Varivax); vacina contra a febre amarela (YF-Vax); vacina Zoster (Zostavax), e qualquer combinações das mesmas.

138. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
10 99 a 137, em que a razão entre a matriz de fibroína de seda para o imunógeno é de cerca de 1:1.000 a cerca de 1.000:1.

139. Uma composição imunogênica estável em armazenamento que compreende uma matriz de fibroína de seda e um imunógeno distribuído na mesma, em que o imunógeno retém  
15 pelo menos cerca de 30% da sua imunogenicidade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, ou (b), mantida durante pelo menos cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c) ambos (a) e (b).

20 140. A composição de acordo com o parágrafo 139, em que o imunógeno retém pelo menos cerca de 50% da sua imunogenicidade inicial.

141. A composição de acordo com o parágrafo 139 ou 140, em que o imunógeno retém pelo menos cerca de 80% da sua



imunogenicidade inicial.

142. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 141, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 1 mês.

5 143. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 142, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

144. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 143, em que a composição é uma película,  
10 uma fibra, uma partícula, um gel ou um hidrogel.

145. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 144, em que a composição é liofilizada.

146. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 145, em que a composição é micronizada.

15 147. A composição de acordo com o parágrafo 146, em que a composição micronizada é substituída por nanopartículas ou micropartículas.

148. A composição de acordo com o parágrafo 147, em que as nanopartículas ou micropartículas têm um tamanho de cerca  
20 de 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

149. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 148, compreendendo ainda um aditivo distribuído através da matriz de fibroína de seda.

150. A composição de acordo com o parágrafo 149, em que

o aditivo é selecionado entre o grupo que consiste em um agente estabilizador, um veículo farmacêuticamente aceitável e quaisquer combinações dos mesmos.

151. A composição de acordo com o parágrafo 150, em que  
5 o agente de estabilização é selecionado a partir do grupo consistindo em um sacarídeo, um álcool de açúcar, um íon, um agente tensoativo, e quaisquer combinações dos mesmos.

152. A composição de acordo com o parágrafo 151, em que o sacarídeo é sacarose.

10 153. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 152, em que a composição é mantida a uma temperatura de cerca de 0°C até acima da temperatura ambiente.

15 154. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 153, em que a composição é mantida a uma temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

20 155. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 154, em que a composição é mantida a uma temperatura superior a 37°C.

156. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 155, em que a composição é mantida sob exposição à luz.

157. A composição de acordo com qualquer um dos

parágrafos 139 a 156, em que a composição é mantida a uma umidade relativa de pelo menos cerca de 10%.

158. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 157, em que o imunógeno é selecionado entre  
5 o grupo constituído por agentes patogênicos mortos, agentes patogênicos vivos atenuados, subunidades protéicas e conjugados da mesma, toxinas inativadas, peptídeos sintéticos, carboidratos, antígenos e quaisquer combinações dos mesmos.

10 159. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é derivado do vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliovírus, *Neisseria meningitidis* C, *influenza*, Varicela, *Mycobacteria tuberculosis*, Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico,  
15 toxóide da difteria, e *Bordetella pertussis*.

160. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é uma combinação de imunógeno selecionada do grupo consistindo em DTaP, DTwP, DTwP hepB, DTP Hep B Hib, DTaP Hep B Hib IPV e quaisquer  
20 combinações dos mesmos.

161. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é vírus vivo, atenuado.

162. A composição do parágrafo 161, onde o vírus vivo

atenuado é um vírus envelopado.

163. A composição de acordo com o parágrafo 162, no qual o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*,  
5 *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdovirus*, *Retroviridae*, e quaisquer combinações dos mesmos.

164. A composição de acordo com os parágrafos 161 a 163, em que o vírus é varicela.

165. A composição de acordo com os parágrafos 161 a  
10 163, em que o vírus é o vírus da gripe.

166. A composição de acordo com o parágrafo 161, onde o vírus vivo, atenuado, provoca sarampo, caxumba ou rubéola.

167. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é um vírus vivo,  
15 atenuado, não envelopado.

168. A composição de acordo com o parágrafo 167, no qual o vírus não encapsulado é o rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, vírus da raiva ou vírus da poliomielite.

169. A composição de acordo com qualquer um dos  
20 parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é uma bactéria.

170. A composição de acordo com o parágrafo 169, no qual a bactéria é *Mycobacteria tuberculosis*, bacilo Calmette-Guérin ou *Bordetella pertussis*.

171. A composição de acordo com qualquer um dos

parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é uma subunidade bacteriana.

172. A composição de acordo com os parágrafos 171, em que a subunidade bacteriana é derivada de *Neisseria meningitidis* tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, ou *Streptococos* do grupo B.

173. A composição de acordo com o parágrafo 171, em que a subunidade bacteriana é um polissacarídeo.

174. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é uma subunidade viral.

175. A composição de acordo com o parágrafo 174, em que a subunidade viral é derivada do vírus da hepatite B ou papilomavírus humano.

176. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é recombinante.

177. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 158, em que o imunógeno é um produto de vacina selecionado do grupo consistindo em vacina contra o antraz (BioThrax); BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Tice, Mycobax); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP (Tripedia); DTaP/Hib (TriHIBit); DTaP-IPV (Kinrix); DTaP-HepB-IPV (Pediarix); DTaP-IPV/Hib (Pentacel), DT (vacina contra difteria mais vacina contra o tétano) (Sanofi), vacina Hib

(ACTHib), DT (Massachusetts), vacina Hib (PedvaxHIB), Hib/Hep B (Comvax); Hep A (Havrix), Vacina contra hepatite A, hepatite A (Vaqta), Vacina contra hepatite A, hepatite B (Engerix-B), vacina contra hepatite B, hepatite B (Recombivax), vacina contra hepatite B, HepA/Hepatite B vacina (Twinrix); Papilomavírus Humano (HPV) (Gardasil); vacina Influenza (Afluria); vacina Influenza (Fluarix); vacina Influenza (FluLaval); vacina Influenza (Fluvirin); vacina Influenza (Fluzone); vacina Influenza (FluMist);

5 vacina pneumocócica; IPV (Ipol), vacina contra a poliomielite, vacina contra a encefalite japonesa (JE-Vax); vacina contra encefalite japonesa (Ixiaro); vacina meningocócica (Menactra); vacina tríplice viral (MMR-II); vacina MMRV (ProQuad) (Pneumovax); vacina pneumocócica

10 (Prevenar); poliovírus inativado, vacina contra poliomielite (Poliovax); vacina antirrábica (Imovax); vacina antirrábica (RabAvert); vacina contra o rotavírus (pentavalente), a vacina contra o rotavírus (Rotarix); vacina Td (Decavac); Td vacina (Massachusetts); vacina DTaP (Adacel); vacina DTaP

15 (Boostrix); tifoide (inativada-Typhim Vi), vacina contra o tifo, febre tifoide (oral - Ty21a), vacina contra o tifo; Vaccinia (ACAM2000); Vacina contra a varicela (Varivax); vacina contra a febre amarela (YF-Vax); vacina zoster (Zostava), e quaisquer combinações destes.

20

178. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 177, em que a razão entre a matriz de fibroína de seda para o imunógeno é de cerca de 1:1.000 a cerca de 1.000:1.

5        179. Um método para preparação de uma composição imunogênica estável ao armazenamento de acordo com qualquer um dos parágrafos 139 a 178, o método compreendendo as etapas de:

10        a. provisão de uma solução de fibroína de seda que compreende pelo menos um imunógeno; e

15        b. secagem da solução de fibroína de seda da etapa (a) para formar uma fibroína de seda em estado sólido, obtendo-se assim uma composição imunogênica, em que o pelo menos um imunógeno retém pelo menos cerca de 30% da sua imunogenicidade original após armazenamento.

180. Método de acordo com o parágrafo 179, no qual a secagem é realizada por liofilização.

181. O método de acordo com o parágrafo 179, onde a secagem é realizada em ar seco.

20        182. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 181, compreendendo ainda a liofilização da fibroína de seda em estado sólido a partir da etapa (b).

183. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 182, compreendendo ainda o pós-tratamento da

composição.

184. O método de acordo com o parágrafo 183, em que o pós-tratamento altera a cristalinidade da composição.

185. O método de acordo com o parágrafo 183 ou 184, em  
5 que o pós-tratamento é realizado por contato com a composição com metanol ou etanol.

186. O método de acordo com qualquer dos parágrafos 183 a 185, em que o pós-tratamento é a sujeição da composição à tensão de cisalhamento.

10 187. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 183 a 186, em que o pós-tratamento é a sujeição da composição a um campo elétrico.

188. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 183 a 187, em que o pós-tratamento é a sujeição da composição  
15 a pressão.

189. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 183 a 188, em que o pós-tratamento, está em contato com a composição de sal.

190. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos  
20 179 a 189, compreendendo ainda a redução da fibroína de seda em estado sólido da etapa (b) por um dispositivo mecânico para obtenção de partículas micronizadas.

191. Método de acordo com o parágrafo 190, no qual os dispositivos mecânicos são selecionados a partir de



micronização, pulverização, trituração, moagem, liofilização ou qualquer combinação destes.

192. Método de acordo com o parágrafo 190 ou 191, em que as partículas micronizadas têm um tamanho de cerca de 10  
5 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

193. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 192, em que o pelo menos um imunógeno retém pelo menos cerca de 80% da sua imunogenicidade original após armazenamento.

10 194. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 193, em que o armazenamento é realizado por um período de pelo menos 6 meses.

195. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 194, em que o armazenamento é realizado a uma  
15 temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

196. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 179 a 195, em que o armazenamento é realizado a uma temperatura superior a 37°C.

20 197. Uma composição imunogênica compreendendo uma matriz de fibroína de seda, e pelo menos um vírus vivo, atenuado distribuído na mesma; em que o vírus vivo, atenuado retém pelo menos cerca de 30% da sua infecciosidade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de

congelamento-descongelamento, ou (b), mantida durante pelo menos 24 horas a uma temperatura acima de 0°C.

198. A composição de acordo com o parágrafo 197, em que o vírus retém pelo menos cerca de 50% da sua estabilidade infecciosa inicial.

199. A composição de acordo com o parágrafo 197 ou 198, em que o vírus retém pelo menos cerca de 80% da sua estabilidade infecciosa inicial.

200. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 199, em que a composição é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

201. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 200, em que a composição é mantida a uma temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

202. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 201, em que a composição é mantida a uma temperatura superior a 37°C.

203. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 202, em que a composição é liofilizada.

204. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 203, em que o vírus vivo, atenuado, é um vírus envelopado.

205. A composição de acordo com o parágrafo 204, em que

o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdovirus*, e quaisquer combinações dos mesmos.

5        206. A composição de acordo com o parágrafo 204 ou 205, no qual o vírus envelopado é varicela, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus do sarampo alemão, vírus sincicial respiratório, vírus da febre amarela ou o vírus da gripe.

10       207. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 203, em que o vírus vivo, atenuado é um vírus não envelopado.

208. A composição de acordo com o parágrafo 207, em que o dito vírus sem envelope é o rotavírus.

15       209. A composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 197 a 208, compreendendo ainda um aditivo.

210. A composição de acordo com o parágrafo 209, em que o aditivo é selecionado dentre o grupo que consiste em um agente estabilizador, um veículo farmacêuticamente aceitável e quaisquer combinações dos mesmos.

20       211. A composição de acordo com o parágrafo 210, em que o agente de estabilização é selecionado a partir do grupo consistindo em um sacarídeo, um álcool de açúcar, um íon, um agente tensoativo, e quaisquer combinações dos mesmos.

212. A composição de acordo com o parágrafo 211, em que

o dito sacarídeo é sacarose.

213. A preparação de vírus estabilizada, isenta de célula, compreendendo uma matriz de fibroína de seda e vírus infecciosos nela distribuídos, em que o vírus retém pelo  
5 menos cerca de 30% da sua infecciosidade original quando a preparação é (a) submetida a pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, ou (b) mantida pelo menos cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c) ambos (a) e (b).

10 214. A preparação do parágrafo 213, onde o vírus e a matriz de fibroína de seda são liofilizados.

215. A preparação de acordo com o parágrafo 213 ou 214, em que o vírus retém pelo menos cerca de 80% da sua infecciosidade inicial.

15 216. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 215, em que a preparação é mantida, pelo menos, por cerca de 6 meses.

217. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 216, em que a preparação é mantida a uma  
20 temperatura em torno da temperatura ambiente até cerca de 37°C.

218. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 217, em que a preparação é mantida a uma temperatura superior a 37°C.

219. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 218, em que o vírus é um vírus envelopado.

220. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 218, em que o vírus é o vírus sincicial  
5 respiratório.

221. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 218, em que o vírus é um vírus não envelopado.

222. A preparação de acordo com qualquer um dos  
10 parágrafos 213 a 218, em que o vírus é um bacteriófago.

223. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 218, em que o vírus é um vírus recombinante.

224. A preparação de acordo com qualquer um dos parágrafos 213 a 218, em que o vírus é um vetor viral.

15 225. A preparação do parágrafo 224, em que o vetor viral é selecionado dentre o grupo consistindo em um vetor retroviral, um vetor lentiviral, um vetor adenoviral, um vetor viral adeno-associado e quaisquer combinações dos mesmos.

20 226. Uma preparação que compreende pelo menos uma composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 80, 139 a 178 ou 197 a 212.

227. A preparação de acordo com o parágrafo 226, em que a preparação é selecionada a partir de um grupo que consiste

em um comprimido, uma pastilha, uma suspensão, um pó que escoa livremente, um aerossol, uma cápsula, e quaisquer combinações desses.

228. A preparação de acordo com qualquer um dos  
5 parágrafos 226 a 227, compreendendo ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

229. Uma embalagem que compreende pelo menos uma composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 80, 139 a 178 ou 197 a 212, ou uma preparação de acordo com  
10 qualquer um dos parágrafos 213 a 225 ou 226-228.

230. O pacote de acordo com o parágrafo 229, em que o recipiente é selecionado a partir de um grupo consistindo em um frasco, uma ampola, uma cápsula, um tubo, uma seringa, um frasco, um pacote e quaisquer combinações dos mesmos.

15 231. O pacote de acordo com o parágrafo 230, no qual a seringa é sem agulha.

232. Um kit que compreende o pacote de acordo com qualquer um dos parágrafos 229 a 231, e uma solução farmaceuticamente aceitável.

20 233. O kit de acordo com o parágrafo 232, que compreende ainda, pelo menos, uma seringa.

234. O kit de acordo com o parágrafo 232 ou 233, que compreende ainda um desinfetante.

235. Um dispositivo de distribuição que compreende:

pelo menos uma câmara com uma saída, em que pelo menos uma câmara compreende uma quantidade pré-determinada de composição de acordo com qualquer um dos parágrafos 41 a 80, 139 a 178 ou 197 a 212 e a saída fornece uma saída para a  
5 composição.

236. O dispositivo de acordo com o parágrafo 235, em que o dispositivo de liberação é selecionado dentre o grupo que consiste em uma seringa, um injetor de pó seco, um spray nasal, um nebulizador, um implante e quaisquer combinações  
10 dos mesmos.

237. O dispositivo de acordo com o parágrafo 235, em que o implante é um microchip.

238. O dispositivo de acordo com qualquer um dos parágrafos 235 a 237, compreendendo ainda um acionador para  
15 controlar a liberação da composição através da saída.

Na medida em que não tenha sido indicado, deve ser entendido por aqueles versados na técnica que qualquer uma das várias modalidades descritas no presente documento e ilustradas podem ser ainda modificadas para incorporar  
20 características mostradas em qualquer das outras modalidades reveladas no presente documento.

Os exemplos que se seguem ilustram algumas modalidades e aspectos da invenção. Será evidente aos versados na técnica que várias modificações, adições, substituições e

semelhantes podem ser realizadas sem alterar o espírito ou âmbito da invenção, e que tais modificações e variações são abrangidas no âmbito da invenção tal como definida nas reivindicações que se seguem. Os exemplos a seguir não  
5 limitam de qualquer forma a invenção.

### **EXEMPLOS**

#### ***Exemplo 1. Estabilidade da vacina de MMR em fibroína de seda***

Uma batelada comercial de vacina trivalente, MMR® II  
10 (vacina do vírus vivo de sarampo, caxumba e rubéola vivo) (Merck & Co., Inc., USA) foi utilizada. Essa vacina de vírus vivo, liofilizada, contém vírus do sarampo da cepa Enders' Edmonson atenuada, cepa Leryl Lynn do vírus da caxumba e o vírus da rubéola da cepa Wistar RA 27/3. Antes do uso, a  
15 vacina é reconstituída no diluente fornecido e cada dose de 0,5 mL contém não menos que 1.000 TCID<sub>50</sub> (dose infecciosa de cultura de tecidos) do vírus do sarampo; 12.500 TCID<sub>50</sub> do vírus da caxumba, e 1.000 TCID<sub>50</sub> do vírus da rubéola. As condições de fabricação dizem que a vacina

20 deve ser utilizada dentro de 8 horas após a reconstituição e armazenada a 4°C ou de outra forma ser descartada. Cada dose da vacina é calculada para conter sorbitol (14,5 mg), fosfato de sódio, sacarose (1,9 mg), cloreto de sódio, gelatina hidrolisada (14,5 mg), albumina



humana recombinante ( $\leq 0,3$  mg), soro bovino fetal ( $<1$  ppm), outro tampão e ingredientes dos meios e cerca de 25 mg de neomicina. O produto não contém conservantes. Antes da reconstituição, a vacina liofilizada é um tampão cristalino compacto amarelo claro.

Uma mistura de solução de seda esterilizada a 9% (peso/volume) e a vacina MMR reconstituída foi preparada em uma concentração de 1:1 em peso de MMR para solução de seda. As películas foram então moldadas sobre uma superfície revestida de Teflon. As películas foram secas em uma capela estéril durante 24 horas à temperatura ambiente (RT). Uma amostra da vacina reconstituída em solução durante 24 horas foi também preparada para comparação.

Uma curva padrão foi gerada por reconstituição da vacina, considerada como diluição de  $1 \log_{10}$ , e a solução de vacina foi em seguida diluída serialmente nas etapas  $0,5 \log_{10}$  de  $1,5 \log_{10}$  a  $3,5 \log_{10}$ . As películas de seda foram redissolvidas em uma alíquota de água que dilui a concentração final de vacina em solução a  $1,5 \log_{10}$ . As células Vero (células de rim de macaco verde africano, ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas até a confluência, tripsinizadas, contadas e ajustadas a 50.000 células/mL e semeadas em uma placa de 24 poços. Em seguida, 50  $\mu$ L da diluição da vacina, película de seda redissolvida, e vacina

reconstituída armazenada por 24 horas foram adicionados a um poço de células Vero, em triplicata. O vírus foi replicado na célula durante 3 dias, em seguida, o RNA das células infectadas foi isolado, convertido em DNAc e quantificado utilizando qPCR. Existe uma relação log-linear entre a quantidade de RNA alvo e o ciclo de PCR em que a fluorescência aumenta acima do fundo (ciclo limite Ct). Quanto mais viável os vírus que estão presentes na amostra, mais baixo o valor de Ct.

Os resultados do ensaio de infecciosidade qPCR mostram uma relação linear entre o aumento da diluição da vacina e o valor maior de Ct (figura 1). O ensaio produziu os resultados esperados, uma vez que a diluição baixa da vacina continha uma maior quantidade de vírus viáveis, portanto, produzindo um valor de Ct menor. Usando este resultado como uma curva padrão, os resultados para a amostra de vacina de seda encapsulada e amostra de vacina reconstituída podem ser quantificados por extrapolação da diluição de  $\log_{10}$  final de seus valores de Ct.

Os valores de diluição de  $\log_{10}$  foram então convertidos em valores de potência de  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/dose. Os valores de  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/dose de MMR em películas de seda foram então relacionados ao  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/dose da diluição original no qual eles foram fundidos (diluição 1,  $\log_{10}$ ) produzindo a potência

residual. A vacina de controle reconstituída armazenada à temperatura ambiente por 24 horas não produziu valores Ct, indicando que ela tinha perdido quase, se não toda a sua potência. As potências iniciais recuperadas de MMR em  
 5 películas de seda para sarampo, caxumba e rubéola foram de 75,89%, 58,04% e 62,48%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Recuperação da potência inicial de 1:1 (peso/peso) de MMR em películas de seda.

	Recuperação da Potência inicial ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /dose) (%)
Sarampo	75,89
Caxumba	58,04
Rubéola	52,48

10 Essa é uma melhoria substancial em relação à vacina de controle reconstituída, armazenada à temperatura ambiente durante o mesmo período de tempo, para a qual a potência residual estava abaixo do limite inferior de detecção. A perda inicial de potência na vacina embutida em seda foi  
 15 provavelmente causada por reconstituição da vacina liofilizada durante a preparação das películas, em vez do efeito das interações da vacina com a seda. Para demonstrar que a perda de atividade mais provável ocorreu enquanto a MMR em seda ainda estava na solução antes da secagem completa  
 20 das películas, alíquotas de vacina liofilizada foram reconstituídas em água por 24, 18, 12 e 6 horas à temperatura

ambiente antes da inoculação das células (figura 2).

Como pode ser vista na figura 2, a potência da vacina diminui significativamente o tempo que permanece na solução. As amostras de vacina na solução durante 24 horas antes da inoculação das células não exibiram potência residual para qualquer dos componentes virais. Uma vez que as películas foram secas e armazenadas, a seda exibiu um efeito estabilizador sobre a vacina. Como pode ser visto na figura 3, depois de 3 meses de armazenamento à temperatura ambiente, as películas de seda retiveram 96%, 92% e 80% de potência para o vírus do sarampo, caxumba e rubéola, respectivamente. Os resultados indicam que as vacinas MMR armazenadas apenas em películas de seda não processadas são capazes de expandir a potência da vacina liofilizada comercialmente preparada à temperatura ambiente.

#### *Exemplo 2. Adição de aditivos*

Foi examinado o fato da adição de aditivos estabilizantes aumentar ainda mais a estabilidade térmica do vírus. A vacina contra o vírus da poliomielite oral (OPV), também uma vacina viva atenuada, tem sido amplamente estudada e foi preparada comercialmente, com a adição de estabilizador  $MgCl_2$ . Estudos sobre os efeitos dos aditivos estabilizantes OPV foram conduzidos e estabilizadores previamente testados incluem a sacarose, sulfato de magnésio e cloreto de magnésio

(Mirchamsy e outros, 1978; Rapp e outros, 1965). A MMR em películas de seda foi então preparada a partir de soluções de MMR, seda e estabilizante. A recuperação inicial de MMR em películas de seda estabilizadas com 1M de  $MgCl_2$ , 1M  $MgSO_4$  e 70% de sacarose é mostrada na figura 4. Embora  $MgCl_2$  seja um excelente estabilizador para OPV, teve efeitos de estabilização negativos sobre o sarampo, caxumba e rubéola.  $MgSO_4$  proporcionou a melhor estabilização do componente de vacina do sarampo, mas pouco efeito sobre a caxumba e teve efeitos negativos sobre a rubéola. A sacarose, no entanto, agiu como um estabilizador para todos os três componentes da vacina MMR. Além disso, a recuperação inicial dos componentes virais estabilizados em sacarose mostra uma melhoria sobre a recuperação inicial de MMR apenas em películas de seda (Tabela 1). Além disso, a reconstituição da vacina em solução de sacarose a 70% em RT (figura 5) demonstrou maior potência viral mantida ao longo de 24 horas que a vacina reconstituída em água à temperatura ambiente (figura 2). Em comparação com a vacina MMR reconstituída em água, a vacina reconstituída em 70% de sacarose, também proporcionou melhor estabilidade em 4°C e 37°C (figura 6). O emprego de aditivos estabilizadores, tais como, sacarose pode minimizar a perda de atividade inicial da vacina, durante a preparação da película. A sacarose pode estabilizar a vacina durante o

processo de secagem da película, enquanto a MMR e seda estão ainda na solução.

*Exemplo 3. Estabilização a longo prazo da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola*

5        Nós mostramos que a vacina aprisionada nas películas de seda e películas de seda liofilizadas são significativamente aperfeiçoadas em termos de meia-vida em temperaturas de armazenamento de até 45°C. Na presença de seda a taxa de degradação das proteínas virais é reduzida. A caracterização  
10    biofísica demonstrou que a seda proporciona estabilidade estrutural para a vacina através da redução de umidade residual durante o armazenamento e o aumento do ponto de fusão das proteínas virais. Assim, nós apresentamos um sistema de estabilização de vacina capaz de estender a  
15    potência da vacina sem a necessidade de refrigeração. A seda pode ser moldada em uma variedade de sistemas de distribuição, incluindo películas, hidrogéis, microesferas e microagulhas, capazes de serem adaptadas para a estabilização e necessidades de distribuição específicas.  
20    Este sistema de material pode ser utilizado *ex vivo* ou *in vivo* como veículos de distribuição devido à biocompatibilidade e histórico aprovado pela FDA do emprego da seda em dispositivos biomédicos.

**Atividade residual da vacina após imobilização em**

### películas de seda

As películas de seda foram preparadas com uma razão em peso de vacina de seda de 1:1. A potência recuperada inicial da vacina foi determinada diretamente após as películas terem sido preparadas para determinar quanta infectividade da vacina foi perdida durante o processo de fabricação de película. De modo a incorporar a vacina na solução de seda, a vacina liofilizada deve ser reconstituída. A vacina liofilizada foi reconstituída imediatamente antes da inoculação das células. Uma vez que a vacina liofilizada tenha sido reconstituída, a potência diminui rapidamente (Galazka, 1998; WHO 2006) e de acordo com as especificações do fabricante, a vacina MMR deve ser utilizada dentro de 8 horas após a reconstituição ou de outro modo descartada. Uma vez completamente secas, as películas que contêm a mesma quantidade de vacina liofilizada, foram dissolvidas em água esterilizada e a solução foi adicionada às células Vero para o teste de potência. Os resultados de potência das películas de seda foram comparados com a potência da vacina liofilizada para estabelecer uma potência recuperada inicial. A potência residual inicial observada da MMR em películas de seda é resumida na Tabela 2 com 84,7%, 73,9%, e 87,0% de potência residual da vacina contra o sarampo, caxumba, rubéola e componentes, respectivamente.

Tabela 2. Comparação da potência viral recuperada inicial das películas de seda que encapsulam vacina e películas de seda liofilizadas

Forma da seda na vacina	Componente viral	Potência inicial (%)	recuperada
MMR em película de seda	Sarampo	84,7 ± 6,40	
	Caxumba	73,9 ± 2,24	
	Rubéola	87,0 ± 2,23	
MMR em película de seda liofilizada	Sarampo	94,7 ± 0,34	
	Caxumba	89,6 ± 1,30	
	Rubéola	98,4 ± 0,35	

5 Películas de seda que encapsulam vacina suficientes foram fabricadas com este método de secagem ao ar e armazenadas durante um estudo de 6 meses para avaliar a estabilidade a longo prazo, em quatro temperaturas diferentes (4°C, 25°C, 37°C e 45°C). No entanto, a hipótese

10 de que a maior parte da perda de potência viral, observada com as películas ocorreu enquanto a MMR em seda estava na solução para o processo de preparação. Para verificar essa hipótese, a vacina liofilizada foi reconstituída nos diluentes fornecidos pelo fabricante e as soluções foram

15 armazenadas a 4°C, 25°C e 37°C (figura 8A-8C). Medições de potência foram realizadas após 6 horas, 12 horas, 18 horas e 24 horas após a reconstituição. Como previsto, a vacina perde rapidamente a potência dentro de horas em solução e armazenamento em temperaturas mais elevadas resultando em um



declínio mais rápido da potência. Em comparação com o tempo de secagem das películas, em 12 horas na solução a 4°C, 53,4%, 73,4%, 76,3% de potência residual permanecem para os componentes de sarampo, caxumba e rubéola, respectivamente.

5 Ao fim de 12 horas a 25°C, apenas 57,8%, 53,1%, 46,6% de potência residual de sarampo, caxumba, rubéola permaneceram, respectivamente. Uma redução mais dramática foi observada para a vacina reconstituída durante 12 horas a 37°C como apenas 36,5%, 46,6% e 23,9% de potência contra sarampo, 10 caxumba e rubéola foram recuperados, respectivamente. Com base nestes resultados, foi postulado que a redução do tempo em que a vacina inicial permaneceu em solução poderia melhorar a recuperação. Portanto, MMR em películas de seda liofilizadas foi preparada para encurtar o estágio da solução 15 de MMR em seda. O processo de liofilização melhorou significativamente a estabilidade térmica da vacina a longo prazo nas películas de seda. Como mostrado na Tabela 2, em comparação com a potência inicial recuperada das películas de seda secas ao ar, as películas liofilizadas melhoraram a 20 recuperação do sarampo, caxumba e rubéola, para 94,7%, 89,6%, 98,4%, respectivamente.

#### **Termoestabilidade das películas de seda que encapsulam vacina**

A estabilidade da vacina foi quantitativamente expressa

como a potência residual observada das películas após o armazenamento. A potência residual foi medida e comparada com a potência residual inicial (Tabela 2), para demonstrar a estabilidade da vacina. Quando da medição da potência residual de todos os componentes virais da vacina armazenada em películas de seda ao longo de seis meses, com a exceção do armazenamento a 4°C, a tendência geral mostrou que as películas de seda melhoraram a estabilização das partículas virais do sarampo, caxumba e rubéola, por exibição de potências mais elevadas quando em comparação com a vacina liofilizada do fabricante armazenada à mesma temperatura. As figuras 9A-9D mostram a comparação da potência residual do componente de sarampo da vacina para películas de seda e a vacina MMR em pó liofilizada armazenada durante seis meses a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C. Com exceção do armazenamento a 4°C, as películas de seda mostraram maior potência residual da vacina. Mesmo a 4°C, a potência residual das películas de seda foi semelhante a de MMR em pó. Enquanto a potência residual do pó não flutue, as películas de seda exibiram maior variação na potência medida nessa temperatura. Durante os primeiros 3 meses, as películas de seda superaram o pó com maior potência residual recuperada. Nos últimos 3 meses, as películas de seda exibiram um ligeiro decréscimo na potência residual, enquanto que o pó permaneceu

relativamente constante. No final do estudo de seis meses, a potência residual do componente contra o sarampo da vacina MMR armazenada nas películas de seda foi de 87,2% em comparação com 92,2% para o pó. As películas de seda, no  
5 entanto, mostram melhor potência residual contra sarampo quando armazenadas a 25°C, 37°C e 45°C. Quando armazenadas a 25°C, as películas de seda mostraram maior potência recuperado em cada ponto de tempo e no final do período de seis meses apresentaram 83,9% de potência em comparação com  
10 recuperado de 74,5% para o pó.

A estabilização fornecida pela seda foi ainda mais evidente para as películas e pó armazenados em temperaturas elevadas, 37°C e 45°C. Em temperatura de 37°C, as películas de seda mostraram uma melhoria dramática na estabilidade da  
15 infectividade do sarampo através do curso de seis meses, resultando em 56,5% de potência recuperada em comparação com 9,9% a partir do pó. No caso das películas e pó armazenados a 45°C, o componente de sarampo da vacina perdeu toda a potência, após 20 semanas de armazenamento, enquanto as  
20 películas de seda mantiveram uma atividade de 53,5% após 24 semanas. Tendências semelhantes foram apresentadas para ambos os componentes da caxumba (figuras 10A-10D) e componentes da rubéola (figura 11A-11D). Novamente, semelhante aos resultados para o componente do sarampo, as

películas de seda exibiram mais estabilização do componente de caxumba a 37°C e 45°C. Em ambas as temperaturas, as películas de seda exibiram um ligeiro decréscimo da atividade residual durante o primeiro mês de armazenamento, porém após 5 o primeiro mês, a diminuição na potência residual foi muito mais lenta que a redução da atividade da vacina do pó armazenado. Na conclusão do estudo, as películas de seda armazenadas a 37°C retiveram 61,3% da infectividade da caxumba, enquanto o pó reteve 13,0%. Após 6 meses de 10 armazenamento a 45°C, as películas de seda recuperaram 59,6% da potência da caxumba, enquanto o pó perdeu toda a potência após 20 semanas. O componente de rubéola exibiu tendências semelhantes em potência. Para as películas de seda armazenadas a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C, 88,4%, 78,4%, 60,3% e 15 58,3% de potência residual foram recuperados, respectivamente. Com a exceção dos pós armazenadas a 4°C, estes resultados mostram que a seda forneceu estabilização melhorada e manutenção da potência sobre o pó. A potencia residual do pó a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C foi de 89,4%, 56,3%, 20 15,3% e 0%, respectivamente.

Embora as películas de seda liofilizadas fossem inicialmente preparados para melhorar a recuperação inicial da vacina perdida durante o processo de fabricação da película, elas forneceram ainda maior estabilização das

vacinas em temperatura elevada. A potência residual dos componentes de sarampo, caxumba e rubéola armazenados nas películas de seda liofilizados é mostrada nas figuras 12A-12D, 13A-13E e 14A-14D, respectivamente. Independentemente da temperatura de armazenamento, as películas liofilizadas forneceram níveis comparáveis de estabilização para todos os componentes da vacina. Enquanto as películas de seda liofilizadas mostraram estabilização melhorada e potência residual recuperada em todas as temperaturas, o nível de estabilização foi mais dramático nas temperaturas mais elevadas. Após 6 meses de armazenamento, as películas de seda liofilizadas retiveram 85,2% e 85,1% da potência residual do sarampo a 37°C e 45°C, respectivamente. Da mesma forma, 86,2% e 86,0% da potência da caxumba permaneceram após 6 meses, quando armazenadas a 37°C e 45°C, respectivamente. O componente de rubéola pareceu ser mais estabilizado pelas películas de seda liofilizadas, uma vez que 88,2% da potência viral permaneceram após 6 meses de armazenamento a 37°C, enquanto que o armazenamento a 45°C ainda resultou na retenção de 87,5% da potência viral.

#### **Avaliação da termoestabilidade pela cinética de degradação**

A taxa de degradação,  $k_{obs}$ , para cada temperatura foi calculada por regressão linear da gota  $\log_{10}$  de titulação do

vírus contra o tempo de exposição em semanas. As inclinações das curvas resultantes representam as taxas de degradação. As meias-vidas do vírus ( $t_{1/2}$ ) em cada temperatura e o respectivo intervalo de confiança de 95% foram calculados a partir dos  $k_{obs}$  e os seus erros padrões. A meia vida do vírus é a meia-vida prevista ou tempo necessário para a potência média diminuir para 50% do valor inicial. As taxas de degradação estimadas e meias-vidas correspondentes para cada componente viral e método de encapsulamento de vacina estão resumidos na Tabela 3 e as meias-vidas foram representadas em função da temperatura na figuras 16A-16C. As taxas de degradação dos três sistemas em relação à faixa de temperaturas testadas também se ajustaram bem no gráfico de Arrhenius (figuras 14A-15C). Como pode ser visto a partir do gráfico, os valores para a inclinação da forma de vacina em pó foram consistentemente mais elevados que os de ambos sistemas de seda, o que indica as taxas de degradação do pó cresceram mais rapidamente com o aumento da temperatura de armazenamento.

Tabela 3. Sumário das taxas de degradação e meias vidas previstas da vacina em pó e vacinas encapsuladas em película de seda e película de seda liofilizada

Sarampo					
Temperatura	Sistema	de	Taxa	de	Meia-vida prevista, $t_{1/2}$
a (°C)	vacina		degradação,	$k_{obs}$	(semanas) (Limite

		(log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /semanas)	inferior, superior)		
4	Pó	0,009 ± 0,0005	178,6	semanas	(169,2, 197,4)
	Películas	0,0136 ± 0,0025	96,6	semanas	(81,6, 126,6)
	Películas liofilizadas	0,009 ± 0,0001	135,3	semanas	(133,8, 138,3)
25	Pó	0,0331 ± 0,0037	47,1	semanas	(42,4, 56,6)
	Películas	0,0123 ± 0,0002	100,8	semanas	(99,1, 104,0)
	Películas liofilizadas	0,0098 ± 0,0013	123,8	semanas	(109,8, 151,8)
37	Pó	0,1287 ± 0,0004	9,4	semanas	(9,4, 9,5)
	Películas	0,0458 ± 0,0034	21,9	semanas	(20,4, 25,0)
	Películas liofilizadas	0,0131 ± 0,0008	93,8	semanas	(88,4, 104,6)
45	Pó	0,139 ± 0,0261	5,1	semanas	(4,3, 6,7)
	Películas	0,0401 ± 0,0010	19,8	semanas	(19,4, 20,8)
	Películas liofilizadas	0,0128 ± 0,0019	94,9	semanas	(82,6, 119,4)
<b>Caxumba</b>					
Temperatura (°C)	Sistema de vacina	Taxa de degradação, (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /semanas)	de k <sub>obs</sub>	Meia-vida prevista, t <sub>1/2</sub> (semanas)	(Limite inferior, superior)
4	Pó	0,0173 ± 0,0005	102,3	semanas	(99,4, 108,0)
	Películas	0,0302 ± 0,005	51,3	semanas	(44,0, 65,9)
	Películas liofilizadas	0,0091 ± 0,0018	152,1	semanas	(127,0, 202,3)
25	Pó	0,0677 ± 0,0001	26,5	semanas	(26,5, 26,6)
	Películas	0,0408 ± 0,0056	34,3	semanas	(30,2, 42,6)
	Películas liofilizadas	0,0106 ± 0,0005	129,3	semanas	(123,5, 140,4)
37	Pó	0,1435 ± 0,0052	10,7	semanas	(10,3, 11,5)
	Películas	0,0439 ± 0,001	25,7	semanas	(25,1, 26,8)
	Películas liofilizadas	0,0129 ± 0,0025	106,0	semanas	(88,8, 140,4)
45	Pó	0,1967 ± 0,0357	8,2	semanas	(6,9, 10,7)
	Películas	0,0384 ± 0,0021	28,6	semanas	(27,1, 31,6)
	Películas liofilizadas	0,0121 ± 0,0027	111,9	semanas	(91,5, 152,7)
<b>Rubéola</b>					
Temperatura (°C)	Sistema de vacina	Taxa de degradação, (log <sub>10</sub>	de k <sub>obs</sub>	Meia-vida prevista, t <sub>1/2</sub> (semanas)	(Limite inferior, superior)

		TCID <sub>50</sub> /semanas)			
4	Pó	0,0119 ± 0,0022	124,5	semanas	(105,1, 163,3)
	Películas	0,0101 ± 0,0012	123,6	semanas	(110,5, 149,9)
	Películas liofilizadas	0,0036 ± 0,0001	383,7	semanas	(373,3, 404,4)
25	Pó	0,0521 ± 0,0021	29,5	semanas	(28,3, 31,8)
	Películas	0,022 ± 0,0024	56,8	semanas	(51,2, 68,0)
	Películas liofilizadas	0,0121 ± 0,0012	117,3	semanas	(106,7, 138,5)
37	Pó	0,1192 ± 0,0006	10,9	semanas	(10,8, 11,0)
	Películas	0,0387 ± 0,0004	28,9	semanas	(28,6, 29,5)
	Películas liofilizadas	0,0144 ± 0,0037	99,3	semanas	(79,0, 139,8)
45	Pó	0,1681 ± 0,0298	8,2	semanas	(6,9, 10,6)
	Películas	0,0387 ± 0,0003	27,3	semanas	(27,1, 27,7)
	Películas liofilizadas	0,0144 ± 0,0025	97,1	semanas	(82,8, 125,9)

Com exceção das amostras armazenadas a 4°C, os sistemas de vacina encapsulados em seca e seda liofilizada exibiram taxas de degradação mais baixas em relação à vacina em pó a 25°C, 37°C e 45°C para os componentes do sarampo, caxumba e rubéola. As taxas de degradação diminuídas correspondem a um aumento nas meias-vidas previstas. A partir da tabela, as tendências parecem semelhantes para todos os componentes virais e mostram que em temperaturas elevadas, as películas de seda aumentaram as meia-vidas da vacina através da formulação de pó, com as películas de seda liofilizadas que mostram melhorias dramáticas nas meias-vidas das vacinas em relação as em pó e películas de seda. Além disso, como a temperatura de armazenamento foi aumentada, as taxas de



degradação e de meia-vida prevista aumentaram e reduziram significativamente, respectivamente, tanto para o pó e as formulações de película de seda. As amostras de película de seda liofilizadas, no entanto, mantiveram taxas de

5 degradação lenta mantida em todas as temperaturas de armazenamento testadas. Avaliando a alteração na taxa de degradação do componente do sarampo de 4°C para 45°C, a vacina em pó exibiu um aumento de 1,444% na taxa de degradação de  $0,0136 \pm 0,0025$  para  $0,0401 \pm 0,0010 \log_{10}$

10 TCID<sub>50</sub>/semanas, enquanto MMR em película de seda e MMR em película de seda liofilizada tiveram um aumento de 195% a partir de  $0,0139 \pm 0,0261$  para  $0,009 \pm 0,0005 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/semanas e 42% de aumento de  $0,0128 \pm 0,0019$  para  $0,009 \pm 0,0001 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/semanas na taxa de degradação em relação

15 à faixa de temperatura, respectivamente. Os componentes de caxumba e rubéola apresentam tendências semelhantes. Com exceção do armazenamento a 4°C os dados da vacina em pó mostram uma meia-vida prevista do sarampo de 178,6 semanas, maior que as 96,6 semanas para as películas de seda e as

20 135,3 semanas das películas de seda liofilizadas, as películas de seda e as películas de seda liofilizadas exibiram um aumento muito mais dramático na meia-vida do vírus em temperaturas elevadas. A diferença é especificamente evidente na meia-vida prevista do vírus a

37°C e 45°C. A 35°C, as 21,9 semanas de meia-vida das películas de seda foram uma melhoria significativa em relação às 9,4 semanas providas pelo pó, mas as películas de seda liofilizadas aumentaram drasticamente a meia-vida para 93,8  
5 semanas. O armazenamento a 45°C proporcionou resultados semelhantes aos do pó, as películas de seda e películas de seda liofilizadas mostraram uma meia-vida de 5,1, 19,8 e 94,9 semanas, respectivamente.

A dependência da temperatura das taxas de degradação da  
10 vacina foi ainda avaliada utilizando análise de regressão. A partir do gráfico de queda da titulação do vírus contra o tempo (não mostrado) para o pó, sistemas de película de seda e película de seda liofilizada, os dados podem ser razoavelmente aproximados por uma linha reta, exibindo um  
15 pseudo comportamento de ordem zero. O gráfico da queda de titulação do vírus contra o tempo corresponde e exhibe tendências similares às curvas de potência residual.

Como pode ser visto a partir do gráfico, uma resposta linear de alteração na concentração viral sugere que o  
20 mecanismo de degradação segue uma cinética de ordem zero. Embora empregando uma análise mais cuidada dos dados, a linearidade da queda da titulação do vírus contra o tempo diminui em intervalos de tempo longos. Estes dados sugerem que a taxa de degradação pode se desviar de um comportamento

de ordem zero e diminuir durante longos períodos de tempo. O modelo de cinética de degradação da vacina ao longo do tempo é, por conseguinte, considerado como um modelo de pseudo-ordem zero. Pseudo ordens de reação são encontradas em estudos de estabilidade do medicamento como apenas a variação da concentração do ingrediente farmacêutico ativo é normalmente monitorizada ao longo do tempo, enquanto que outros reagentes e componentes de tampão se apresentam em grande excesso, embora não analisado (Zhou e outros, 2009).

Assim, uma reação de primeira ordem pode parecer ser uma reação de ordem zero ou de pseudo-ordem zero. Nas reações de ordem zero, a taxa de reação não depende da concentração do reagente e é constante. A equação de taxa de ordem zero é a seguinte:

$$-\frac{dC}{dt} = k_{obs}$$

e os dados obtidos em cada temperatura foram ajustados usando a equação que se segue:

$$\frac{C_t}{C_0} = -k_{obs}t$$

onde  $C_t$  é a potência medida no  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub> no tempo  $t$ ,  $C_0$  é a potência medida no tempo zero,  $k_{obs}$  é a taxa de degradação determinada pela egressão linear e  $t$  é o tempo de armazenamento em semanas. A meia vida prevista,  $t_{1/2}$  é o tempo

necessário para a potência média diminuir para 50% do valor inicial. A meia-vida para cada temperatura foi estimada pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k_{obs}}$$

5        As taxas de degradação térmica dos três sistemas de vacina poderiam seguir a expressão da lei de Arrhenius com relação à temperatura absoluta conforme mostrado na equação que se segue:

$$k(T) = Ae^{-E/RT}$$

10        onde k é a taxa de degradação térmica, A é o fator pré-exponencial, E é a energia de ativação, R é a constante de gás e T é a temperatura absoluta. Um gráfico das taxas de degradação contra a recíproca da temperatura absoluta pode mostrar as tendências de degradação dependentes da

15        temperatura por amplas faixas de temperatura. Os gráficos de Arrhenius mostram que a vacina em pó tem a inclinação mais acentuada, o que indica um aumento da dependência da temperatura de degradação em relação a ambos os sistemas de seda. Por comparação, os declives mais rasos dos sistemas de

20        seda demonstrar que a seda reduz muito a taxa de degradação da vacina em temperaturas elevadas e é capaz de manter a potência da vacina em temperaturas ambientes elevadas. Como pode ser visto na comparação da meia-vida dos três sistemas

de vacinas, a melhoria das meias-vidas dos sistemas de seda tornar-se mais evidente e dramática como o aumento da temperatura de armazenamento.

#### **Efeito das condições de processamento em umidade residual dos sistemas de vacina**

A vacina MMR é fornecida na forma liofilizada e a presença de estabilizantes na vacina para reduzir o teor de umidade tem melhorado significativamente a sua estabilidade térmica (Galazka e outros, 1998). A vida útil das vacinas liofilizada depende tanto da aderência à cadeia de resfriamento quanto da manutenção de um baixo teor de umidade residual. Conforme a temperatura de armazenamento aumenta, o mesmo acontece com a quantidade de água presente no ar. A MMR em películas de seda foi fabricada e seca ao ar em condições ambientes, portanto, tinha uma umidade residual inicial mais elevada que ambas a MMR em pó liofilizada e MMR em películas de seda liofilizadas. A umidade residual da MMR em película de seda calculada imediatamente após a determinação de um estado seco foi determinada como sendo  $4,42\% \pm 0,65\%$ . A umidade residual da MMR em pó e MMR em películas de seda liofilizadas foi calculada como sendo  $2,39\% \pm 0,23$  e  $1,89\% \pm 0,13$ , respectivamente. Com a exceção das MMRs em películas de seda, o armazenamento dos sistemas de vacina liofilizada depois de seis meses a  $4^{\circ}\text{C}$  produziu uma

mudança muito pequena na umidade residual. Na verdade, a umidade residual das películas armazenadas e liofilizadas durante seis meses em todos os pontos de temperatura exibiu muito pouca aberração do valor medido inicialmente, exibindo apenas um aumento líquido de 6,9% em umidade residual a partir do valor inicial para o valor mais alto registrado em 45°C. Devido às condições de processamento, as MMRs em películas de seda apresentaram umidade residual maior, mas o aumento líquido para o valor mais alto de umidade residual registrado em seis meses de armazenamento a 45°C foi de apenas 30,1% em comparação com o aumento de 61,5% mostrado no sistema de MMR em pó. O teor de umidade residual dos sistemas de vacina correspondeu à potência residual. Em temperaturas elevadas, a MMR em pó exibiu maiores perdas de potência que as películas de seda, correlacionando bem com o maior aumento da umidade residual. Do mesmo modo, o aumento mínimo de umidade residual das MMRs em películas de seda liofilizadas resultou em uma maior retenção de potência viral.

Tabela 4. Comparação das umidades residuais de MMR em pó, MMR em películas de seda e MMR em películas de seda liofilizadas em condições específicas de armazenamento.

Sistema de vacina	Condição armazenamento	de Umidade residual (%)
MMR em pó	Em t=0	

MMR em películas de seda liofilizadas	(Condição inicial)	2,39±0,23
	Após 6 meses a 4°C	2,37±0,15
	Após 6 meses a 25°C	2,73±0,54
	Após 6 meses a 37°C	3,52±0,35
	Após 6 meses a 45°C	3,86±0,28
	Em t=0	1,89±0,13
MMR em películas de seda	(Condição inicial)	
	Após 6 meses a 4°C	1,81±0,20
	Após 6 meses a 25°C	1,97±0,43
	Após 6 meses a 37°C	1,83±0,35
	Após 6 meses a 45°C	2,02±0,52
	Em t=0	4,42±0,65
	(Condição inicial)	
	Após 6 meses a 4°C	5,26±0,51
	Após 6 meses a 25°C	5,47±0,53
	Após 6 meses a 37°C	5,53±0,70
	Após 6 meses a 45°C	5,75±0,91

### Caracterização estrutural de sistemas de vacina em seda

De modo a investigar como a seda forneceu termoestabilidade aperfeiçoada às vacinas foram estudadas medidas físicas utilizando calorimetria e espalhamento de luz. DSC (Figura 17) foi utilizada para demonstrar que o encapsulante de seda forneceu estabilização à por aumento na transição vítrea ( $T_g$ ) da vacina. A DSC de estado sólido de películas de seda liofilizadas mostrou uma  $T_g$  em 178°C. O termograma de DSC de MMR em pó mostrou uma  $T_g$  de 68,9°C, enquanto que a MME em películas de seda liofilizadas mostrou uma  $T_g$  de 89,2°C, bem como dois picos a 116,6°C e 164,8°C, o que poderia indicar uma  $T_m$ , temperatura de fusão e  $T_d$ , temperatura de degradação. Não está claro se o deslocamento da  $T_g$  foi devido à estabilização estrutural pela seda ou interação entre a seda e os vários excipientes presentes na amostra da vacina. A vacina foi, então, purificada para

remover os excipientes adicionados. A solução resultante continha partículas virais purificadas suspensas em água isenta de nuclease e estéril. Como a amostra viral é uma solução líquida, nano-DSC foi executada nessas amostras. O

5 termograma de nano-DSC (figura 18) das partículas virais purificadas em água mostrou uma  $T_m$  a  $16,8^{\circ}\text{C}$ , indicando que as proteínas virais foram submetidas a uma alteração conformacional. A solução de partículas virais purificadas em seda mostrou uma  $T_m$  elevada em  $68,3^{\circ}\text{C}$ . Embora a faixa de

10 nano-DSC não se estende o suficiente para mostrar a  $T_g$  da seda, um termograma de solução de seda é ainda mostrado para ilustrar que nenhum dos valores de  $T_g$  pode ser atribuído a uma mudança na estrutura da seda. Para investigar se a  $T_m$  correspondeu à desnaturação das partículas virais devido à

15 agregação, o tamanho das partículas virais foi analisado por DLS (figura 19). O diâmetro efetivo médio ponderado de uma partícula viral nua é de cerca de 250 nm. Isso é consistente com os valores reportados de sarampo, caxumba e rubéola (Russell e outros, 1967; Hall e Martin, 1973). Os resultados

20 indicaram que a solução de vírus purificada mostrou um aumento no diâmetro médio efetivo em torno de  $16^{\circ}\text{C}$ , indicando a presença de agregação de proteínas. O DLS das partículas virais na solução de seda, por outro lado, não apresenta um aumento no diâmetro médio eficaz até cerca de  $70^{\circ}\text{C}$ , mostrando



a agregação da proteína a uma temperatura mais elevada. Os resultados das DLS correspondem bem aos resultados da nano-DSC como a agregação detectada por dispersão de luz ocorre dentro do intervalo de temperaturas de desdobramento da proteína medido por DSC.

#### **Liberação da vacina das películas de seda, película de seda liofilizada, hidrogéis de seda e microesferas de seda**

A fim de demonstrar que a seda proporciona não só a estabilização da vacina, mas também controle sobre a cinética de liberação de vacina, estudos de liberação foram realizados com uma variedade de formulações de seda. Cada formulação de seda (película, película liofilizada, hidrogel e microesfera) continha a mesma quantidade inicial de vacina. Perfis de liberação cumulativa da vacina encapsulada em películas de seda e películas de seda liofilizadas são apresentados nas figuras 20A e 20B. Estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos para esses dois sistemas com películas individuais colocadas entre dois blocos de hidrogéis de gelatina, permitindo a liberação de vacina conforme as películas de seda se dissolvem nos hidrogéis. A vacina aprisionada nas películas de seda preparada a partir de solução de seda a 8% (peso/volume) exibiu uma liberação ligeiramente brusca, típica da liberação por difusão. Na última coleta de 6 horas, a quase totalidade da vacina

encapsulada foi liberada como 92,43% da vacina foram recuperados e ativos. As películas de seda preparadas com 4% (peso/volume) apresentaram um perfil de liberação semelhante, só que a liberação brusca foi mais rápida  
5 conforme a massa liberada se aproximava da liberação mais rapidamente. As películas de seda liofilizadas mostraram um efeito de rebentamento mais pronunciado à medida que as películas de seda a 8% liberaram 44% e as películas a 4% liberaram 56% da MMR carregada dentro de 10 minutos da  
10 colocação no hidrogel. As películas de seda liofilizadas liberaram quase toda a MMR carregada dentro de 90 minutos. Os hidrogéis de seda e preparações de microesferas exibiram uma liberação muito mais lenta em comparação, na ordem dos dias (figuras 21A-21B). Os hidrogéis de seda a 4% e 8%  
15 prolongaram a liberação da vacina para 8 dias. Além disso, os hidrogéis de seda a 16% foram capazes de prolongar a liberação adicional como apenas 73,53% da vacina foram liberados no dia 8. A vacina liberada das microesferas de seda apresentou maior potencial como um sistema de liberação  
20 prolongada e estendida. Do mesmo modo, o aumento da concentração de seda das microesferas retardou a taxa de liberação, as microesferas de seda liberaram 16% 65,35% da vacina carregado no dia 8. A linearidade relativa da liberação das microesferas de seda a 16% é também de

interesse, como o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) para a curva foi de 0,988, indicando uma liberação próxima da ordem zero.

A caracterização biofísica da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola, através do uso de calorimetria e do  
5 espalhamento de luz permitiu uma descrição do processo de estabilização física do vírus como uma função da temperatura elevada durante o armazenamento da vacina. Devido à sensibilidade à temperatura das vacinas, o processo de distribuição e armazenamento de vacinas é frágil, uma vez  
10 que essas questões vêm acompanhadas frequentemente de um custo logístico considerável (Zweig, 2006). Sabe-se que a imobilização de moléculas bioativas, tais como enzimas, conduz a um aumento na estabilidade ao mesmo tempo melhorando o manuseio. A imobilização é importante, uma vez que é  
15 importante a manutenção de condições ambientais constantes a fim de proteger as moléculas bioativas contra mudanças no pH, temperatura e resistência iônica (Kumakura, 1995). A química, estrutura e montagem de seda gera um ambiente de nanoescala único e torna esse polímero de proteína um  
20 candidato atraente para a estabilização de moléculas bioativas ao longo de períodos de tempo prolongados (Jin e Kaplan, 2003). Sem processamento químico, a seda pode ser usada para reter moléculas bioativas nos domínios anfifílicos, de automontagem a partir da solução aquosa.

MMR® II, uma vacina contra sarampo, caxumba e rubéola de vírus vivo, atenuado é provida como uma preparação liofilizada a ser reconstituída no momento da utilização. Antes da reconstituição, a vacina precisa ser armazenada entre 2 e 8°C e será estável durante 24 meses, uma vez reconstituída devem ser usada dentro de 8 horas. A exigência da WHO para a estabilidade ao calor das vacinas contra sarampo, caxumba e rubéola emprega dois índices de estabilidade: 1) a vacina deve reter pelo menos 1.000 partículas de vírus vivos em cada dose humana, após incubação a 37°C durante sete dias, e 2), a titulação do vírus não deve diminuir em mais de 1 log<sub>10</sub> durante o armazenamento (WHO, 1982; WHO, 1994). Vacinas de vírus vivos, ao contrário de outras formas de vacina, dependem da sua imunogenicidade para estabelecer uma resposta imune adequada, o que exige a manutenção de um número suficiente de partículas de vírus vivos. O armazenamento dessas partículas virais termicamente lábeis requer a adição de estabilizantes. Cada dose de MMR® II é estabilizada em 14,5 mg de sorbitol, fosfato de sódio, 1,9 mg de sacarose, cloreto de sódio, 14,5 mg de gelatina hidrolisada, ≤ 0,3 mg de albumina humana recombinante, <1 ppm de soro fetal bovino, outro tampão e ingredientes dos meios e cerca de 25 µg de neomicina.

A exposição excessiva a temperaturas acima das

condições de armazenamento recomendadas pode danificar as vacinas de vários modos, mais notavelmente a alteração da estrutura terciária das proteínas virais, redução da infectividade viral, diminuindo assim a potência da vacina (Chen e Kristensen, 2009). As alterações na estrutura da proteína podem conduzir à agregação e absorção celular alterada, afetando a atividade da vacina (Brandau, e outros, 2003; Manning e outros, 1989, Middaugh, 1996). Caxumba e sarampo pertencem à família dos paramixovírus, caracterizado como um vírus envelopado contendo o nucleocapsídeo que encobre o NRA viral de sentido negativo de filamento único circundado por glicoproteínas de fusão (F) e hemaglutinina (H) expresso sobre a superfície do vírus (figura 22A) (Kingston e outros, 2008; Woelk e outros, 2002). Do mesmo modo, a rubéola pertence à família Togavírus e é um vírus envelopado com duas glicoproteínas específicas do vírus da E1 e E2, que circundam um nucleocapsídeo icosaédrico encobrindo um RNA viral de sentido positivo de filamento único (Dorsett e outros, 1985, Nakhasi e outros, 1991).

O método de infecção do paramixovírus envolve a ligação do vírus aos receptores de CD46 e CD150 das células hospedeiras através da interseção entre ambas a glicoproteína de hemaglutinina (H) e glicoproteína de fusão (F) (figura 22C) (Wild e outros, 1991, Malvoisin and Wild,

1993; Moss e Griffin, 2006). A fusão do vírus e da célula permite a entrada viral e liberação do material nucléico viral na célula. A principal causa da inativação viral é a interrupção das proteínas de superfície virais e as tensões, tais como temperaturas elevadas podem induzir mudanças conformacionais nas proteínas virais (Rexroad e outros, 2006, Ausar e outros, 2006). Essas alterações conformacionais pode afetar a estabilidade do vírus através da indução da agregação da partícula viral que impede a ligação das células e absorção, conduzindo assim a inativação do vírus (Figura 22D) (Ohtake e outros, 2010). O desenvolvimento de uma formulação de vacina que é resistente aos danos causados pelo calor e melhora a estabilidade térmica da vacina teria grandes benefícios incluindo o prolongamento do período de vida útil, reduzindo a perda de vacinas e redução da dependência dos requisitos da cadeia de resfriamento.

A melhora na estabilidade da vacina fornecida pela proteína de seda foi mais acentuada nas temperaturas elevadas de 37°C e 45°C, enquanto que a estabilidade foi comparável ou ligeiramente melhor que a forma em pó fabricada e armazenada a 4°C e 25°C. A vacina estabilizada é liofilizada com uma variedade de excipientes que, de acordo com o fabricante devem permanecer estáveis e ativos durante pelo

menos dois anos. A deterioração da vacina ocorre, contudo, quando a cadeia de resfriamento é quebrada e a vacina é armazenada acima da temperatura de refrigeração. Em tais casos, a seda seria suficiente para proporcionar a

5 estabilidade da vacina para manter a estabilidade em uma faixa de condições ambientais. A liofilização das MMRs em películas de seda melhorou a potência da vacina inicial recuperada, quanto mais tempo as partículas virais permanecessem no estado hidratado, mais provavelmente elas

10 seriam expostas às reações de degradação, tal como hidrólise de desamidação que podem contribuir para a instabilidade (Li, 1994). A estabilização melhorada e contínua fornecida pelas películas de seda liofilizadas por mais de seis meses em armazenamento também pode ser devida, em parte, às

15 condições de armazenamento das películas liofilizadas. Enquanto as películas de seda regulares foram armazenadas em tubos Eppendorf, as películas liofilizadas foram armazenadas em frascos vedados a vácuo com baixo teor de umidade residual.

20 A avaliação dos dados experimentais de potência por modelos cinéticos de desdobramento e degradação serve para ilustrar a estabilidade acelerada projetada dos diferentes sistemas de vacina em temperaturas selecionadas, enquanto também relacionando os dados de potência às alterações

conformacionais induzidas por temperatura a serem explicadas pelas caracterizações biofísicas. Sob condições de estudo de estabilidade aceleradas, a estabilidade intrínseca dos produtos farmacêuticos de proteína frequentemente é

5 drasticamente reduzida. Em temperaturas elevadas, as taxas de desdobramento de proteína aumentam e mais interações químicas envolvidas na desestabilização da proteína são aceleradas em relação às temperaturas mais baixas (Creighton, 1990). A aceleração do processo de degradação

10 através de armazenamento a temperaturas elevadas, permite a avaliação da seda como um estabilizador candidato adequado para inibir o processo de inativação. O exame dos dados relativos ao potencial sugere que a degradação observada pelos três sistemas de vacinas pode ser ajustada para um

15 sistema de cinética de ordem zero. A observação de um perfil de concentração-tempo de reações de zero, primeira e segunda ordem mostra que a cinética de ordem zero sempre prevê o maior grau da composição como uma função do tempo entre as três. Assim, ao prever a ordem de uma reação, pressupondo um

20 modelo cinético de ordem zero, preverá a quantidade máxima de degradação que possa ocorrer em algum momento no futuro (Zhou e outros, 2009). Portanto, presumindo que a degradação do vírus de MMR é da pseudo-ordem zero, utilizando-se uma cinética de ordem zero para modelar o perfil de degradação,



previmos as estimativas mais conservadoras para a meia-vida da película da vacina encapsulada na seda e sistemas de película de seda liofilizada.

A tendência geral observada para todos os três  
5 componentes de vírus foi a de que ambos os tipos de películas de seda diminuíram as taxas de degradação dos vírus e os sistemas de seda liofilizada exibiram as melhores taxas de degradação e, portanto, maior meia-vida entre os três sistemas, enquanto que a forma em pó da vacina degradou mais  
10 rapidamente em todos os pontos de temperatura testados. O desvio deste comportamento foi observado em amostras a 4°C como as vacinas em pó mostram uma taxa de degradação mais baixa com uma meia-vida prevista elevada nas películas de seda não liofilizadas. Uma explicação possível para os  
15 resultados é que a vacina em pó tem a vantagem da preparação liofilizada em relação às películas de seda normais. Durante a preparação da película, umidade adicional foi introduzida na vacina encapsulada o que aumenta a mobilidade intermolecular e as possibilidades para a degradação dentro  
20 das películas de seda em comparação com a vacina em pó fornecida pelo fabricante. Sem dúvida, as películas de seda proporcionam maior estabilidade em temperaturas elevadas, mesmo com a desvantagem de umidade adicional. No entanto, a vacina em pó liofilizada foi formulada para permanecer

estável na faixa de temperatura ótima de 2 a 8°C. Esta vantagem da liofilização pode também explicar o sucesso das películas de seda liofilizadas na estabilização da vacina, uma vez que proporcionam estabilidade proporcionada tanto  
5 pela seda quanto pela liofilização.

Além dos estudos cinéticos efetuados usando os dados de potência, caracterizações biofísicas usando calorimetria e espalhamento de luz foram realizadas para confirmar os resultados. Devido à elevada temperatura de transição vítrea  
10 da fibroína de seda, 178°C, a proteína de seda é termodinamicamente estável, uma vez automontada na conformação de  $\beta$ -folha. Essas características proporcionam um ambiente para estabilização da vacina. A solução de vacina-seda consistiu em moléculas de vacina na forma nativa  
15 e na fibroína de seda, principalmente presente nos espirais aleatórios. Uma vez que as películas são moldadas, há alguma conversão da fibroína em  $\beta$ -folhas, que contêm regiões hidrófobas, enquanto que os espirais aleatórios contêm as regiões mais hidrófilas. As vacinas parecem ser  
20 estabilizadas nesse ambiente, possivelmente devido às interações com as cadeias de fibroína ou as restrições na mobilidade da cadeia (figura 21B). A DSC no estado (figura 17) mostrou uma Tg de MMR em pó a 68,9°C. Esse valor, no entanto, pode não ser correto, pois pode não refletir a Tg

e mudança estrutural e correspondente das partículas virais propriamente, porém ao invés disso um valor médio das contribuições dos vários excipientes excipiente da proteína e estabilizadores já presentes na formulação da vacina MMR em pó. MMR em película de seda mostrou uma  $T_g$  em  $89,2^{\circ}\text{C}$ , indicando uma mudança na  $T_g$  da vacina, devido à presença da seda. O termograma de MMR em película de seda liofilizada também mostrou a presença de dois picos exotérmicos a  $116,6^{\circ}\text{C}$  e  $164,8^{\circ}\text{C}$ . O pico em  $116,6^{\circ}\text{C}$  era muito provavelmente uma  $T_m$ , indicativa de desdobramento da proteína, enquanto que o segundo pico era a degradação,  $T_d$ . O mesmo não pode ser determinado se o desdobramento e a degradação contribuírem para as proteínas virais ou os vários excipientes presentes na formulação da vacina. Portanto, é difícil dizer de forma conclusiva que o aumento na  $T_g$  da vacina na presença de seda contribuiu diretamente para a estabilidade estrutural das partículas virais.

A fim de esclarecer a situação, a vacina foi purificada para remover excipientes. Uma vez que o resultado da purificação é uma preparação líquida, as partículas virais estão em um ambiente menos estável. Portanto, a solução de partículas virais foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser usada. A  $T_m$  por nano-DSC aparece quando se desenrola uma proteína, expondo as regiões hidrófobas e hidrófilas na solução de

tampão aquoso. Moléculas de proteínas hidrofóbicas adjacentes se agregarão para proteger estas regiões a partir da solução aquosa envolvente. Uma vez que o estado desdobrado da proteína tem mais área de superfície que o estado nativo, 5 o grau de exclusão preferencial oferecido pelo agente estabilizante de seda a partir do estado menos estruturado aumentaria o potencial químico dessa forma estabilizada, mesmo acima daquele do estado nativo (Brandau e outros, 2003). Esse aumento da estabilidade pode ser refletido no 10 aumento do ponto médio da transição de desdobramento da proteína,  $T_m$ . A  $T_m$  elevada da solução de vacina encapsulada em seda se deve à estabilização estrutural proporcionada pela seda para evitar a desnaturação das proteínas virais e agregação. O valor da  $T_m$  em  $16,8^\circ\text{C}$  é provavelmente devido ao 15 desdobramento das glicoproteínas de superfície viral (F e N de sarampo e caxumba e E1 e E2 da rubéola) devido ao calor excessivo aplicado às partículas virais. Essa desnaturação provavelmente conduz à agregação das partículas virais (figura 22D), impedindo as mesmas de ligação e fusão com as 20 células de animais (figura 22C), levando à perda da infecciosidade das partículas virais e de vacina, como um todo. Essa agregação associada é mostrada no termograma de DSC, como a mudança acentuada do fluxo de calor imediatamente após a  $T_m$ . Parece que a agregação, um processo exotérmico,

é um resultado direto do desdobramento endotérmico da proteína. A amplitude dos picos de  $T_m$  é, provavelmente, um resultado da contribuição combinada do desdobramento de diversas proteínas presentes na amostra. Além disso, a  
5 agregação da proteína pode também contribuir para os grandes picos de sobreposição com a endotermia denaturacional (Packer e outros, 2002). A infectividade de MMR dependente da estabilidade conformacional das proteínas virais (Kissman e outros, 2008). O aumento na  $T_m$  pela presença de moléculas  
10 de seda indica que a seda proporcionou estabilidade estrutural às proteínas virais protegendo as mesmas da desnaturação térmica. A interação entre as partículas virais e as regiões hidrófobas da seda, bem como a mobilidade da cadeia limitada, pode impedir a agregação da proteína viral  
15 (figura 22B), preservando, assim, a infectividade viral da vacina.

O desdobramento de uma proteína geralmente está associado ao aumento no tamanho hidrodinâmico como os estados das proteínas parcial ou totalmente desdobrada são instáveis  
20 e formam agregados (Roberts, 2007). Os resultados de espalhamento de luz indicam que as partículas virais nuas agregaram a uma temperatura muito mais baixa que uma solução de partículas virais em seda. O início da agregação das partículas conforme verificado por DLS ocorre em torno da

mesma temperatura de desdobramento da proteína, conforme  
mostrado por DSC, indicando que o desdobramento da proteína  
resultou diretamente resultou na agregação. Os resultados de  
DLS corroboram os resultados da DSC de que a seda fornece  
5 estabilidade estrutural às partículas virais,  
especificamente para as glicoproteínas de superfície viral,  
evitando colisões intermoleculares e minimizando assim a  
agregação em temperaturas elevadas.

A umidade também pode ter um efeito significativo sobre  
10 os produtos de vacina, como o excesso de água introduzida no  
sistema pode levar a um aumento na mobilidade e na  
reatividade correspondentes das proteínas virais (Waterman  
e Adami, 2005). A análise da umidade residual das películas  
revela que durante o decurso do ensaio de estabilidade o  
15 aumento da umidade residual, especificamente nas faixas de  
temperatura elevada, é mais provável devido à falta de  
ambiente de umidade controlada proporcionada pelos tubos de  
Eppendorf. Enquanto a MMR em pó e a MMR em película de seca  
liofilizada foram armazenadas em condições de baixa umidade,  
20 uma vez que são extremamente higroscópicos, provida pelos  
frascos de liofilização e de rolha, e vedados em um ambiente  
rico em nitrogênio, a MMR em películas de seda foi armazenada  
em tubos Eppendorf o que permitiria maiores chances para a  
absorção da umidade atmosférica nos recipientes que os

frascos a vácuo. O aumento da atividade da água nos tubos de Eppendorf é também devido à quantidade de água inicial associada às películas de seda, já a um nível mais elevado que ambos o pó e as películas liofilizadas, e a umidade  
5 relativa do embalagem inicial. O aumento da umidade residual exibido nas películas de seda, em temperaturas elevadas, também poderia ser explicado pela possível dessorção da água a partir da seda, que embora deixada secar ao ar ainda contém pequenas quantidades de moléculas de água  
10 ligadas intermolecularmente nas matrizes de seda (Hu e outros, 2007). Além disso, para as películas de seda armazenadas a temperatura ambiente, a variabilidade da umidade atmosférica ditada pelos padrões climáticos afetaria a umidade relativa no interior dos tubos de Eppendorf.

15 Embora o efeito da umidade residual sobre a vacina tenha sido levado em consideração, as películas de seda foram armazenados em tubos Eppendorf simplesmente para mostrar que, em condições mínimas de processamento e sem considerar o armazenamento especial, vacinas aprisionadas em películas  
20 de seda são capazes de exibir estabilidade aumentada em temperaturas elevadas em relação às vacinas liofilizadas disponíveis comercialmente testados às mesmas temperaturas. O aumento da mobilidade, devido à umidade e temperatura poderia explicar como as películas de seda liofilizadas

exibiriam tais aumentos dramáticos na estabilidade das películas de seda normais. O processo de liofilização e armazenamento a baixa umidade das películas liofilizadas limita significativamente a mobilidade das proteínas virais em altas temperaturas, fazendo com que as proteínas virais sejam resistentes ao desdobramento induzido termicamente e a agregação associada. Mesmo que a umidade residual absoluta das películas de seda seja mais elevada que a da MMR em pó, a percentagem de aumento da umidade residual no pó ao longo do intervalo de temperatura testado é maior que a observada nas películas de seda. O aumento da temperatura parece ter tido um maior impacto na umidade induzida pela temperatura no pó que as películas de seda. Pareceria que a seda proveu inibição da mobilidade molecular, durante o armazenamento para evitar a agregação da proteína e desdobramento subsequente, considerando-se que a atividade da água aumentou no pó resultante da umidade induzida por temperatura, sem estabilidade conformacional provida pela seda, aumentando a agregação da proteína.

Os estudos de liberação foram realizados em uma variedade de veículos de liberação de vacina aprisionada em seda para mostrar que a seda foi capaz de estabilizar a cinética de liberação da vacina e de controle. Películas de seda carregadas com vacina e películas de seda liofilizadas



foram não tratadas e solúveis em água. As mesmas apresentam o potencial de serem moldadas em formatos de liberação, tais como microagulhas, uma alternativa segura e isenta de dor para a distribuição da medicamento transdérmico em agulhas hipodérmicas (Tsioris e outros, 2011). É concebível que um emplastro pode ser aplicado sobre a pele e as microagulhas de seda carregadas de vacina seriam punçadas na pele, as agulhas de seda se dissolvendo e liberando a vacina por via subcutânea. O perfil de liberação das películas de seda mostra a promessa em direção a esse objetivo. Os estudos de liberação para as películas de seda e as películas de seda liofilizadas foram conduzidos em um hidrogel gelatinoso, devido a uma consistência semelhante à do tecido (Wightmas e outros, 2007). As películas de seda se funde entre 4% e 8% dos perfis de liberação semelhantes exibidos para a seda (figura 20A-20B), mostrando uma explosão inicial de lançamento seguido de uma diminuição da taxa de liberação. A película de seda a 4% exibiu uma liberação mais rápida devido à menor concentração de proteína de seda, permitindo que a vacina se difunda mais rapidamente a partir da matriz, ao mesmo tempo permitindo que a película se dissolva mais rapidamente. Conforme a concentração de seda aumentada para 8%, a taxa de liberação diminui devido ao aumento do teor da  $\beta$ -folha da película, formando uma matriz mais rígida e

retardando a difusão da vacina no hidrogel. Os perfis de liberação das películas de seda liofilizadas mostraram um efeito inicial de rebentamento mais pronunciado. A medida que a vacina se difunde rapidamente da seda quando do contato inicial com o hidrogel, a rebentação inicial das películas liofilizadas foi mais provável devido à dissolução rápida das películas liofilizadas. Pela mesma razão, como as películas de seda, as películas de seda liofilizadas a 4% exibiram um perfil de liberação mais rápida que a 8%. Embora a escala de tempo de lançamento da película de seda foi da ordem de horas, 96,85% de MM encapsulada foram liberados por 90 minutos.

Os veículos de distribuição de vacina em seda foram também fabricados em formatos insolúveis dos hidrogéis de seda e microesferas. Estas formas poderiam ser incorporadas à liberação da vacina injetável que forma um depósito de vacina subcutâneo capaz de liberar a vacina por um período de tempo estendido. Os hidrogéis e microesferas liberaram a vacina ao longo de um período de dias. A liberação medicamentosa mais lenta pode ser explicada pela difusão da vacina, limitada pelo teor aumentado da  $\beta$ -folha e microesferas. Também, como a concentração de hidrogéis e microesferas foi aumentada, a linearidade da liberação aperfeiçoada, correspondendo a uma diminuição na taxa de

liberação. O aumento da concentração de seda dos hidrogéis resultou em uma diminuição da taxa de liberação de vacina. O aumento da concentração de seda das microesferas de MMR em seda, contudo, reduziu a taxa de liberação e as taxas de liberação tornaram-se mais lineares, aproximando-se da ordem zero. As microesferas a 8% tinham um coeficiente de regressão ( $R^2$ ) de 0,95 e 16% da seda apresentaram um valor de 0,988. O aumento da linearidade da liberação da vacina a partir de microesferas pode ser devido aos pequenos volumes que geram um gradiente de difusão inferior para as partículas de vacinas para atravessar a fase em volume.

Estes resultados indicam que esses sistemas de vacinas aprisionadas em seda podem ser fabricados para proporcionar estabilidade térmica para as vacinas em temperaturas elevadas, ao mesmo tempo em que funcionam como um sistema de liberação controlada e sustentada da vacina. O aprisionamento da vacina de MMR em películas de seda liofilizadas mostrou maior estabilidade em temperaturas elevadas fora da cadeia de resfriamento recomendada para um período de tempo muito além das vacinas do fabricante. A escolha de seda como um polímero de encapsulamento também sustenta a segurança do sistema de segurança da vacina em seda implantável ou injetável, uma vez que a seda é um biomaterial biocompatível, biodegradável e aprovado pela FDA

(Altman e outros, 2003; Horan e outros, 2005).

A vacina encapsulada na película de seda e película de seda liofilizada forneceu um veículo altamente eficaz para a termoestabilização a longo prazo do sarampo, caxumba e rubéola. Ambos os sistemas de película de seda eram capazes de aumentar a meia-vida de todos os três componentes virais da vacina em comparação com as vacinas do fabricante fornecidas a 25°C, 37°C e 45°C. A seda reduz o desdobramento da proteína viral induzido pela temperatura e subsequente agregação por redução da umidade residual das amostras durante o armazenamento a temperaturas elevadas e também proporcionar estabilidade estrutural para a vacina para elevar a temperatura na qual as proteínas virais desnaturam. Além disso, os transportadores de seda podem ser fabricados em veículos de distribuição diferentes capazes de adaptar a cinética de liberação da vacina. Este sistema de suporte de seda proporciona um novo sistema de distribuição de vacina facilmente fabricado sem considerações especiais de processamento, capaz de manter a potência da vacina sem a necessidade de aderência estrita a cadeia de resfriamento.

### **Exemplo 3**

#### **Métodos**

**Vacina trivalente.** Para a estimativa de potência, foi utilizada uma fonte comercial da vacina MMR® II trivalente

para sarampo, caxumba, rubéola (Merck & Co., Inc., USA), uma vacina de vírus vivo, atenuado, liofilizado, estéril contendo o sarampo do tipo Enders' Edmonston atenuado, a caxumba tipo Jery Lynn e rubéola Wistar RA 27/3. Antes do uso, a vacina é reconstituída em diluente e cada dose de 0,5 mL continha não menos de 1.000 TCID<sub>50</sub> (dose infecciosa de cultura de tecidos) do vírus do sarampo; 12.500 TCID<sub>50</sub> do vírus da caxumba e 1.000 TCID<sub>50</sub> do vírus da rubéola. Condições do fabricante indicam que a vacina deve ser usada no espaço de 8 horas após a reconstituição e armazenadas a 4°C ou de outra forma ser descartada. Cada dose de 0,5 mL contém sorbitol (14,5 mg), fosfato de sódio, sacarose (1,9 mg), cloreto de sódio, gelatina hidrolisada (14,5 mg), albumina humana recombinante (<0,3 mg), soro bovino fetal (<1 ppm), outro tampão e ingredientes do meio e cerca de 25 µg de neomicina.

**Purificação da fibroína da seda.** As soluções aquosas de fibroína de seda foram preparadas como descrito anteriormente (Wang e outros, 2008). Casulos de bicho-da-seda *B. mori* foram fervidos durante 30 minutos, em uma solução aquosa de 0,02 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e depois bem enxaguados com água deionizada para extrair a sericina. Após a secagem, a seda foi dissolvida em uma solução a 9,3 M de LiBr a 60°C durante 4 a 6 horas e, em seguida, dialisada em água

destilada utilizando cassetes de diálise Slide-a-Lyzer (MWCO 3.500, Pierce) durante 48 horas. A solução foi centrifugada para remover os agregados de seda e outros resíduos insolúveis. A concentração final da fibroína de seda foi de 5 aproximadamente 9% (peso/volume). As soluções foram, em seguida, submetidas à autoclavagem durante a esterilidade.

**Purificação do vírus.** Vacina em pó liofilizada foi reconstituída em água esterilizada e carregada em tubos de diálise de 0,5 kDa (Sigma Aldrich), e dialisada contra uma 10 solução de NaCl 0,15 M para remover os excipientes da solução de vacina. A solução de vacina recuperada foi então operada através de uma coluna de dessalinização PD-10 (GE Healthcare), para remover o excesso de sal. O protocolo de rotação foi seguido por especificações do fabricante. A 15 solução de partícula viral purificada e recuperada foi coletada e armazenada em um tubo de Eppendorf a -80°C até a sua utilização.

**Vacina encapsulada em películas de seda.** O processo para a fabricação de vacina encapsulada em película de seda 20 é ilustrado na figura 7. Uma mistura de uma solução de seda esterilizada a 9% (peso/volume) e a vacina MMR liofilizada foi preparada a uma concentração de 1:1 em peso de MMR para solução de seda. As películas foram então moldadas sobre uma superfície revestida de Teflon. As películas foram secas em

uma câmara estéril durante 12 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Películas individuais foram colocadas em tubos Eppendorf em condições ambientes e armazenadas a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C para os estudos de estabilidade.

5        **Liofilização das películas de seda que encapsulam vacina.** Soluções de seda contendo MMR (razão em peso de 1:1) foram divididas em alíquotas em placas de 96 poços e liofilizadas usando um secador por congelamento VirTis 25K Genesis 251 SQ Super XL-70. As amostras foram congeladas a  
10   -45°C por 480 minutos. A secagem primária ocorreu a -20°C durante 2.400 minutos e secagem secundária a 35°C por 620 minutos. As amostras foram mantidas a -45°C até que fossem removidas do liofilizador. As películas foram depois removidas das placas de poços e transferidos para frascos de  
15   vidro de soro de 5 cm<sup>3</sup>. Rolhas de liofilização de 5 mm foram aplicadas aos frascos em atmosfera de nitrogênio e em condições de vácuo, em uma caixa de luvas MBRAUN LABmaster (Garching, Alemanha) e um grampo de 5 mm foi usado para apertar a vedação de alumínio de 5 mm nos frascos. Os frascos  
20   foram armazenados a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C para os estudos de estabilidade. Os frascos, rolhas, vedações e grampo foram fornecidos pela VWR (Bridgeport, NJ).

**Vacina encapsulada em hidrogéis de seda.** A solução de seda foi ajustada para concentrações de 2-5% em peso e, em

seguida, submetida a autoclavagem para prover esterilidade. Em seguida, 1 mL da solução de seda foi transferido para um frasco de vidro Fisher de 2 mL autoclavado, e a solução foi misturada no frasco de vidro durante 7 minutos a 3.200 rpm utilizando um agitador Fisher. A solução turva foi recolhida e transferida para tubos Eppendorf de 2 mL, a vacina foi suavemente misturada na solução com uma razão de 1:1 em peso. A solução de vacina em seda foi incubada no tubo Eppendorf a temperatura ambiente até a gelificação. Os géis foram em seguida refrigerados durante o armazenamento de longo prazo.

**Encapsulamento de vacina em microesferas de seda.** A produção de microesferas carregadas com vacina das combinações de seda/PVA utilizou o procedimento descrito por Wang e outros (2010). Vacina em pó foi adicionada a uma solução de 5% em peso de seda para alcançar uma razão em peso de 1:1.000. Essa solução foi misturada suavemente com uma solução mestra de PVA a 5% (peso/volume) (álcool polivinílico, peso molecular 30.000-70.000, Sigma Aldrich). Empregando uma razão em peso consistente de 1:4, uma solução de seda-PVA a 5% (peso/volume) foi preparada por mistura de 1 mL da solução a 5% em peso de seda com 4 mL de solução de PVA a 5% em peso. A solução de seda foi submetida a autoclavagem para obter esterilização. Após a mistura, a solução foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente.



Em seguida, a solução de 5% (peso/volume) foi transferida para uma placa de Petri de 35 mm. A solução foi seca durante a noite em uma capela de laboratório. As películas secas foram dissolvidas em 30 mL de água ultrapura com 10 minutos de agitação suave à temperatura ambiente e depois centrifugadas a 16.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de água ultrapura foi novamente centrifugado. O sedimento final foi suspenso em 2 mL de água ultrapura.

10       **Ensaio quantitativo de infecciosidade em RT-PCR em tempo real.** Uma curva padrão foi gerada por diluição em série de uma solução da única da vacina reconstituída em água esterilizada. A vacina reconstituída, considerada como a diluição 1  $\log_{10}$  foi diluída em série em etapas de 0,5  $\log_{10}$  a partir de 1,5  $\log_{10}$  e 3,5  $\log_{10}$ . As películas de MMR em seda (contendo diluição de 1  $\log_{10}$  da vacina) foram redissolvidas em uma alíquota de água e a solução foi adicionada diretamente às células em cultura. As células Vero (células de rim de macaco verde Africano) (ATCC, 15 Manassas, VA) foram cultivadas em meio M199 com 25 mM de HEPES 25 e L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) e soro bovino fetal a 5% (Invitrogen). As células foram tratadas com tripsina,

contadas e ajustadas para 50 mil células/mL e colocadas em placas de 24 poços. Em seguida, 50 µL da diluição de vacina e película de seda redissolvida foram adicionados a um poço de células Vero, em triplicata. O vírus foi deixado replicar nas células durante 3 dias, então o RNA das células infectadas foi isolado, convertido em DNAc e quantificado utilizando qPCR. Existe uma relação log-linear entre a quantidade de RNA alvo e o ciclo de PCR em que a fluorescência se eleva acima do fundo (ciclo limite, Ct). Quanto mais viáveis forem os vírus presentes na amostra, menos ciclos e mais rápidos serão necessários para a fluorescência do produto PCR para o fundo acima e, portanto, menor o valor de Ct. De modo a dar conta do crescimento de células variável, cada vez que um ensaio é executado, uma curva padrão é gerada para diluição em série de uma solução de vacina contendo a mesma quantidade de vacina carregada na NMR nas películas de seda. A infectividade viral foi medida logo após a preparação da película inicial para estabelecer a atividade da linha de base (tempo 0). As medições em pontos de tempo subsequentes foram comparadas com o valor do tempo 0 para estabelecer a potência residual. A potência inicial recuperada a partir das películas de seda, a atividade viral imediatamente após a fusão da película, foi determinada por comparação da infecciosidade viral medida a partir da MMR em

películas de seda em relação à infectividade de uma solução de vacina sozinha, contendo a mesma concentração de vacina como carregada na seda películas. A potência residual da MMR em películas de seda foi calculada pela infectividade viral medida no ponto de tempo certo em comparação com a potência inicial recuperada e a potência residual da vacina em pó em armazenamento foi medida por comparação da atividade viral em comparação com a infectividade da solução da vacina utilizada para determinar a potência inicial recuperada a partir das películas de seda. Como controles, atividades virais também foram medidas para as películas de seda sem vacinas carregadas.

RNA foi isolado das células Vero utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) e clorofórmio. O RNA foi purificado utilizando o kit Qiagen RNEasy (Qiagen, Valencia, CA). A transcrição reversa foi realizada em RNA purificado para sintetizar DNAc, utilizando o kit de Transcrição Reversa de DNAc de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA). RT-PCR em tempo real foi realizada em um sistema Mx3000P QPCR Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA). A Reação de PCR foi realizada em volumes de MISTURA DE 50 µL contendo TaqMan Universal PCR Mater MIS (IX) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,9 µM de cada um dos iniciadores de PCR e 0,25 µM da sonda com 5 µL da amostra de DNAc. Para a detecção do

sarampo, um fragmento de 114 pb (nt 584-697) foi amplificado com o iniciador direto (5'-CCCTGAGGGATTCAACATGATTCT-3'), iniciador reverso (5'- ATCCACCTTCTTAGCTCCGAATC-3') e uma sonda (5'FAM-TCTTGCTCGC AAAGGCGGTTACGG-BHQ1 3') (Hübschen e outros, 2008). Para a detecção da rubéola, iniciador direto (5'-TGATACCC AGACCTGTGTTCAC-3'), iniciador reverso (5'-GGTCGATGAGG ACGTGTAGG-3') e uma sonda (5' JOE-GATCACCCAGCACTCCACGCAA BHQ-1 3') foram empregados para amplificar uma região de 129 pb (nt 195-323) (Hübschen e outros, 2008). Para a detecção de uma região de 134 pb do vírus da caxumba, iniciador direto (5 '-CATAGGAGATATGTGGGG-3'), iniciador reverso (5 '-GTCTTCGCCAACGATGGTGATGATTG-3') e uma sonda (5 'JOE-CCATGCAGGCGGTCACATTCCGACAACTGC-TAMRA 3') foram utilizados (Kubar e outros, 2004). Todos os iniciadores e sondas foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). As condições de reação da PCR foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e em seguida 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

**Liberação da vacina *in vitro*.** Estudos de liberação de vacina *in vitro* foram realizados a 37°C. Os estudos de liberação para as películas de seda películas de seda liofilizadas foram realizados em um modelo hidrogel de gelatina. O hidrogel de gelatina foi preparado por mistura de 4,5 g de gelatina em pó sem sabor, original, Knox™, com

40 mL de água deionizada e fervida para se obter 0,112 g/mL de hidrogel. A solução foi vertida em uma placa de Petri de 35 mm e resfriada. Para iniciar um estudo de liberação, uma película foi colocada entre duas fatias do hidrogel. Uma vez  
5 que um ponto de tempo foi atingido, a película foi removida do gel para cessar a liberação. Os hidrogéis foram então digeridos em 400 µL de 1 mg/mL de colagenase (Sigma Aldrich) durante 2 horas a 37°C. Subsequentemente, a MMR liberada foi quantificada pelo ensaio de infectividade de célula Vera.

10 A liberação *in vitro* dos hidrogéis e microesferas de seda foi realizada em tubos Eppendorf de 2 mL. Cada solução de hidrogel ou microesfera foi colocada em um tubo Eppendorf com a adição de 1,5 mL de PBS estéril. Em cada ponto de tempo, o PBS no interior do tubo Eppendorf foi removido e  
15 transferido para outro tubo Eppendorf e armazenado a -80°C. PBS fresco foi então adicionado aos tubos para repor o abastecimento. Uma vez que todas as amostras foram colhidas nos pontos de tempo definidos, as soluções foram operadas através do ensaio de infectividade de células Vero para  
20 quantificar a quantidade de MMR liberada. Os valores de liberação foram relatados como MMR cumulativa liberada.

**Determinação da umidade residual.** A umidade residual da vacina em pó liofilizada da vacina, MMR em películas de seda e MMR em películas de seda liofilizadas foi medida pelo

método termo-gravimétrico, modificado a partir do Worrall e outros, 2001, que permite estimar o peso médio de três amostras de cada sistema de vacina após a secagem durante uma hora a 80°C. O peso de água perdido do sistema de vacina seco é expresso como uma percentagem.

**Calorimetria exploratória diferencial (DSC).** Amostras de 5 mg foram encapsuladas em recipientes de alumínio e aquecidas em um Instrumento TA Q100 DSC (New Castle, DE), com um fluxo de gás nitrogênio seco purgado de 50 mL/minutos.

10 A T<sub>g</sub> foi registrada como a temperatura inicial da curva de descontinuidade do fluxo de aquecimento versus temperatura. Todas as medições foram efetuadas a 10°C/minutos. As amostras foram inicialmente equilibradas a -20°C durante 5 minutos e em seguida aquecidas a 200°C, mantidas a 200°C por 5 minutos,

15 seguido por resfriamento para 20°C. Medições Nano-DSC foram realizadas em um Modelo CSD 6100 Nano II de Calorimetria Exploratória Diferencial (Lindon, UT). As amostras foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL. A taxa de varredura foi fixada em 1°C/minuto para ambas as operações de

20 aquecimento e resfriamento a partir de 0 a 100°C.

**Espalhamento de luz dinâmico (DLS).** O tamanho das partículas do vírus do sarampo, caxumba e rubéola como uma função da temperatura foi monitorado por DLS. Uma alíquota de 400 µL de 2 mg/mL da solução de amostra foi mg/mL solução

de amostra foi filtrada através de um filtro de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  (GE, Fairfield, CT). DLS foi conduzido empregando o sistema DLS DynaPro (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) com os parâmetros fixados em tempo de aquisição de 60 segundos, número de aquisição 10 e energia a laser de 75 mW. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da amostra foi transferida para uma cuveta Eppendorf UVette isenta de proteína, isenta de DNase, isenta de RNase a ser inserida no DLS. O diâmetro hidrodinâmico eficaz foi calculado a partir do coeficiente de difusão, através da equação de Stokes-Einstein usando o método de cumulantes (Koppel, 1972).

### Exemplo 3. Referências

Adu, F.D., Adedeji, A.A., Esan, J.S. and Odusanya, O.G. (1996). Live viral vaccine potency: an index for assessing the cold chain system. *Public Health*. 110: 325-330.

Altman, G.H., Diaz, F., Jukuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Richmond, J., and Kaplan, D.L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 24: 401-416.

Arora, A., Prausnitz, M. and Mitragotri, S. (2008). Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 364: 227-236.

Arya, S.C. (2001). Stabilization of vaccines: to be or not to be. *Vaccine*. 19: 595-597.

Ausar, S.F., Hudson, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S.

and Middaugh, C.R. (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus like particles: effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 19478-19488.

5        Beauchamp, J. and Mansoor, O. (1992). Temperature and the storage of vaccines. *New Zealand Medical Journal*. 105: 135.

          Bishai, D.M. (1992). Vaccine storage practices in pediatric offices. *Pediatrics*. 89: 193-196.

10       Brandau, D.T., Jones, L.S., Wiethoff, C.M., Rexroad, J. and Middaugh, C.R. (2003). Minireview: Thermal Stability of Vaccines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92(2): 218-231.

          Chen, D. and Kristensen, D. (2009). Opportunities and  
15 challenges of developing thermostable vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 8.5: 547-558.

          Cheriyan, E. (1993). Monitoring the vaccine cold chain. *Archives of disease in childhood*. 69: 600-601.

          Cheyne, J. (1989). Vaccine delivery management. *Reviews*  
20 *of infectious diseases*. 11: S617-S622.

          Colinet G., Rossignol, J. and Peetermans, J. (1982). A study of the stability of a bivalent measles-mumps vaccine. *Journal of biological standardization*. 10: 341-346.

          Creighton, T.E. (1990). Protein folding. *Biochemical*



*Journal*. 270: 1-16.

Dorsett, P.H., Miller, D.C., Green, K.Y. and Byrd, F.I. (1985). Structure and function of the rubella virus proteins. *Reviews of Infectious Diseases*. 7(1): S150-S156.

5 Evans, M. and Pope, M. (1995). Vaccine handling and storage in general practice. *Health Trends*. 27: 124-126.

Galazka, A., Milstien, J., and Zaffran, M. (1998). Thermostability of Vaccines. In: Global Programme for Vaccines and Immunization. World Health Organization,  
10 Geneva.

Hall, W.W. and Martin, S.J. (1973). Purification and Characterization of Measles Virus. *Journal of General Virology*. 19: 175-188.

Health Protection Agency. (2007). Foreign travel  
15 associated illness, England, Wales, and Northern Ireland. 2007 Report.[Online]. Accessed at  
[hpa.org.uk/Publications/InfectiousDiseases/TravelHealth/0708Foreigntravelassociatedillness2007/](http://hpa.org.uk/Publications/InfectiousDiseases/TravelHealth/0708Foreigntravelassociatedillness2007/).

Hofmann, S., Wong Po Foo, C.T., Rossetti, F., Textor, M., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Merkle, H.P. and  
20 Meinel I. (2006). Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 111: 219-227.

Horan, R.I., Antle, K., Collette, A.I., Wang, Y., Huang,

J. and Moreau, J.E.. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*. 26: 3385-3393.

Hu, X., Kaplan, D.L. and Cebe, P. (2007). Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochimica Acta*. 461: 137-144.

Hubschen, J.M., Kremer, J.R., de Landtsheer, S., and Muller, C.P. (2008). A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *Journal of Virological Methods*. 149: 246-250.

Jin, H.J. and Kaplan, D.L. (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. 424: 1057-1061.

Kingston, R.L., Gay, L.S., Baase, W.S. and Matthews, B.W. (2008). Structure of the nucleocapsid-binding domain from the mumps virus polymerase; An example of protein folding induced by crystallization. *Journal of Molecular Biology*. 379(4): 719-731.

Kissman, J., Ausar, S.F., Rudolph, A., Braun, C., Cape, S.P., Sievers, R.E., Federspiel, J., Joshi, S.B. and Middaugh C.R. (2008). Stabilization of measles virus for vaccine formulation. *Human Vaccines*. 4(5): 350-359.

Koppel, D.E. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *Journal of Chemical Physics*. 57(11): 4814-4820.

Kubar, A., Yapar, M., Besirbellioglu, B., Avci, Y., and Guney, C. (2004). Rapid and quantitative detection of mumps virus RNA by one-step real-time RT-PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 49: 83-88.

5 Kumakura, M. (1995). Effect of heat treatment on enzyme entrapped into polymer gels. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. L1-L6.

Lee, S., Schoneich, C., and Borchardt, R.T. (1994). Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms  
10 of oxidation and strategies of stabilization. *Biotechnology and Bioengineering*. 48: 490-500.

Liddle, J.L.M. and Harris, M.F. (1995). How general practitioners store vaccines. A survey in south-western Sydney. *The Medical Journal of Australia*. 162: 366-368.

15 Malvoisin, E. and Wild T.F. (1993). Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *Journal of General Virology*. 74: 2365-2372.

Manning, M.D. and Borchardt, P.K. (1989). Stability of  
20 pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Research*. 6:903-918.

McAleer, W.J., Markus, H.Z., McLean, A.A., Buynak, E.B. and Hilleman, M.R. (1980). Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer.

Middaugh, C.R. (1996). Formulation and delivery of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 85:1259-1260.

5 Moss, W.J. and Griffin, D.E. (2006). Global measles elimination. *Nature Review Microbiology*. 4: 900-908.

Nakhasi, H.L., Cao, X., Rouault, T.A. and Liu, T. (1991). Specific binding of host cell proteins to the 3'-terminal stem-loop structure of rubella virus negative-strand RNA. *Journal of Virology*. 5961-5967.

10 Ohtake, S., Arakawa, T. and Koyama, A.H. (2010). Arginine as a Synergistic Virucidal Agent. *Molecules*. 15: 1408-1424.

Packer, L., Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (2002). *Methods in enzymology*. Ed. Packer, L. Academic Press, 15 California, USA. Volume 349.

Pritchard, E., Szybala, C., Boison, D., and Kaplan, D.L. (2010). Silk fibroin encapsulated powder reservoirs for sustained release of adenosine. *Journal of Controlled Release*. 144 (2): 159-167.

20 Rexroad, J., Evans, R.K. and Middaugh, C.R. (2006). Effect of pH and ionic strength on the physical stability of adenovirus type 5. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95: 1469, 1479.

Roberts, C.J. (2007). Non-Native Protein Aggregation

Kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. 98 (5): 927-938.

Russell, B., Selzer, G. and Goetze, H. (1967). The Particle size of rubella virus. *Journal of General Virology*. 1: 305-310.

5 Schalk, J.A.C., de Vries, C.G.J.C.A, and Jongen, P.M.J.M. (2005). Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. *Biologicals*. 33: 71-79

10 Tsioris, K., Raja, W.K., Pritchard, E.M., Panilaitis, B., Kaplan, D.L. and Omenetto, F.G. (2011). Fabrication of silk microneedles for controlled-release drug delivery. *Advanced Functional Materials*. Published online: December 2, 2011.

15 Vepari, C. and Kaplan, D.L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 32 (8-9): 991-1007.

Wang, X., Yucel, T., Lu, Q., Hu, X. and Kaplan, D.L. (2010). Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*. 31: 1025-1035.

20 Wang, X., Zhang, X, Castellot, J., Herman, I., Iafrati, M. and Kaplan, D.L. (2008). Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings to modulate vascular cell responses. *Biomaterials*. 29: 894-903.

Waterman, K.\*and Adami, R.C. (2005). Accelerated aging:

Prediction of chemical stability of pharmaceuticals.  
*International Journal of Pharmaceutics*. 293: 101-125.

Wightman, G., Beard, J. and Allison, R. (2007). An investigation into the behaviors of air rifle pellets in ballistic gel and their interaction with bone. *Forensic Science International*. 200 (1-3): 41-49.

WHO. (1982). Report of Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-second report. Requirement for measles vaccine (live). Addendum 1981, Geneva, World Health Organization. (Technical Report Series no. 673, Annex 6).

WHO. (1994). Report of Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccines (live). Geneva, World Health Organization. (Technical Report Series, No. 840, Annex 39).

WHO (2006). Temperature sensitivity of vaccines. WHO publications. [Online]. The reference can be accessed at [whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO IVB 06.10 eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.10_eng.pdf)

WHO. (2011). Measles. Media centre fact sheet N°286. October 2011. [online]. The reference can be accessed at [who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/)

WHO, UNAIDA, World Bank, UNESCO, UNFPA (2000). Health: a key to prosperity. In: Success Stories in Developing Countries. World Health Organization, Geneva.

Wild, T.F., Malvoisin, E. and Buckland, R. (1991).

Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *Journal of General Virology*. 72: 439-442.

5 Woelk, C.H., Pybus, O.G., Jin, L., Brown, D.W.G. and Holmes, E.C. (2002). Increased positive selection pressure in persistent (SSPE) versus acute measles virus infections. *Journal of General Virology*. 83: 1419-1430.

10 Wolfson, L.J., Gasse, F., Lee-Martin, S., Lydon, P., Magan, A., Tibouti, A., Johns, B., Hutubessy, R., Salama, P. and Okwo-Bele, J. (2008). Estimating the costs of achieving the WHO-UNICEF Global Immunization Vision and Strategy, 2006-2015. *Bulletin of the World Health Organization*. 86: 27-39.

15 Worrall, E.E., Litamoi, J.K., Seck, B.M. and Ayelet, G. (2001). Xerovac: an ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated Rinderpest and Peste des Petits ruminants vaccines. *Vaccine*. 19: 834-839.

20 Zhou, D., Porter, W.R. and Zhang, G.G.Z. (2009). Chapter 5 - Drug stability and degradation studies. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. Ed: Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Liu, L. and Porter, W.R. Pg: 87-124.

Zweig, S.E. (2006). Advances in vaccine stability monitoring technology. *Vaccine*. 24: 5977-5985.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição estável em armazenamento compreendendo uma matriz de fibroína de seda e um agente ativo distribuído  
5 na mesma, **caracterizada pelo** fato de que o agente ativo é um imunógeno selecionado do grupo que consiste em um vírus vivo atenuado; um vírus inativado; uma subunidade viral; um vetor viral; uma bactéria viva atenuada; uma bactéria morta; uma bactéria inativada; uma subunidade bacteriana; e uma toxina  
10 inativada de um patógeno; e o agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade original quando a composição é (a) submetida a pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento, ou (b) mantida durante, pelo menos, por cerca de 24 horas a uma temperatura acima de 0°C, ou (c)  
15 ambos (a) e (b).

2. Composição, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizada pelo** fato de que a matriz de fibroína de seda é uma solução.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada pelo** fato de que a matriz de fibroína de seda  
20 está em um estado de formato sólido.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** fato de que o estado de formato sólido é



uma película, uma fibra, uma partícula, um gel, um hidrogel ou uma composição dos mesmos.

5 5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizada pelo** fato de que a composição é liofilizada.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 e 5, **caracterizada pelo** fato de que a composição é micronizada.

10 7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pelo** fato de que a composição micronizada compreende nanopartículas ou micropartículas.

15 8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada pelo** fato de que as nanopartículas ou micropartículas têm um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 1.000  $\mu\text{m}$ .

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4 a 8, **caracterizada pelo** fato de que compreende, adicionalmente, um aditivo distribuído através da matriz de fibroína de seda.

20 10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada pelo** fato de que o aditivo é selecionado a partir de um agente estabilizador, um veículo farmacologicamente aceitável, ou quaisquer combinações dos mesmos.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o imunógeno é derivado do vírus da hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliovírus, *Neisseria meningitidis* C, Influenza, Varicela, *Mycobacteria tuberculosis* ou Bacilo de Calmette-Guérin, toxóide tetânico, toxóide diftérico e *Bordetella pertussis*.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o imunógeno é uma combinação de imunógenos selecionados do grupo consistindo em DTaP, DTWP, DTWP hepB, DTP hep B Hib, DTdaP Hep B Hib IPV e quaisquer combinações dos mesmos.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o imunógeno é um vírus vivo, atenuado.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o vírus vivo, atenuado é um vírus envelopado.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o vírus envelopado é selecionado do grupo consistindo em *Paramyxoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdovirus*, *Retroviridae* e quaisquer combinações destes.

16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, **caracterizada pelo fato de que o vírus é varicela.**

17. Composição, de acordo com qualquer uma das  
5 reivindicações 13 a 15, **caracterizada pelo fato de que o vírus é influenza.**

18. Composição, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada pelo fato de que o vírus vivo, atenuado, provoca sarampo, caxumba ou rubéola.**

10 19. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é um vírus vivo, atenuado, não envelopado.**

20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada pelo fato de que o vírus não envelopado é o**  
15 **rotavírus, reovírus, vírus da hepatite, vírus da raiva ou poliovírus.**

21. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é uma bactéria viva, atenuada; uma bactéria morta; ou uma bactéria**  
20 **inativada.**

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada pelo fato de que a bactéria é *Mycobacteria tuberculosis*, bacilo de Calmette-Guérin ou *Bordetella pertussis*.**

23. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é uma subunidade bacteriana.**

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada pelo fato de que a subunidade bacteriana é**  
5 **derivada de *Neisseria meningitidis* tipo C, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, ou *streptococcus* do grupo B.**

25. Composição, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada pelo fato de que a subunidade é um**  
10 **polissacarídeo bacteriano.**

26. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é uma subunidade viral.**

15 27. Composição, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada pelo fato de que a subunidade viral é derivada do vírus da hepatite B ou papilomavírus humano.**

28. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é recombinante.**

20 29. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de que o imunógeno é um produto de vacina selecionado do grupo consistindo em vacina contra o Antraz (BioThrax); BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) (Tice, Mycobax); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP (Tripedia);**

DTaP/Hib (TriHIBit); DTap-IPV (Kinrix); DTap-HepB-IPV (Pediatrix); DTap-IPV/Hib (Pentacel), DT (vacina contra difteria mais vacina contra o tétano) (Sanofi), vacina Hib (ACTHib); DT (Massachusetts), vacina Hib (PevaxHIB);

5 Hib/Hep B (Comvax); Hep A (Havrix), Vacina contra hepatite A, hep A (Vaqta), Vacina contra hepatite A, hep B (Engerix-B), vacina contra hepatite B, Hep B (Recombivax), vacina contra hepatite B; vacina contra HepA/HepB (Twinrix);

10 Papilomavírus Humano (HPV) (Gardasil); vacina contra Influenza (Afluria); vacina contra Influenza (Fluarix); vacina contra Influenza (FluLaval); vacina contra Influenza (Fluvirin); Vacina contra influenza (Fluzone); vacina contra influenza (FluMist); IPV (Ipol), vacina contra a poliomielite, vacina contra a encefalite japonesa (JE-Vax);

15 vacina contra a encefalite japonesa (Ixiaro); vacina meningocócica (Menactra); vacina tríplice viral (MMR-II); vacina MMRV (ProQuad); vacina pneumocócica (Pneumovax); vacina pneumocócica (Prevenar); poliovírus inativado (Poliovax), vacina contra poliomielite; vacina antirábica

20 (Imovax); vacina antirábica (RabAvert); vacina contra o rotavírus (RotaTeg); vacina contra o rotavírus (Rotarix), vacina Td (Decavac); vacina Td (Massachusetts); vacina DTap (Adacel); vacina DTap (Boostrix); tifoide (inativada-Typhim Vi), vacina contra o tifo; Tifoide (oral - Ty21a), vacina

contra o tifo; Vaccinia (ACAM2000), vacina contra varicela (Varivax); vacina contra a febre amarela (YF-Vax); vacina Zoster (Zostavax) e qualquer combinações.

30. Método para preparação de uma composição estável em  
5 armazenamento de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 a 10, 11 a 29, 36, 37 e 38, o método **caracterizado pelo** fato de que compreende as etapas de:

a. fornecimento de uma solução de fibroína de seda que compreende pelo menos um agente ativo, e

10 b. secagem da solução de fibroína de seda da etapa (a) para formar uma fibroína de seda em estado sólido, obtendo-se assim uma composição em que o pelo menos um agente ativo retém pelo menos cerca de 30% da sua bioatividade inicial após armazenamento.

15 31. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado pelo** fato de que compreende, adicionalmente, a liofilização da fibroína de seda em estado sólido a partir da etapa (b).

20 32. Método, de acordo com as reivindicações 30 ou 31, **caracterizado pelo** fato de que compreende, adicionalmente, pós-tratamento da composição.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado por** o pós-tratamento altera a cristalinidade da composição.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **caracterizado pelo** fato de que o pós-tratamento constitui no contato com a composição com metanol ou etanol, submetendo a composição ao cisalhamento, submetendo a composição ao campo elétrico, submetendo a composição à pressão, ou contatando a composição com sal.

35. Método, de acordo com as reivindicações 30, 31, 32, 33 ou 34, **caracterizado pelo** fato de que compreende, adicionalmente, a redução da fibroína de seda em estado sólido da etapa (b) por um dispositivo mecânico para obtenção de partículas micronizadas.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo** fato de que o agente de estabilização é selecionado a partir do grupo consistindo em um sacarídeo, um álcool de açúcar, um íon, um agente tensoativo, e quaisquer combinações dos mesmos.

37. Composição, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizada pelo** fato de que o sacarídeo é sacarose.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o vírus vivo atenuado ou vírus inativado é um vírus envelopado selecionado do grupo que consiste em varicela, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus do sarampo alemão, vírus sincicial respiratório, vírus da febre amarela, e o vírus da gripe.

39. Método para estabilização de um imunógeno caracterizado pelo fato de que compreende misturar um imunógeno e uma solução de fibroína de seda, em que o imunógeno é selecionado do grupo consistindo em um vírus vivo, atenuado; um vírus inativado; uma subunidade viral; um  
5 vetor viral; uma bactéria viva, atenuada; uma bactéria morta; uma bactéria inativada; uma subunidade bacteriana; e uma toxina inativada a partir de um patógeno.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39,  
10 caracterizado pelo fato de que compreende ainda um estado de formato sólido a partir da solução de fibroína de seda.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40,  
caracterizado pelo fato de que o estado de formato sólido consiste em um filme, uma fibra, um hidrogel, um esqueleto,  
15 um emaranhado, uma partícula, uma matriz liofilizada, uma agulha, e uma composição dos mesmos.



Resumo da Patente de Invenção para: "COMPOSIÇÕES E MÉTODOS  
PARA A ESTABILIZAÇÃO DE AGENTES ATIVOS"

O presente documento provê métodos e composições para  
estabilização de agentes ativos. Os agentes ativos são  
5 distribuídos, misturados ou encapsulados em uma matriz de  
fibroína de seda, desse modo retendo a bioatividade dos  
agentes ativos quando do armazenamento e/ou transporte. Em  
algumas modalidades, as composições de vacina em seda  
estáveis em armazenamento são também providas no presente  
10 documento.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### Código de Controle

#### Campo 1



109A3DB8D53183BB

#### Campo 2



2D888CE59ED39501

### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIAS.txt
- Data de Geração do Código: 20-12-2013
- Hora de Geração do Código: 13:38:14
- Código de Controle:
  - Campo 1: 109A3DB8D53183BB
  - Campo 2: 2D888CE59ED39501