



* B R 1 2 2 0 2 0 0 0 2 8 5 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122020000285-9 B1

(22) Data do Depósito: 19/04/2007

(45) Data de Concessão: 09/05/2023

(54) Título: FORMULAÇÃO QUE INIBE A AGREGAÇÃO INDUZIDA POR SILICONE DE UM CONJUGADO POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA COMPREENDIDO EM UM MEIO DE RECIPIENTE SILICONIZADO

(51) Int.Cl.: A61K 47/26; A61K 39/09; A61K 39/095; A61K 47/64; A61K 39/00.

(52) CPC: A61K 47/26; A61K 39/09; A61K 39/092; A61K 39/095; A61K 47/646; (...).

(30) Prioridade Unionista: 26/04/2006 US 60/795,261.

(73) Titular(es): WYETH.

(72) Inventor(es): KHANDKE LAKSHMI; YING CHEN; HANYOUNG HAN; ROBERT CHANCEY SEID JR.; XUDONG YANG; ZHAOWEI JIN; JEE LOON LOOK; RONALD MALONE.

(86) Pedido PCT: PCT US2007066959 de 19/04/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/127665 de 08/11/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/01/2020

(62) Pedido Original do Dividido: PI0710918-0 - 19/04/2007

(57) Resumo: A presente invenção se refere a uma necessidade contínua na técnica para melhorar a estabilidade de composições imunogênicas, tais como conjugados de polissacarídeo-proteína e imunogênicos de proteína. A invenção se refere, amplamente, às novas formulações as quais estabilizam e inibem a precipitação de composições imunogênicas. Mais particularmente, a invenção descrita aqui antes se dirige a uma necessidade na técnica por formulações as quais estabilizam e inibem a formação de partícula (por exemplo, agregação, precipitação) de composições imunogênicas as quais são processadas, desenvolvidas, formuladas, fabricadas e/ou armazenadas em meios recipientes, tais como fermentadores, biorreatores, frascos, sacos, seringas, rolas de borracha, tubulação e similares.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"FORMULAÇÃO QUE INIBE A AGREGAÇÃO INDUZIDA POR SILICONE DE UM CONJUGADO POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA COMPREENDIDO EM UM MEIO DE RECIPIENTE SILICONIZADO"**.

[001] Dividido do PI0710918-0, depositado em 19/04/2007.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere, de modo geral, aos campos de imunologia, bacteriologia, formulação de vacina, estabilidade de proteína e desenvolvimento de processo. Mais particularmente, a invenção se refere às novas formulações as quais inibem a precipitação de composições imunogênicas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] É geralmente aceito na técnica biofarmacêutica que aperfeiçoamento da estabilidade de uma composição imunogênica (por exemplo, um imunogênio de proteína, um conjugado de polissacarídeo-proteína) é um objetivo necessário e altamente desejável. Por exemplo, uma composição imunogênica deve parecer fresca, elegante e profissional quando administrada a um paciente. Quaisquer alterações na estabilidade e/ou aparência física da composição imunogênica, tal como alteração de cor, turvação ou escurecimento, podem fazer com que um paciente ou consumidor perca a confiança no produto. Além disso, em virtude do fato de muitas formulações imunogênicas serem distribuídas em recipientes com múltiplas doses, uniformidade do teor de dose do ingrediente ativo (por exemplo, um conjugado de polissacarídeo-proteína) ao longo do tempo deve ser assegurada (por exemplo, uma solução turva pode levar a um padrão de dosagem não uniforme). Adicionalmente, a composição imunogênica deve ser ativa por toda sua vida útil "esperada", em que qualquer decomposição da composição imunogênica em uma forma inativa ou de outro modo indesejada (por exemplo, um agregado) diminui a concentração total do produto.

[004] Vários relatos na literatura têm sugerido que a estabilidade de uma composição imunogênica em particular (por exemplo, um imunogênio de proteína, um conjugado de polissacarídeo-proteína) é, pelo menos em parte, dependente da proteína específica ou proteína-veículo (Ho et al., 2001; Ho et al., 2002; Bolgiano et al., 2001). Por exemplo, análise de estabilidade de polissacarídeos meningocócicos C (MenC) e polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib), conjugados a um toxoide do tétano (TT) ou uma proteína-veículo CRM₁₉₇, revelou diferentes perfis de estabilidade dependentes da proteína-veículo (Ho et al., 2002). Em outro estudo (Ho et al., 2001), conjugados de MenC-CRM₁₉₇ de dois fabricantes diferentes foram analisados (Ho et al., 2001), em que os conjugados de MenC-CRM₁₉₇ diferiam quando à sua química de conjugação e comprimento do polissacarídeo conjugado (ambos tendo a mesma proteína-veículo, CRM₁₉₇). Dados desse estudo ainda indicaram que fatores tais como química de conjugação (por exemplo, aaminação redutiva diretamente ou via um grupo espaçador químico), número de sítios de conjugação, comprimento da cadeia de polissacarídeo, pH, tampão de armazenamento, temperatura(s) de armazenamento e ciclos de congelamento/descongelamento também influenciam a estabilidade de uma composição imunogênica.

[005] Assim, quando de desenvolvimento de uma formulação para uma composição imunogênica, muitos fatores devem ser considerados para assegurar um produto seguro, estável, robusto e com custo eficaz. Tais considerações incluem, mas não estão limitadas a, estabilidade química da composição imunogênica (por exemplo, hidrólise de sacarídeos, despolimerização de polissacarídeos, proteólise ou fragmentação de proteínas), estabilidade física/térmica da composição imunogênica (por exemplo, agregação, precipitação, adsorção), compatibilidade da composição imunogênica com o sistema de recipiente/vedação, intera-

ções entre a composição imunogênica e ingredientes inativos (por exemplo, tampões, sais, excipientes, crioprotetores), o processo de fabricação, a forma de dosagem (por exemplo, liofilizada, líquida), as condições ambientais encontradas durante transporte, armazenamento e manipulação (por exemplo, temperatura, umidade, forças de cisalhamento) e o extensão de tempo entre a fabricação e uso.

[006] Foi sugerido na técnica que óleo de silicone, o qual induz a alterações conformacionais secundárias e terciárias em proteínas, poderia ser responsável pela agregação/precipitação observada em determinados preparados farmacêuticos de proteína (Jones et al., 2005). Por exemplo, vários relatos na década de 1980 implicaram a liberação de óleo de silicone de seringas plásticas descartáveis como o agente causador na agregação de insulina humana (Chantelau e Berger, 1985; Chantelau et al., 1986; Chantelau, 1989; Bernstein, 1987; Baldwin, 1988; Collier e Dawson, 1985). Chantelau et al. (1986) observaram que, após três ou mais extrações de um preparado para dez doses de insulina (usando uma seringa descartável siliconizada), o frasco começava a ficar turvo em virtude de contaminação pelo óleo de silicone, desse modo, resultando em agregação e desativação da insulina (Chantelau et al., 1986). De forma paradoxal, o óleo de silicone é um componente necessário de seringas plásticas, uma vez que ele serve para lubrificar o êmbolo de borracha e facilitar a transferência do êmbolo para baixo do corpo da seringa (isto é, o óleo de silicone melhora a capacidade de fluxo em uma seringa da formulação).

[007] Além disso, o uso de óleo de silicone não está limitado à seringas, uma vez que ele é usado como um revestimento para frascos de vidro para minimizar a adsorção de proteína, como um lubrificante para prevenir conglomeração de rolhas de borracha durante procedimentos de enchimento, como um lubrificante crítico para a processabilidade/usinabilidade de vedações elastoméricas e de vidro e

como um lubrificante para facilitar a penetração de uma agulha em rolhas de borracha em frascos. Adicionalmente, a siliconização de seringas, frascos de vidro, rolhas de borracha e semelhantes não é um processo bem controlado, nem padronizado e, como tal, há um alto grau de variabilidade do teor de óleo de silicone de um lote para outro.

[008] Portanto, há uma necessidade contínua na técnica por formulações as quais intensificam a estabilidade e inibem a precipitação de composições imunogênicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] A presente invenção se refere, amplamente, às novas formulações as quais estabilizam e inibem a precipitação de composições imunogênicas. Mais especificamente, em determinadas modalidades, a presente invenção é dirigida a novas formulações as quais inibem a precipitação de composições imunogênicas compreendidas em meios recipiente. Em uma modalidade específica, a invenção é dirigida à novas formulações as quais estabilizam composições imunogênicas contra interações com óleo de silicone, forças de cisalhamento, agitação pelo transporte e semelhantes.

[0010] Assim, em determinadas modalidades, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam um conjugado de polissacarídeo-proteína, a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, (ii) um tensoativo e (iii) um ou mais conjugados de polissacarídeo-proteína. Em uma modalidade específica, a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína está compreendida em um meio recipiente. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquer, um cilindro graduado,

um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é siliconizado.

[0011] Em determinadas modalidades, a solução salina com pH tamponado das formulações tem um pH de 5,5 a 7,5. Em outras modalidades, o tampão é fosfato, succinato, histidina ou citrato. Em determinadas modalidades, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0, Em uma modalidade particular, a concentração final do tampão de succinato é de 5 mM. Em outras modalidades, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade particular, o sal na solução salina com pH tamponado é cloreto de sódio.

[0012] Em outra modalidade, o tensoativo das formulações é selecionado do grupo consistindo em polissorbato 20 (Tween[®]20), polissorbato 40 (Tween[®]40), polissorbato 60 (Tween[®]60), polissorbato 65 (Tween[®]65), polissorbato 80 (Tween[®]80), polissorbato 85 (Tween[®]85), Triton[®] N-101, Triton[®] X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipeptídico de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor EL[®]), lecitina de soja e um poloxâmero. Em uma modalidade particular, o tensoativo é polissorbato 80, Em outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de pelo menos 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em outras modalidades, a concentração final do polissorbato na formulação é 0,01% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,05% de polissorbato 80 em peso/volume de formulação. Em outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,1% de polissorbato 80 em peso/volume da for-

mulação. Em determinadas modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 1,0% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 10,0% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0013] Em outra modalidade, o conjugado de polissacarídeo-proteína compreende um ou mais polissacarídeos pneumocócicos. Em determinadas modalidades, o um ou mais polissacarídeos pneumocócicos são um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A. Em determinadas modalidades, a proteína da formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é selecionada do grupo consistindo em CRM₁₉₇, um toxoide do tétano, um toxoide do cólera, um toxoide de coqueluche, toxoide termicamente lábil de *E. coli* (LT), um toxoide de pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína A de adesina pneumocócica (PsaA), uma peptidase C5a de *Streptococcus*, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovalbumina, hemocianina do caramujo *megathura crenulata* (KLH), albumina de soro bovino (BSA) e derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD).

[0014] Em uma modalidade específica, a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado pneumocócico 7-valente (7vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S.*

pneumoniae sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0015] Em outra modalidade específica, a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é um conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0016] Em outras modalidades, a formulação ainda compreende

um ou mais polissacarídeos meningocócicos, uma ou mais proteínas antigênicas meningocócicas ou uma combinação dos mesmos. Em ainda outras modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais polissacarídeos estreptocócicos, uma ou mais proteínas antigênicas estreptocócicas ou uma combinação dos mesmos.

[0017] Em determinadas modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos adequados são descritos aqui abaixo.

[0018] Em outras modalidades, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam uma composição de peptidase C5a estreptocócica (SCP), a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, (ii) um tensoativo e (iii) uma peptidase C5a estreptocócica. Em uma modalidade específica, a formulação de SCP está compreendida em meios recipientes. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquero, um cilindro graduado, um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável.

[0019] Em outras modalidades, a solução salina com pH tamponado da formulação tem um pH de 5,5 a 7,5. Em outras modalidades, o tampão é succinato, histidina, fosfato ou citrato. Em uma modalidade específica, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0. Em outra modalidade específica, a concentração final do tampão de succinato é de 5 mM. Em ainda outras modalidades, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou

uma combinação dos mesmos.

[0020] Em determinadas modalidades, o tensoativo nas formulações é selecionado do grupo consistindo em polissorbato 20 (Tween[®]20), polissorbato 40 (Tween[®]40), polissorbato 60 (Tween[®]60), polissorbato 65 (Tween[®]65), polissorbato 80 (Tween[®]80), polissorbato 85 (Tween[®]85), Triton[®] N-101, Triton[®] X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipeptídico de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor EL[®]), lecitina de soja e um poloxâmero. Em uma modalidade específica, o tensoativo é polissorbato 80. Em determinadas modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,01% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 0,05% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 0,1% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 1,0% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 10,0% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0021] Em determinadas modalidades, a composição de SCP ainda compreende um ou mais polipeptídeos selecionados do grupo consistindo em um polipeptídeo estreptocócico, um polipeptídeo pneumocócico, um polipeptídeo meningocócico e um polipeptídeo estafilocócico. Em ainda outras modalidades, a composição de SCP ainda compreende um ou mais polissacarídeos selecionados do grupo consistindo em um polissacarídeo estreptocócico, um polissacarídeo pneumo-

cócico, um polissacarídeo meningocócico e um polissacarídeo estafilocócico.

[0022] Em outra modalidade, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos adequados são descritos aqui abaixo.

[0023] Em outra modalidade, a invenção é dirigida às formulações as quais inibem a precipitação induzida por silicone de um conjugado de polissacarídeo-proteína compreendido em um meio recipiente de silicone, a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, (ii) um sal de alumínio e (iii) um ou mais conjugados de polissacarídeo-proteína. Em determinadas modalidades, o meio recipiente sili-conizado é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquer, um cilindro graduado, um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável.

[0024] Em outras modalidades, a solução salina com pH tamponado da formulação tem um pH de 5,5 a 7,5. Em outras modalidades, o tampão é succinato, histidina, fosfato ou citrato. Em uma modalidade específica, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0, Em outra modalidade específica, a concentração final do tampão de succinato é de 5 mM. Em ainda outras modalidades, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade particular, o sal na solução salina com pH tamponado é cloreto de sódio.

[0025] Em outras modalidades, o sal de alumínio é hidróxido de

alumínio, fosfato de alumínio ou sulfato de alumínio. Em uma modalidade específica, o sal de alumínio é fosfato de alumínio.

[0026] Em determinadas modalidades, a formulação ainda compreende polissorbato 80 (Tween[®] 80). Em uma modalidade específica, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de pelo menos 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0027] Em outra modalidade, o conjugado de polissacarídeo-proteína compreende um ou mais polissacarídeos pneumocócicos. Em determinadas modalidades, o um ou mais polissacarídeos pneumocócicos são um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A.

[0028] Em determinadas modalidades, a proteína da formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é selecionada do grupo consistindo em CRM₁₉₇, um toxoide do tétano, um toxoide do cólera, um toxoide de coqueluche, toxoide termicamente lábil de *E. coli* (LT), um toxoide de pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína A de adesina pneumocócica (PsaA), uma peptidase C5a de *Streptococcus*, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovalbumina, hemocianina do caramujo "*keyhole limpet*" (KLH), albumina de soro bovino (BSA) e derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD).

[0029] Em uma modalidade particular, a formulação de conjugado

de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado pneumocócico 7-valente (7vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0030] Em outra modalidade específica, a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é um conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo

19A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0031] Em outras modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais polissacarídeos meningocócicos, uma ou mais proteínas antigênicas meningocócicas ou uma combinação dos mesmos.

[0032] Em ainda outras modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais polissacarídeos estreptocócicos, uma ou mais proteínas antigênicas estreptocócicas ou uma combinação dos mesmos.

[0033] Em determinadas modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos são descritos aqui abaixo.

[0034] Em outras modalidades, a presente invenção é dirigida às formulações as quais inibem a precipitação induzida por silicone de uma composição de peptidase C5a estreptocócica (SCP) compreendida em um meio recipiente siliconizado, a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, (ii) um sal de alumínio e (iii) uma peptidase C5a estreptocócica. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquer, um cilindro graduado, um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável.

[0035] Em outra modalidade, a solução salina com pH tamponado da formulação tem um pH de 5,5 a 7,5. Em outras modalidades, o tampão é succinato, histidina, fosfato ou citrato. Em uma modalidade específica, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0. Em outra modalidade, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto

de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos.

[0036] Em determinadas modalidades, a formulação ainda compreende polissorbato 80 (Tween® 80). Em uma modalidade específica, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de pelo menos 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0037] Em ainda outras modalidades, a composição de SCP ainda compreende um ou mais polipeptídeos selecionados do grupo consistindo em um polipeptídeo estreptocócico, um polipeptídeo pneumocócico, um polipeptídeo meningocócico e um polipeptídeo estafilocócico.

[0038] Em outras modalidades, a composição de SCP ainda compreende um ou mais polissacarídeos selecionados do grupo consistindo em um polissacarídeo estreptocócico, um polissacarídeo pneumocócico, um polissacarídeo meningocócico e um polissacarídeo estafilocócico.

[0039] Em ainda outras modalidades, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos são descritos aqui abaixo.

[0040] Em outras modalidades, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam uma composição de proteína 2086 de *N. meningitidis*, a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, (ii) um tensoativo e (iii) uma proteína 2086 de *N. meningitidis*. Proteínas 2086 de *N. meningitidis* exemplificativas são descritas aqui abaixo. Em uma modalidade específica, a formulação de proteína 2086 de *N. meningitidis* está compreendida em um meio recipiente. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquer, um cilindro graduado,

um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável.

[0041] Em outra modalidade, a solução salina com pH tamponado da formulação tem um pH de 5,5 a 7,5. Em outras modalidades, o tampão é succinato, histidina, fosfato ou citrato. Em uma modalidade específica, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0. Em outra modalidade específica, a concentração final do tampão de succinato é de 5 mM. Em outra modalidade, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos.

[0042] Em determinadas modalidades, o tensoativo nas formulações é selecionado do grupo consistindo em polissorbato 20 (Tween®20), polissorbato 40 (Tween®40), polissorbato 60 (Tween®60), polissorbato 65 (Tween®65), polissorbato 80 (Tween®80), polissorbato 85 (Tween®85), Triton® N-101, Triton® X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipeptídico de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor EL®), lecitina de soja e um poloxâmero. Em uma modalidade específica, o tensoativo é polissorbato 80. Em determinadas modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,01% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,05% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outras modalidades, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 0,1% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é de 1,0% de po-

lissorbato 80 em peso/volume da formulação. Em ainda outra modalidade, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 10,0% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0043] Em determinadas modalidades, a composição de proteína 2086 de *N. meningitidis* ainda compreende um ou mais polipeptídeos selecionados do grupo consistindo em um polipeptídeo estreptocócico, um polipeptídeo pneumocócico, um polipeptídeo meningocócico e um polipeptídeo estafilocócico. Em ainda outras modalidades, a composição de proteína 2085 de *N. meningitidis* ainda compreende um ou mais polissacarídeos selecionados do grupo consistindo em um polissacarídeo estreptocócico, um polissacarídeo pneumocócico, um polissacarídeo meningocócico e um polissacarídeo estafilocócico.

[0044] Em outra modalidade, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos são descritos aqui abaixo.

[0045] Em outras modalidades, a presente invenção é dirigida às formulações as quais inibem a precipitação induzida por silicone de uma composição de proteína 2086 de *N. meningitidis* compreendida em um meio recipiente siliconizado, a formulação compreendendo (i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, (ii) um tensoativo e (iii) uma proteína 2086 de *N. meningitidis*. Em determinadas modalidades, o meio recipiente é selecionado de um ou mais do grupo consistindo em um frasco, uma rolha para frasco, uma vedação para frasco, uma vedação de vidro, uma vedação de borracha, uma vedação plástica, uma seringa, uma rolha de seringa, um êmbolo de seringa, um frasco, um béquer, um cilindro graduado, um fermentador, um biorreator, tubulação, um tubo, um saco, um pote, uma ampola, um cartucho e uma caneta descartável.

[0046] Em outra modalidade, a solução salina com pH tamponado

da formulação tem um pH de 5,5 a 7,5. Em determinadas modalidades, o tampão é succinato, histidina, fosfato ou citrato. Em determinadas modalidades, o tampão é succinato em uma concentração final de 1 mM a 10 mM e um pH de 5,8 a 6,0. Em outra modalidade, o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos.

[0047] Em determinadas modalidades, a formulação ainda compreende polissorbato 80 (Tween®80). Em uma modalidade específica, a concentração final do polissorbato 80 na formulação é 0,01% a 10% de polissorbato 80 em peso/volume da formulação.

[0048] Em ainda outras modalidades, a composição de proteína 2086 de *N. meningitidis* ainda compreende um ou mais polipeptídeos selecionados do grupo consistindo em um polipeptídeo estreptocócico, um polipeptídeo pneumocócico, um polipeptídeo meningocócico e um polipeptídeo estafilocócico.

[0049] Em determinadas modalidades, a composição de proteína 2085 de *N. meningitidis* ainda compreende um ou mais polissacarídeos selecionados do grupo consistindo em um polissacarídeo estreptocócico, um polissacarídeo pneumocócico, um polissacarídeo meningocócico e um polissacarídeo estafilocócico.

[0050] Em ainda outra modalidade, a formulação ainda compreende um ou mais adjuvantes. Adjuvantes exemplificativos são descritos aqui abaixo.

[0051] Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir das modalidades da mesma e a partir das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0052] A Figura 1 mostra a estabilidade das formulações de peptidase C5a estreptocócica (SCP) (enchida em seringas) antes e após dois dias de ligeira agitação (60 cpm) em um agitador orbital horizon-

tal. Os dados apresentados na FIG. 1A é a estabilidade em dois dias da SCP formulada sem qualquer Tween[®] 80 (isto é, 0%), enquanto que os dados na FIG. 1B é a estabilidade em dois dias da SCP formulada com Tween[®] 80 a 0,025%. Os tampões usados nas formulações mostrados na FIG. 1A e FIG. 1B são solução salina tamponada com succinato (SBS), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

[0053] A Figura 2 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa BD Hypak, após duas horas, oito horas e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

[0054] A Figura 3 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa não siliconizada, após duas horas, oito horas e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

[0055] A Figura 4 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa Vetter, após duas horas, oito horas e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

[0056] A Figura 5 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa Schott TopPac, após duas horas, oito horas e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

[0057] A Figura 6 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com (FIG. 6A) e sem (FIG. 6B) AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa BD Baked, após duas horas, oito horas e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

[0058] A Figura 7 mostra a perda de antigenicidade total de 13vPnC formulada com (FIG. 7A) e sem (FIG. 7B) AlPO_4 (0,25 mg/ml) e enchida em uma seringa BunderGlas PS2, após duas horas, oito ho-

ras e vinte e quatro horas de agitação a 500 rpm e 2-8°C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0059] A presente invenção se dirige a uma necessidade contínua na técnica de aperfeiçoar a estabilidade de composições imunogênicas, tais como conjugados de polissacarídeo-proteína e imunogênios de proteína. Assim, a presente invenção se refere, amplamente, às novas formulações de tensoativo e/ou novas formulações de sal de alumínio as quais estabilizam e inibem a precipitação de composições imunogênicas. Mais particularmente, a invenção descrita aqui depois se dirige a uma necessidade na técnica por formulações as quais estabilizam e inibem a formação de partícula (por exemplo, agregação, precipitação) de composições imunogênicas as quais são processadas, desenvolvidas, formuladas, fabricadas e/ou armazenadas em meios recipientes, tais como fermentadores, biorreatores, frascos, sacos, seringas, rolhas de borracha, tubulação e semelhantes.

[0060] Conforme apresentado acima no Antecedente da Invenção, vários fatores influenciam a estabilidade de composições imunogênicas incluindo, mas não limitado a, estabilidade química da composição imunogênica, estabilidade física/térmica da composição imunogênica, compatibilidade da composição imunogênica com o sistema de vedação/recipiente, interações entre a composição imunogênica e ingredientes inativos (por exemplo, tampões, sais, excipientes, crioprotetores), processos de fabricação, forma de dosagem, condições ambientais encontradas durante transporte, armazenamento e manipulação (por exemplo, temperatura, umidade, forças de cisalhamento) e a extensão de tempo entre a fabricação e uso.

[0061] A estabilidade de uma composição imunogênica da invenção é prontamente determinada usando métodos os quais são bem conhecidos e rotineiros para aqueles versados na técnica. Por exemplo, uma composição imunogênica é avaliada com relação à estabili-

dade, agregação, imunogenicidade, formação de partícula, perda de proteína (concentração) e semelhantes através de métodos incluindo, mas não limitado a, dispersão de luz, densidade óptica, centrifugação em velocidade de sedimentação, centrifugação em equilíbrio de sedimentação, dicroísmo circular (CD), ensaio de Lowry, ensaio com ácido bicinconínico (BCA), ligação de anticorpo e semelhantes.

[0062] Conforme apresentado em detalhes aqui, a presente invenção se refere aos resultados inesperados e surpreendentes de que formulação de uma composição imunogênica com um tensoativo, tal como Tween[®] 80, intensifica significativamente a estabilidade e inibe a precipitação de uma composição imunogênica. Por exemplo, foi observado na presente invenção (por exemplo, veja Exemplo 2), que um conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC), formulado em solução salina tamponada e enchido em uma seringa com uma única dose, começaria a se precipitar de solução dentro de dez minutos a 2-8°C quando de ligeira agitação via um agitador orbital horizontal (o agitador orbital horizontal foi usado para simular as condições típicas de processo, transporte e armazenamento de uma composição imunogênica de 13vPnC). Contudo, surpreendentemente, foi observado que a 13vPnC, formulada em solução salina tamponada e Tween[®] 80 a 0,001%, enchida em uma seringa com uma única dose e ligeiramente agitada a 2-8°C, era estável durante vinte e cinco dias sem nenhum sinal visível de precipitação (dados não mostrados). Assim, esses dados demonstraram que a adição de um tensoativo (por exemplo, Tween[®] 80) a uma formulação de composição imunogênica intensifica a estabilidade da composição imunogênica.

[0063] Um segundo estudo de estabilidade da 13vPnC ainda confirmou que a adição de um tensoativo à formulação intensificou significativamente a estabilidade da 13vPnC. Por exemplo, a estabilidade (isto é, avaliada através de medição da alteração na antigenicidade da

13vPnC) de uma formulação de 13vPnC com Tween® 80 a 0,05% (Tabela 1) e sem Tween® 80 (0,0%, Tabela 1) foi avaliada durante um período de tempo de duas horas. Conforme mostrado na Tabela 1, houve uma diminuição significativa na antigenicidade dos polissacarídeos dos treze sorotipos (formulados sem Tween® 80) dentro do ensaio de duas horas. Muito dramaticamente, contudo, a formulação de 13vPnC compreendendo Tween® 80 a 0,05% (Tabela 1), demonstrou estabilidade robusta por todo o ensaio de antigenicidade de duas horas. Foi também observado que a 13vPnC formulada em garrafas de vidro de 250 mL com Tween® 80 a 0,01% ou Tween® 80 a 0,05% poderia suportar forças de cisalhamento significativas induzidas via turbilhamento das formulações durante trinta minutos a 2-8°C, com pouca ou nenhuma perda na antigenicidade (por exemplo, veja Exemplo 2, Tabela 2).

[0064] Em outros experimentos (Exemplo 3), foi demonstrado que a estabilidade de uma composição de peptidase C5a estreptocócica (SCP) imunogênica foi grandemente intensificada quando formulada com um tensoativo, tal como Tween® 80. Por exemplo, conforme mostrado na FIG. 1A, após dois dias de turbilhamento, uma SCP (55 ng/ml) formulada em tampão de succinato a 5 mM (pH de 6,0), um tampão de fosfato a 10 mM (pH de 7,0 e 7,4) ou um tampão de Tris a 10 mM (pH de 7,5), houve uma diminuição significativa (por exemplo, mais de 90%) na concentração de SCP. Contudo, conforme mostrado na FIG. 1B, a adição de Tween® 80 a 0,025% às formulações de SCP/succinato, SCP/fosfato e SCP/Tris, antes de turbilhamento durante dois dias, inibiu completamente a perda de SCP, a qual foi observada na FIG. 1A.

[0065] Uma composição imunogênica de 13vPnC da invenção também pode ser formulada com ou sem um adjuvante, tal como fosfato de alumínio (AlPO₄). Assim, em uma série distinta de experimen-

tos (Exemplo 4), composições imunogênicas de 13vPnC foram formuladas em tampão de succinato a 5 mM (pH de 5,8), NaCl a 0,85% e AlPO_4 (0,25 mg de alumínio/ml), sem a adição de um tensoativo (por exemplo, nenhum Tween[®] 80 foi incluído na formulação).

[0066] Nesses experimentos, a composição imunogênica de 13vPnC (formulada na presença de AlPO_4) foi enchida em vários meios recipientes siliconizados e não siliconizados (por exemplo, veja Tabela 3) e submetida às condições simuladas de transporte de manipulação via agitação a 2-8°C. Foi observado nesses experimentos (Exemplo 4) que o meio recipiente com maior teor de silicone exibiu um maior grau de formação de partícula de 13vPnC e maior percentual de perda de antigenicidade de 13vPnC. Uma análise por FTIR das partículas indicou que as partículas consistiam em proteína e silicone (dados não mostrados) e que cerca de 85% da 13vPnC estão ligados ao AlPO_4 , em que os 15% restantes eram 13vPnC livre (não ligada ao AlPO_4) em solução.

[0067] Em outro experimento comparando composições imunogênicas de 13vPnC formuladas com e sem AlPO_4 , as quais foram, então, enchidas em seringas idênticas, foi observado que a 13vPnC formulada sem AlPO_4 sustentou maiores perdas de antigenicidade do que a 13vPnC com AlPO_4 nas seringas testadas (veja, por exemplo, FIG. 6 e FIG. 7).

[0068] Assim, a invenção conforme apresentado aqui, é dirigida às novas formulações as quais estabilizam e inibem a agregação ou precipitação de composições imunogênicas, tais como conjugados de polissacarídeo-proteína (por exemplo, uma 13vPnC) e imunogênios de proteína (por exemplo, uma peptidase C5a estreptocócica, proteína 2086 de *N. meningitidis*) contra os vários fatores os quais influenciam a estabilidade de composições imunogênicas (por exemplo, forças de cisalhamento, agitação quando de transporte, interações com óleo de

silicone, adsorção, processos de fabricação, temperatura, umidade, extensão de tempo entre fabricação e uso, etc.).

[0069] Em determinadas modalidades, a invenção é dirigida a uma formulação a qual estabiliza um conjugado de polissacarídeo-proteína, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um tensoativo e um ou mais conjugados de polissacarídeo-proteína. Em outras modalidades, a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína está compreendida em um meio recipiente. Em outra modalidade, a invenção é dirigida a uma formulação a qual estabiliza uma composição de peptidase C5a estreptocócica (SCP), a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, um tensoativo e uma peptidase C5a estreptocócica. Em determinadas modalidades, a formulação de SCP está compreendida em um meio recipiente. Em outra modalidade, a invenção é dirigida a uma formulação a qual estabiliza uma composição de proteína 2086 de *N. meningitidis*, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um tensoativo e uma proteína 2086 de *N. meningitidis*. Em determinadas modalidades, a formulação 2086 meningocócica está compreendida em um meio recipiente.

[0070] Em determinadas modalidades, a invenção é dirigida a uma formulação a qual inibe a precipitação induzida por silicone de um conjugado de polissacarídeo-proteína compreendido em um meio recipiente siliconizado, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um sal de alumínio e um ou mais conjugados de polissacarídeo-proteína. Em outra modalidade, a invenção é dirigida a uma formulação a qual inibe a precipitação induzida por silicone de uma

composição de peptidase C5a estreptocócica (SCP) compreendida em um meio recipiente siliconizado, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, um sal de alumínio e uma peptidase C5a estreptocócica. Em determinadas modalidades, a invenção é dirigida a uma formulação a qual inibe a precipitação induzida por silicone de uma composição de proteína 2086 de *N. meningitidis* compreendida em um meio recipiente siliconizado, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um sal de alumínio e uma proteína 2086 de *N. meningitidis*.

[0071] Em ainda outras modalidades, a invenção é dirigida a uma formulação que otimiza a estabilidade de antígeno e ligação percentual a um adjuvante de sal de alumínio (por exemplo, $AlPO_4$) de uma proteína 2086 de *N. meningitidis*, a formulação compreendendo uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um tensoativo, um sal de alumínio e uma proteína 2086 de *N. meningitidis*. Em determinadas modalidades, a formulação está em um meio recipiente.

[0072] Conforme definido aqui, os termos "precipitação", "precipitado", "formação de partícula", "turvação" e "agregação" podem ser usados permutavelmente e se destinam a se referir a qualquer interação física ou reação química a qual resulta na "agregação" de um conjugado de polissacarídeo-proteína ou um imunogênio de proteína (ou polipeptídeo). O processo de agregação (por exemplo, agregação de proteína) é bem conhecido (mas não bem compreendido) e descrito na técnica e é, frequentemente, influenciado por numerosos estresses físico-químicos, incluindo calor, pressão, pH, agitação, forças de cisalhamento, congelamento/descongelamento, desidratação, metais pesados, compostos fenólicos, óleo de silicone, desnaturantes e seme-

lhantes.

[0073] Conforme definido aqui, um "conjugado de polissacarídeo-proteína", um "conjugado pneumocócico", um "conjugado pneumocócico 7-valente (7vPnC)", um "conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC)", uma "composição imunogênica de peptidase C5a estreptocócica (SCP)" e "uma composição imunogênica de proteína 2086 de *N. meningitidis*" da invenção inclui formulações líquidas, formulações líquidas congeladas e formulações sólidas (por exemplo, congeladas a seco ou liofilizadas).

A. TENSOATIVOS

[0074] Conforme apresentado acima, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam e inibem a agregação de composições imunogênicas contra os vários fatores os quais influenciam a estabilidade de composições imunogênicas (por exemplo, forças de cisalhamento, agitação quando de transporte, interações com óleo de silicone, adsorção, processos de fabricação, temperatura, umidade, extensão de tempo entre fabricação e uso, etc.). Em determinadas modalidades, a invenção é dirigida às formulações compreendendo um tensoativo.

[0075] Um tensoativo (ou um agente superfície-ativo) é geralmente definido como (a) uma molécula ou composto compreendendo um grupo ou porção hidrofílica e um grupo ou porção lipofílica (hidrofóbica) e/ou (b) uma molécula, substância ou composto que diminui ou reduz a tensão de superfície de uma solução. Conforme definido aqui, um "tensoativo" da presente invenção é qualquer molécula ou composto que diminui a tensão de superfície de uma formulação de composição imunogênica.

[0076] Um tensoativo usado em uma formulação da presente invenção compreende qualquer tensoativo ou qualquer combinação de tensoativos a qual estabiliza e inibe a agregação de uma composição

imunogênica descrita aqui. Assim, um tensoativo da invenção inclui, mas não está limitado a, polissorbato 20 (Tween[®]20), polissorbato 40 (Tween[®]40), polissorbato 60 (Tween[®]60), polissorbato 65 (Tween[®]65), polissorbato 80 (Tween[®]80), polissorbato 85 (Tween[®]85), Triton[®] N-101, Triton[®] X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipeptídico de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor EL[®]), lecitina de soja, poloxâmero, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de octadecil aminoácidos, lisolecitina, brometo de dimetildioctadecilamônio, metóxi-hexadecilglicerol, polióis pluronic, poliaminas (por exemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol), peptídeos (por exemplo, peptídeo e dipeptídeo de muramila, dimetilglicina, tuftsina), emulsões oleosas, géis minerais (por exemplo, fosfato de alumínio) e complexos de estimulação imune (ISCOMS).

[0077] Aqueles versados na técnica podem determinar prontamente um tensoativo ou combinação de tensoativo adequada através de medição da tensão de superfície de uma formulação de composição imunogênica em particular na presença e ausência do(s) tensoativo(s). alternativamente, um tensoativo é avaliado qualitativamente (por exemplo, inspeção visual de formação de partícula) ou quantitativamente (por exemplo, dispersão de luz, centrifugação em velocidade de sedimentação, densidade óptica, antigenicidade) com relação à sua capacidade de reduzir, inibir ou prevenir a agregação de uma composição imunogênica.

B. MEIO RECIPIENTE

[0078] Em determinadas modalidades, a invenção é dirigida às formulações de composições imunogênicas compreendidas em um meio recipiente. Conforme definido aqui, um "meio recipiente" da presente invenção inclui qualquer composição de matéria a qual é usada para "conter", "manter", "misturar", "compor", "distribuir", "injetar",

"transferir", "nebulizar", etc. uma composição imunogênica durante pesquisa, processamento, desenvolvimento, formulação, fabricação, armazenamento e/ou administração. Por exemplo, um meio recipiente da presente invenção inclui, mas não está limitado a, vidro de laboratório em geral, frascos, béqueres, cilindros graduados, fermentadores, biorreatores, tubulações, tubos, sacos, potes, frascos, vedações de frascos (por exemplo, uma rolha de borracha, uma tampa de rosca), ampolas, seringas, rolhas para seringas, êmbolos de seringa, vedações de borracha, vedações de plástico, vedações de vidro e semelhantes. Um meio recipiente da presente invenção não está limitado pelo material de fabricação e inclui materiais tais como vidro, metais (por exemplo, aço, aço inoxidável, alumínio, etc.) e polímeros (por exemplo, termoplásticos, elastômeros, termoplásticos-elastômeros).

[0079] O versado na técnica apreciará que os meios recipientes apresentados acima não se destinam a ser uma lista exaustiva, mas servem meramente como orientação para o técnico com relação à variedade de meios recipientes os quais são usados para conter, manter, misturar, compor, distribuir, injetar, transferir, nebulizar, etc. um imunogênio ou composição imunogênica durante pesquisa, processamento, desenvolvimento, formulação, fabricação, armazenamento e/ou administração da composição. Meios recipientes adicionais considerados para uso na presente invenção podem ser encontrados em catálogos publicados de vendedores e fabricantes de equipamento para laboratório, tais como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR® (West Chester, PA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Fisher Scientific International Inc. (Hampton, NH) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

[0080] Assim, às novas formulações da presente invenção são particularmente vantajosas pelo fato de que elas estabilizam e inibem a precipitação de formulações imunogênicas compreendidas em um

meio recipiente através dos vários estágios de pesquisa, processamento, desenvolvimento, formulação, fabricação, armazenamento e/ou administração da composição. Às novas formulações da invenção não apenas estabilizam composições imunogênicas contra estresses físicos/térmicos (por exemplo, temperatura, umidade, forças de cisalhamento, etc.), elas também intensificam a estabilidade e inibem a precipitação de composições imunogênicas contra fatores ou influências negativas, tais como incompatibilidade da composição imunogênica com o sistema de vedação/recipiente (por exemplo, meio recipiente siliconizado).

[0081] Assim, às novas formulações da presente invenção são particularmente úteis na estabilização do imunogênio (isto é, um conjugado de polissacarídeo-proteína, uma proteína ou antígeno polipeptídico) contra a precipitação induzida por silicone e a precipitação descrita acima. Por exemplo, o Pedido U.S. copendente No. 60/795.098, depositado em 26 de Abril de 2006, especificamente incorporado aqui por referência, descreve a agregação de composições imunogênicas na presença de óleo de silicone encontrado sobre meios recipientes, tais como seringas, frascos de vidro, rolhas de borracha e semelhantes, em que a adição de um tensoativo ao meio recipiente previne a agregação induzida por óleo de silicone dessas composições imunogênicas.

C. ADJUVANTES E VEÍCULOS/EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

[0082] Em determinadas modalidades, as composições imunogênicas da invenção são ainda formuladas com um adjuvante. Um adjuvante é uma substância que intensifica a resposta imune quando administrada junto com um imunogênio ou antígeno. Foi mostrado que uma série de citocinas ou linfocinas têm atividade de modulação imune e, assim, podem ser usadas como adjuvantes incluindo, mas não limitado, às interleucinas 1-a, 1-3, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (veja, por exem-

plo, Patente U.S. No. 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 e 18 (e suas formas mutantes), aos interferons- α , β e γ , fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (GMCSF, veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.078.996 e Número de Acesso ATCC 39900), fator de estimulação de colônia de macrófago (MCSF), fator de estimulação de colônia de granulócito (GCSF) e os fatores de necrose de tumor α e β . Ainda outros adjuvantes úteis na presente invenção incluem quimiocinas incluindo, sem limitação, MCP-1, MIP-1a, MIP-13 e RANTES.

[0083] Em determinadas modalidades, um adjuvante usado para intensificar uma resposta imune de uma formulação de composição imunogênica inclui, sem limitação, MPL[®] (monofosforil lipídio A 3-O-deacilado; Corixa, Hamilton, MT), o qual é descrito na Patente U.S. No. 4.912.094, a qual é incorporada por referência aqui. Também adequados para uso como adjuvantes são análogos sintéticos de lipídio A ou compostos de fosfato de aminoalquil glicosamina (AGP) ou derivados ou análogos dos mesmos, os quais estão disponíveis da Corixa (Hamilton, MT) e os quais são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 6.113.918, a qual é aqui incorporada por referência. Um de tais AGPs é 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Deóxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoilóxi tetradecanoil-amino]- β -D-glicopiranosídeo, o qual é também conhecido como 529 (formalmente conhecido como RC529). Esse adjuvante 529 é formulado como uma forma aquosa ou como uma emulsão estável (RC529-SE).

[0084] Ainda outros adjuvantes incluem óleo mineral e emulsões aquosas, sais de alumínio (alume), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc., Amphigen, Avridine, L121/esqualeno, D-lactídeo-polilactídeo/glicosídeo, polióis pluronic, dipeptídeo de muramila, *Bordetella* morta, saponinas, tal como Stimulon[®] QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritas na Patente U.S.

No. 5.057.540, a qual é aqui incorporada por referência e partículas geradas a partir das mesmas, tais como ISCOMS (complexos de imunestimulação), ISCOMATRIX (CSL Limitada, Parkville, Austrália), descrito na Patente U.S. No. 5.254.339, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolissacarídeos bacterianos, polinucleotídeos sintéticos, tais como oligonucleotídeos contendo um motivo CpG (Patente U.S. No. 6.207.646, a qual é incorporada aqui por referência), IC-31 (Intercell AG, Viena, Áustria), descrito nas Patentes Européias Nos. 1.296.713 e 1.326.634, uma toxina de coqueluche (PT) ou uma toxina termicamente lábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; veja, por exemplo, Publicações de Patente Internacional Nos. WO 93/13302 e WO 92/19265, incorporadas aqui por referência.

[0085] Também úteis como adjuvantes (e proteínas veículo) são toxinas do cólera e mutantes das mesmas, incluindo aquelas descritas no Pedido de Patente Internacional publicado número WO 00/18434 (em que o ácido glutâmico na posição 29 é substituído por outro aminoácido (outro que não ácido aspártico), de preferência uma histidina). Toxinas de CT similares ou mutantes são descritos no Pedido de Patente Internacional publicado número WO 02/098368 (em que a isoleucina na posição de aminoácido 16 é substituída por outro aminoácido, quer sozinha ou em combinação com a substituição da serina na posição de aminoácido 68 por outro aminoácido; e/ou em que a valina na posição de aminoácido 72 é substituída por outro aminoácido). Outras toxinas de CT são descritas no Pedido de Patente Internacional publicado número WO 02/098369 (em que a arginina na posição de aminoácido 25 é substituída por outro aminoácido; e/ou um aminoácido é inserido na posição de aminoácido 49; e/ou dois aminoácidos são inseridos nas posições de aminoácido 35 e 36).

[0086] Em determinadas modalidades, as formulações de composição imunogênica compreendem um diluente, excipiente farmacêuti-

camente aceitável ou um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, o diluente farmacêuticamente aceitável é água estéril, água para injeção, solução salina isotônica estéril ou um tampão biológico. Os conjugados de polissacarídeo-proteína e/ou imunogênicos de proteína são misturados com tais diluentes ou veículos de uma maneira convencional. Conforme usado aqui, a expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" se destina a incluir qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e para retardo de absorção e semelhantes, compatíveis com a administração a seres humanos ou outros hospedeiros vertebrados. O veículo apropriado é evidente para aqueles versados na técnica e dependerá, em grande parte, da via de administração.

[0087] Por exemplo, excipientes que podem estar presentes na formulação de composição imunogênica são conservantes, estabilizantes químicos e agentes de suspensão ou dispersão. Tipicamente, estabilizantes, conservantes e semelhantes são otimizados para determinar a melhor formulação para eficácia no recipiente objetivado (por exemplo, um ser humano). Exemplos de conservantes incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, galato de propila, os parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Exemplos de ingredientes de estabilização incluem casaminoácidos, sacarose, gelatina, vermelho de fenol, N-Z amina, difosfato de monopotássio, lactose, hidrolisato de lactalbumina e leite em pó.

[0088] Em determinadas modalidades, uma formulação de composição imunogênica é preparada para administração a seres humanos na forma, por exemplo, de líquidos, pós, aerossóis, comprimidos, cápsulas, comprimidos ou cápsulas entérico-revestidas ou supositórios. Assim, as formulações de composição imunogênica podem também incluir, mas não estão limitadas a, suspensões, soluções, emulsões

em veículos oleosos ou aquosos, pastas e formulações com liberação sustentada implantáveis ou biodegradáveis.

[0089] As composições imunogênicas da presente invenção não estão limitadas pela seleção dos veículos, diluentes e excipientes fisiologicamente aceitáveis convencionais, tais como solventes, tampões, adjuvantes ou outros ingredientes úteis em preparados farmacêuticos dos tipos descritos acima. O preparo dessas composições farmacêuticamente aceitáveis, a partir dos componentes descritos acima, tendo isotonicidade de pH, estabilidade e outras características convencionais apropriadas, está dentro da capacidade da técnica.

D. IMUNOGÊNIOS

[0090] Em determinadas modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína da invenção compreende um ou mais polissacarídeos pneumocócicos. Em outras modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína da invenção compreende um ou mais polissacarídeos estreptocócicos. Em ainda outras modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína da invenção compreende um ou mais polissacarídeos meningocócicos. Em ainda outras modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína da invenção compreende uma combinação de um ou mais polissacarídeos pneumocócicos, um ou mais polipeptídeos pneumocócicos, um ou mais polissacarídeos estreptocócicos, um ou mais polipeptídeos estreptocócicos, um ou mais polissacarídeos meningocócicos e/ou um ou mais polipeptídeos meningocócicos.

[0091] Conforme definido aqui antes, o termo "polissacarídeo" se destina a incluir qualquer elemento sacarídico antigênico (ou unidade antigênica) comumente usado nas técnicas de vacina bacteriana e imunológica incluindo, mas não limitado a, um "sacarídeo", um "oligosacarídeo", um "polissacarídeo", um "lipossacarídeo", um "lipo-

oligossacarídeo (LOS)", um "lipopolissacarídeo (LPS", um "glicosilato", um "glicoconjugado" e semelhantes.

[0092] Em uma modalidade particular da invenção, o um ou mais polissacarídeos pneumocócicos são um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A.

[0093] Em determinadas modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado pneumocócico 7-valente (7vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0094] Em determinadas modalidades, uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é um conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de

S. pneumoniae sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

[0095] Polissacarídeos são preparados através de métodos-padrão conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, os polissacarídeos capsulares apresentados na presente invenção são preparados a partir dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F de *Streptococcus pneumoniae*, em que cada sorotipo é desenvolvido em um meio baseado em soja e os polissacarídeos individuais são, então, purificados através de centrifugação, precipitação, ultrafiltração e cromatografia em coluna. Similarmente, polissacarídeos estreptocócicos (por exemplo, um ou mais polissacarídeos (ou oligossacarídeos) de um *Streptococcus* β -hemolítico, tal como *Streptococcus* do grupo A, *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus* do grupo C e *Streptococcus* do grupo G) e sacarídeos meningocócicos (por exemplo, um lipo-oligossacarídeo (LOS) ou lipopolissacarídeo (LPS) de *N. meningitidis*) são preparados a partir de sorotipos ou sorogrupos

cl clinicamente relevantes, usando técnicas e métodos gerais conhecidos por aqueles versados na técnica. Os polissacarídeos são, então, quimicamente ativados (por exemplo, via aminação redutiva) para tornar os sacarídeos capazes de reação com a proteína-veículo. Uma vez ativado, cada polissacarídeo capsular é separadamente conjugado a uma proteína-veículo (por exemplo, CRM₁₉₇) para formar um glicoconjugado (ou, alternativamente, cada polissacarídeo capsular é conjugado à mesma proteína-veículo) e formulado em uma formulação com dosagem única.

[0096] A ativação química dos polissacarídeos e subsequente conjugação à proteína-veículo (isto é, um conjugado de polissacarídeo-proteína) são obtidos através de meios convencionais. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.673.574 e 4.902.506.

[0097] Proteínas veículo são, de preferência, proteínas que são não tóxicas e não reatogênicas e obteníveis em uma quantidade e pureza suficientes. Proteínas veículo deverão ser passíveis de procedimentos-padrão de conjugação. Em uma modalidade particular da presente invenção, CRM₁₉₇ é usada como a proteína-veículo.

[0098] CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) é uma variante não tóxica (isto é, toxoide) de toxina de difteria isolada de culturas da cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (P197) crescida em casaminoácidos e meio baseado em extrato de levedo. CRM₁₉₇ é purificada através de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca de íons. Alternativamente, CRM₁₉₇ é preparada recombinantemente de acordo com a Patente U.S. No. 5.614.382, a qual é aqui incorporada por referência. Outros toxoides de difteria são também adequados para uso como proteínas-veículo.

[0099] Em outras modalidades, uma proteína-veículo da invenção é uma peptidase C5a estreptocócica enzimaticamente inativa (SCP) (por exemplo, uma ou mais das variantes de SCP descritas na Patente

U.S. 6.951.653, Patente U.S. 6.355.255 e Patente U.S. 6.270.775).

[00100] Outras proteínas veículo adequadas incluem toxinas bacterianas inativadas, tais como toxoide do tétano, toxoide de coqueluche, toxoide do cólera (por exemplo, CT E29H, descrito no Pedido de Patente Internacional WO2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* e exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Proteínas da membrana externa bacteriana, tais como complexo c da membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de ligação à transferrina, pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína de adesina pneumocócica (PsaA) ou proteína D de *Haemophilus influenzae* também podem ser usadas. Outras proteínas, tais como ovalbumina, hemocianina do caramujo *megathura crenulata* (KLH), albumina de soro bovino (BSA) ou um derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD) também podem ser usados como proteínas veículo.

[00101] Após conjugação do polissacarídeo capsular à proteína-veículo, os conjugados de polissacarídeo-proteína são purificados (enriquecidos com relação à quantidade de conjugado de polissacarídeo-proteína) através de várias técnicas. Essas técnicas incluem operações de concentração/diafiltração, precipitação/eluição, cromatografia em coluna e filtração profunda.

[00102] Após os glicoconjugados individuais serem purificados, eles são compostos para formular a composição imunogênica da presente invenção. formulação dos conjugados de polissacarídeo-proteína da presente invenção pode ser realizada usando métodos reconhecidos na técnica. Por exemplo, os 13 conjugados pneumocócicos individuais podem ser formulados com um veículo fisiologicamente aceitável para preparar a composição. Exemplos de tais veículos incluem, mas não estão limitados a, água, solução salina tamponada, polióis (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e soluções de dextrose.

[00103] Em outras modalidades, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam uma composição imunogênica de peptidase C5a estreptocócica (SCP), em que as formulações compreendem uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 6,5, um tensoativo e uma peptidase C5a estreptocócica. A peptidase C5a é uma protease de serina altamente conservada e é expressa em todos os Estreptococos β -hemolíticos (por exemplo, Grupos estreptocócicos A, B, C e G). Por exemplo, a sequência de nucleotídeo que codifica uma peptidase C5a de estreptococo do Grupo B (GBS) é 98% idêntica à sequência de nucleotídeo que codifica uma peptidase C5a de estreptococo do Grupo A (GAS). Assim, em determinadas modalidades da invenção, uma composição imunogênica contra infecção causada por Estreptococos β -hemolíticos compreende um imunogênio (ou antígeno) de peptidase C5a.

[00104] Em uma modalidade particular, uma peptidase C5a da invenção é uma peptidase C5a estreptocócica enzimaticamente inativa (por exemplo, uma ou mais das variantes de SCP descritas na Patente U.S. 6.951.653, Patente U.S. 6.355.255 e Patente U.S. 6.270.775, cada uma das quais especificamente incorporada aqui por referência). Em outra modalidade específica, a SCP usada nas novas formulações de composição imunogênica da invenção é clonada de um estreptococo do Grupo B. Em outra modalidade, a sequência de SCP de estreptococo do Grupo B sofreu mutação genética para torná-la proteoliticamente inativa (veja, por exemplo, Patentes U.S. 6.951.653; 6.355.255 e 6.270.775) e é expressa como uma proteína recombinante em *E. coli*.

[00105] Em outra modalidade, a invenção é dirigida às formulações as quais estabilizam uma composição imunogênica de proteína 2086 de *N. meningitidis*, em que as formulações compreendem uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um tensoativo e uma proteína 2086 de *N. meningi-*

tidis. As proteínas 2086 de *N. meningitidis* são codificadas por uma rede de leitura aberta (ORF) de sequência de ácido nucleico identificada como "ORF 2086" (por exemplo, veja Publicação Internacional No. WO 03/063766 A2 (Pedido Internacional No. PCT/US02/32369), Publicação Internacional No. WO 04/094596 A2 (Pedido Internacional No. PCT/US04/011901) e Publicação Internacional No. WO 04/065603 A2 (Pedido Internacional No. PCT/US04/000800), cada um especificamente incorporado aqui por referência). Em uma outra modalidade, a invenção é dirigida às formulações que otimizam a estabilidade de antígeno e ligação percentual a um adjuvante de sal de alumínio (por exemplo, $AlPO_4$) de uma proteína 2086 de *N. meningitidis*, em que as formulações compreendem uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão tem um pKa de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, um tensoativo, um sal de alumínio e uma proteína 2086 de *N. meningitidis*.

[00106] Todas as patentes e publicações citadas aqui são aqui incorporadas por referência.

E. EXEMPLOS

[00107] Os exemplos a seguir são realizados usando métodos-padrão, os quais são bem-conhecidos e rotineiros para aqueles versados na técnica, exceto onde de outro modo descrito em detalhes. Os exemplos a seguir são apresentados para fins ilustrativos e não deverão ser construídos de qualquer forma como limitando o escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1

FORMULAÇÕES IMUNOGÊNICAS COMPREENDENDO Tween® 80 A 0,001%-0,05% ESTABILIZAM E PREVINEM A AGREGAÇÃO DO IMUNOGÊNIO

[00108] O conjugado de polissacarídeo-proteína usado nesse exemplo foi um conjugado de polissacarídeo pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo polissacarídeos capsulares de *S. pneumo-*

niae sorotipos 4, 6B, 9V, 18C, 19F, 14, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A, cada um dos quais foi conjugado à CRM₁₉₇. Os polissacarídeos capsulares foram preparados através de métodos-padrão conhecidos por aqueles versados na técnica. resumidamente, cada sorotipo de polissacarídeo pneumocócico foi crescido em um meio baseado em soja, os polissacarídeos individuais foram, então, purificados através de centrifugação, precipitação, ultrafiltração e cromatografia em coluna. Os polissacarídeos purificados foram quimicamente ativados para conjugação e cada polissacarídeo foi separadamente conjugado à proteína-veículo CRM₁₉₇ para formar um glicoconjugado e formulado em uma formulação com uma única dosagem.

[00109] A ativação química dos polissacarídeos e subsequente conjugação à proteína-veículo foram realizadas através de meios convencionais (por exemplo, veja Patente U.S. No. 4.673.574 e 4.902.506). CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) é uma variante não tóxica (isto é, toxoide) de toxina de difteria isolada de culturas da cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (P197) crescida em casaminoácidos e meio baseado em extrato de levedo. CRM₁₉₇ é purificada através de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca de íons.

[00110] Os experimentos de antigenicidade descritos abaixo foram realizados através de mistura das amostras de 13vPnC com um de treze antissoros (Ab) específicos para cada um dos sorotipos de polissacarídeo e detecção dos complexos imunes via medições por dispersão luminosa sobre um sistema Array® 360 (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). As medições de dispersão luminosa detectadas para cada um dos treze sorotipos foram, então, comparadas com uma curva padrão e reportadas como antigenicidade (ng/mL).

[00111] Seringas (BD Hypak SCF®) e rolhas para seringa (BD Hypak SCF®) foram adquiridas da BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Frascos de boro-silicato transparentes (VWR TraceClean®, 40

mL) com vedações revestidas de Teflon® foram adquiridos da VWR® (West Chester, PA). Polissorbato 80 (Tween® 80) foi adquirido da J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc.; Phillipsburg, NJ). Solução salina tamponada era succinato (5 mM) e NaCl (0,85%) em um pH de 5,8.

[00112] A 13vPnC foi formulada (volume total de 500 mL) em diferentes concentrações de tensoativo (Tween®80; 0,001%, 0,005%, 0,01% e 0,05%, peso/volume) como segue: solução salina a 0,85% (NaCl a 150 mM) foi adicionada a um béquer de vidro Pyrex® de um litro, seguido por tampão de succinato a 50 mM (concentração final de 5 mM) e a 13vPnC. A concentração final de cada conjugado de sorotipo foi de 4,4 ng/mL (exceto quanto ao sorotipo 6B, a qual era de 8,8 ng/mL). A formulação de 13vPnC foi, então, dividida em cinco frascos de vidro separados (50 mL por frasco), em que Tween® 80 a 0,0%, 0,001%, 0,005%, 0,01% ou 0,05% (peso/v) foi adicionado a um dos cinco frascos e cada solução filtrada através de um filtro Durapore® de 0,22 µm (Millipore; Billerica, MA). Subsequentemente, 0,65 mL de cada solução foram enchidos em uma seringa de vidro BD HYPAK® SCF® de 3 mL separada com rolhas cinzas w4432 (BD Medical Pharmaceutical Systems; Franklin Lakes, NJ) e as seringas colocadas em um agitador orbital horizontal (60 cpm) durante 100 horas a 2°C a 8°C.

[00113] Foi observado, através de inspeção visual (dados não mostrados), que a 13vPnC formulada na ausência de Tween® 80 (isto é, 0,0%) começou a precipitar de solução dentro de dez minutos a 2-8°C quando de ligeira agitação via um agitador orbital horizontal. Em contraste, a 13vPnC formulada em Tween® 80 a 0,001%, 0,005%, 0,01% ou 0,05% e ligeiramente agitada a 2-8°C era estável durante até vinte e cinco dias sem nenhum sinal visível de precipitação (dados não mostrados). Assim, esses dados demonstraram que a adição de um tensoativo (por exemplo, Tween® 80) a uma formulação de composição imunogênica intensifica a estabilidade da composição imunogênica.

[00114] Um segundo experimento de estabilidade da 13vPnC confirmou ainda que a adição de tensoativo à formulação intensificou significativamente a estabilidade da 13vPnC. Nesse experimento, a 13vPnC foi formulada com e sem Tween® 80 a 0,05%. A 13vPnC formulada sem Tween® 80 (isto é, 0,0%) foi preparada como segue: solução salina a 0,85% (NaCl a 150 mM) foi adicionada a um béquer de vidro Pyrex® de um litro, seguido por tampão de succinato a 50 mM (concentração final de 5 mM) e a 13vPnC, em um volume total de 500 mL. A formulação 13vPnC com 0,05% de Tween® 80 foi preparada da seguinte maneira: 0,85% de solução salina (NaCl a 0,05 mM) foi adicionada a um béquer de vidro Pyrex® de um litro, seguido de tampão succinato a 50 mM (concentração final de 5mM), 0,05% de Tween®80 e o 13vPnC, em um volume total de 500 ml. A concentração final de cada conjugado de sorotipo nas formulações de 500 mL era de 4,4 µg/mL (exceto quanto ao sorotipo 6B, a qual era de 8,8 µg/mL). As formulações de 500 mL foram homogeneizadas via um homogeneizador com rotor/estator a 6.000 rpm (2-8°C) durante 120 minutos. O processo de homogeneização criou uma interface de ar-líquido (com bolhas de ar).

[00115] A estabilidade da formulação de 13vPnC com (Tabela 1) e sem (Tabela 1) Tween® 80 a 0,05% foi avaliada durante um período de tempo de duas horas como segue: amostras (20-30 mL) foram removidas a zero, trinta e cento e vinte minutos das formulações com Tween® 80 a 0,0% e 0,05%, as amostras foram diluídas a 1:2 em diluente de proteína (diluente de proteína Array® 360 (Cat. No. 663630); Beckman Coulter Inc.; Fullerton, CA) e a antigenicidade de todos os treze sorotipos da 13vPnC foi avaliada (veja Tabela 1) sobre um sistema Array® 360.

[00116] Conforme é mostrado na Tabela 1, houve uma diminuição significativa na antigenicidade dos polissacarídeos dos treze sorotipos

(formulados sem Tween® 80) dentro do ensaio de duas horas. Muito significativamente, contudo, a formulação de 13vPnC compreendendo Tween® 80 a 0,05% (Tabela 1) demonstrou estabilidade robusta sem nenhuma redução na antigenicidade através do ensaio de antigenicidade de duas horas.

TABELA 1

ENSAIO DE ESTABILIDADE DE 13VPNC FORMULADA COM E SEM Tween® 80

13vPnC sem Tween® 80			
Sorotipo	Antigenicidade 0 minuto	Antigenicidade 30 minutos	Antigenicidade 120 minutos
1	4,8 µg/ml	4,2 µg/ml	2,4 µg/ml
3	4,8 µg/ml	4,1 µg/ml	1,7 µg/ml
4	5,8 µg/ml	5,0 µg/ml	3,1 µg/ml
5	3,4 µg/ml	3,0 µg/ml	2,0 µg/ml
6A	4,9 µg/ml	3,8 µg/ml	1,3 µg/ml
6B	10,0 µg/ml	5,6 µg/ml	1,4 µg/ml
7F	4,7 µg/ml	3,4 µg/ml	1,0 µg/ml
9V	5,6 µg/ml	4,7 µg/ml	2,5 µg/ml
14	7,6 µg/ml	6,4 µg/ml	3,0 µg/ml
18C	5,6 µg/ml	4,4 µg/ml	1,7 µg/ml
19A	6,4 µg/ml	4,5 µg/ml	1,9 µg/ml
19F	5,4 µg/ml	2,6 µg/ml	0,0 µg/ml
23F	4,5 µg/ml	2,8 µg/ml	0,9 µg/ml

13vPnC com 0,05% de Tween® 80

Sorotipo	Antigenicidade 0 minuto	Antigenicidade 30 minutos	Antigenicidade 120 minutos
1	5,1 µg/ml	5,0 µg/ml	5,2 µg/ml
3	5,0 µg/ml	5,0 µg/ml	5,2 µg/ml
4	6,1 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
5	3,6 µg/ml	3,6 µg/ml	3,7 µg/ml

Sorotipo	Antigenicidade 0 minuto	Antigenicidade 30 minutos	Antigenicidade 120 minutos
6A	5,4 µg/ml	5,4 µg/ml	5,6 µg/ml
6B	10,6 µg/ml	10,6 µg/ml	10,5 µg/ml
7F	5,3 µg/ml	5,2 µg/ml	5,3 µg/ml
9V	6,1 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
14	8,2 µg/ml	8,3 µg/ml	8,3 µg/ml
18C	6,2 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
19A	6,8 µg/ml	6,8 µg/ml	6,8 µg/ml
19F	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml	6,0 µg/ml
23F	5,2 µg/ml	5,2 µg/ml	5,2 µg/ml

[00117] A formulação de 13vPnC/Tween® 80 foi ainda testada com relação à estabilidade contra forças de cisalhamento elevado. Nesse experimento, 100 mL de uma composição de 13vPnC (4,4 ng/ml - sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F e 8,8 µg/mL de sorotipo 6B, tampão de succinato a 5 mM, NaCl a 150 mM e 0,25 mg/mL de AlPO₄) foram adicionados a três garrafas de vidro de 250 mL compreendendo Tween® 80 a 0,0%, 0,01% ou 0,05%. As três garrafas foram, então, submetidas a turbilhamento durante trinta minutos (2-8°C) sobre um aparelho de turbilhamento (Vortex-Genie® 2; Scientific Industries, Inc.; Bohemia, NY) e uma interface de ar-líquido foi criada no ajuste de velocidade máxima. Após trinta minutos, amostras de 10-30 mL foram tomadas de cada garrafa, diluídas a 1:2 em diluente de proteína Array® 360 e a antigenicidade dos treze sorotipos avaliada sobre um sistema Array® 360.

[00118] Conforme observado na Tabela 2, a 13vPnC formulada sem Tween® 80 (0,0%) tinha uma diminuição média de 20% na antigenicidade após turbilhamento. A 13vPnC formulada com Tween® 80 a 0,01% tinha uma diminuição na antigenicidade oscilando de 2-10% (média de 8%) e a 13vPnC formulada com Tween® 80 a 0,05% tinha uma diminuição na antigenicidade oscilando de 0-8% (média de 3%).

Assim, os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que a 13vPnC formulada com Tween® 80 a 0,01% ou 0,05% era significativamente estabilizada contra forças de cisalhamento, com relação a 13vPnC formulada na ausência de Tween® 80.

TABELA 2

EFEITO DE ESTABILIZAÇÃO DE TWEEN® 80 CONTRA FORÇAS DE CISALHAMENTO

Sorotipo	Antigeni- cidade tw80 a 0,0%	Antigeni- cidade tw80 a 0,0% + turb.	Antigeni- cidade tw80 a 0,01%	Antigeni- dade tw80 a 0,01% + turb.	Antigeni- dade tw80 a 0,05 %	Antigeni- cidade tw80 a 0,05% + turb.
1	4,7 µg/ml	3,6 µg/ml	4,8 µg/ml	4,3 µg/ml	4,7 µg/ml	4,6 µg/ml
3	4,6 µg/ml	3,4 µg/ml	4,7 µg/ml	4,2 µg/ml	4,7 µg/ml	4,4 µg/ml
4	5,5 µg/ml	4,4 µg/ml	5,9 µg/ml	5,4 µg/ml	5,9 µg/ml	5,6 µg/ml
5	3,2 µg/ml	2,5 µg/ml	3,5 µg/ml	3,2 µg/ml	3,3 µg/ml	3,3 µg/ml
6A	4,3 µg/ml	3,6 µg/ml	4,6 µg/ml	4,5 µg/ml	4,7 µg/ml	4,8 µg/ml
6B	9,7 µg/ml	7,7 µg/ml	10,2 µg/ml	9,6 µg/ml	10,2 µg/ml	10,1 µg/ml
7F	4,6 µg/ml	3,5 µg/ml	5,4 µg/ml	5,0 µg/ml	5,4 µg/ml	5,3 µg/ml
9V	5,3 µg/ml	4,1 µg/ml	5,7 µg/ml	5,1 µg/ml	5,6 µg/ml	5,3 µg/ml
14	6,8 µg/ml	5,4 µg/ml	7,3 µg/ml	6,7 µg/ml	7,4 µg/ml	6,8 µg/ml
18C	4,1 µg/ml	3,4 µg/ml	4,5 µg/ml	4,3 µg/ml	4,5 µg/ml	4,5 µg/ml
19A	5,1 µg/ml	4,2 µg/ml	5,5 µg/ml	5,3 µg/ml	5,6 µg/ml	5,4 µg/ml
19F	4,8 µg/ml	3,6 µg/ml	5,2 µg/ml	4,9 µg/ml	5,2 µg/ml	5,1 µg/ml
23F	3,0 µg/ml	2,4 µg/ml	3,4 µg/ml	3,3 µg/ml	3,5 µg/ml	3,4 µg/ml

EXEMPLO 2

FORMULAÇÕES COMPREENDENDO TENSOATIVO ESTABILIZAM E PREVINEM A AGREGAÇÃO DE PEPTIDASE C5A ESTREPTOCÓCICA

[00119] A peptidase C5a estreptocócica (SCP) usada nesse exemplo foi expressa e purificada como segue. A SCP foi expressa recombinantemente em *E. coli* usando um sistema induzível por arabinose. Protocolos-padrão de fermentação para *E. coli* usando meio definido

isento de soro animal e subsequente lise celular foram seguidos. SCP recombinante foi purificada da fração solúvel do lisato de células através de saturação com sulfato de amônio a 60% (aproximadamente 3 M) enquanto se agitava durante 12-24 horas. O lisato saturado foi centrifugado, o sobrenadante retido e carregado sobre uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose. O material ligado foi, então, eluído com sulfato de amônio a 1 M, Tris-Cl a 20 mM, pH de 7,5, concentrado e diafiltrado contra PBS, pH de 7,4. A SCP recombinante purificada (rSCP) foi diluída para ~10 mg/mL com PBS, pH de 7,4 e passada através de um filtro Posidyne para remover a endotoxina, seguido por uma filtração final (0,2 mM) para esterilidade e armazenada congelada (-25°C).

[00120] A SCP purificada (55 ng/mL) foi, então, formulada com Tween[®] 80 a 0,025% ou sem Tween[®] 80 (0,0%) nos seguintes tampões: tampão de succinato a 5 mM em um pH de 6,0, tampão de fosfato a 10 mM em um pH de 7,0, tampão de fosfato a 10 mM em um pH de 7,4 ou tampão de Tris a 10 mM em um pH de 7,5 e enchida em seringas BD Hypak SCF[®] separadas. As seringas foram, então, colocadas sobre um agitador orbital horizontal a 2-8°C, agitadas a 180 cpm durante dois dias e a concentração de proteína SCP determinadas através do ensaio de Lowry modificado.

[00121] Conforme mostrado na FIG. 1, a estabilidade da SCP foi grandemente intensificada quando formulada com Tween[®] 80. Por exemplo, após dois dias sobre o agitador orbital, a SCP formulada sem Tween[®] 80 (FIG. 1A) demonstrou uma diminuição significativa (por exemplo, maior do que 90%) na concentração de SCP em cada um dos tampões testados. Contudo, conforme mostrado na FIG. 1B, a adição de Tween[®] 80 a 0,025% às formulações tampões com SPC, antes de serem colocadas no agitador orbital durante dois dias, inibiu completamente a perda de SCP a qual foi observada na FIG. 1A.

[00122] A estabilidade ao armazenamento da formulação de SCP/Tween® 80 (0,025%) foi também avaliada a 25°C e 37°C durante oito semanas e seis semanas, respectivamente (dados não mostrados). Resumidamente, a SCP (200 µg) foi formulada em tampão de succinato ou tampão de fosfato como segue: tampão de succinato (5 mM, pH de 6,0) ou tampão de fosfato (15 mM, pH de 7,4), NaCl a 0,9% e Tween® 80 a 0,025%. A estabilidade das formulações de SCP/Tween® 80 foi avaliada através de HPLC por exclusão de tamanho, ensaio de proteína total de Lowry modificado e inspeção visual para precipitação. Foi observado nesse estudo que as formulações de SCP/Tween® 80 (em qualquer tampão) eram completamente estáveis a 25°C e 37°C durante todo o estudo de estabilidade (isto é, até oito semanas e seis semanas, respectivamente).

EXEMPLO 3

A INFLUÊNCIA DO MEIO RECIPIENTE SILICONIZADO SOBRE A ESTABILIDADE DE 13vPnC

[00123] Experimentos anteriores indicaram (dados não mostrados) que composições imunogênicas de 13vPnC precipitaram e agregaram quando enchidas em seringas de vidro de boro-silicato Becton Dickinson® (BD) Hypak Tipo 1 pronta para uso (dose única) tratadas com silicone Dow Corning® grau médico DC 360 e revestidas com rolhas isentas de látex West 4432/50 (clorobutila) e tampa EZ Tip West 7025/65 (mistura sintética de isopreno bromobutila; West Pharmaceutical®, Lionville, PA). Nesses experimentos, a 13vPnC foi formulada em tampão de succinato a 5 mM contendo NaCl a 0,85% e 4,4 ng/ml de *S. pneumoniae* sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F e 8,8 µg/ml de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, com e sem 0,25 mg/ml de fosfato de alumínio como um adjuvante. Foi observado que, na ausência de AlPO₄, os particulados de 13vPnC eram prontamente observáveis enquanto que, na presença de AlPO₄, os particulados de 13vPnC eram

significativamente diminuídas e mais difíceis de detectar.

[00124] No presente exemplo, uma série de recipientes e componentes de vedação (isto é, meios recipientes) foram examinados para identificar quais componentes estavam induzindo ou contribuindo para a formação de partículas de 13vPnC. Os meios recipientes testados compreendiam seringas, rolhas e frascos e são listados abaixo na Tabela 3. As rolhas BD e West listadas na Tabela 3 foram siliconizadas, usando o processo de Huber ou Jar.

[00125] O processo de Huber de siliconização é mais controlado e proporcionou 30 a 60 ng/cm² de silicone sobre a superfície da rolha, enquanto que o processo de siliconização de Jar resultou em 150 a 300 ng/cm² de silicone sobre a superfície da rolha. Baseado em cálculos teóricos, cerca de 15% da área de superfície da rolha são expostos ao produto na seringa sugerindo que, para os processos de Huber e Jar, entre 4,5 a 9 µg e 22,5 a 45 µg de silicone são extraíveis das rolhas, respectivamente.

Materiais

[00126] O silicone era Dow Corning® 360 Medical Fluid 1000 centistokes (lote No. 0001846266). A 7vPnC foi formulada em tampão de succinato a 5 mM contendo NaCl a 0,85% e 4,4 µg/ml de *S. pneumoniae* sorotipos 4, 9, 14, 18C, 19F e 23F e 8,8 ng/ml de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, com e sem 0,25 mg/ml de fosfato de alumínio. A 13vPnC foi formulada em tampão de succinato a 5 mM contendo NaCl a 0,85% e 4,4 µg/ml de *S. pneumoniae* sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F e 8,8 ng/ml de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, com e sem 0,25 mg/ml de fosfato de alumínio. *S. pneumoniae* sorotipo 6B monovalente foi formulado (tampão de succinato a 5 mM contendo NaCl a 0,85%, sem fosfato de alumínio) em uma concentração de 61 ng/ml para simular a concentração total de sacarídeo das formulações de 13vPnC.

Métodos

[00127] A 7vPnC e 13vPnC foram formuladas conforme descrito acima e 35 ml de uma dada formulação foram adicionados a uma garrafa Nalgene® de 250 ml transparente. Em cada garrafa Nalgene®, os componentes do meio recipiente listados na Tabela 3 foram adicionados. As garrafas Nalgene® foram, então, colocadas sobre um Agitador Orbital Labline® e agitadas durante a noite a 50 rpm. Os resultados são resumidos na Tabela 3.

[00128] Aparência visual. As garrafas Nalgene® contendo cada um dos componentes de meio recipiente foram mantidas com luz fluorescente no laboratório. Um trajeto de um feixe de luz (efeito de Tindal) passando através das amostras permitiu a detecção de particulados.

[00129] Ensaio de proteína. A proteína total e proteína ligada ao alumínio foram determinadas através de medição da concentração de proteína total na composição imunogênica formulada e da proteína associada ao pélete de alumínio, respectivamente (uma alíquota da composição imunogênica foi centrifugada e o pélete foi ressuspenso em solução salina). Ensaios foram realizados usando o ensaio de proteína de Lowry modificado de Pearce (catálogo # 23240) com albumina de soro bovino como um padrão.

RESULTADOS

[00130] Na primeira série de experimentos, as composições imunogênicas de 13vPnC foram formuladas com $AlPO_4$ e expostas a uma série de meios recipientes listados abaixo na Tabela 3. Foi evidente a partir dos dados (Tabela 3) que os componentes do meio recipiente que foram tratados com óleo de silicone induziram à formação de partículas brancas. Em contraste, nenhuma partícula foi detectada na presença das rolhas Daikyo® não siliconizadas (Daikyo Seiko, Ltda., Japão) e frascos Schott (Schott North America Inc.; Lebanon, PA).

TABELA 3

**EFEITO DE DIFERENTES COMPONENTES DO MEIO RECIPIENTE
SOBRE A 13vPnC, FORMULADA SEM AIPO₄**

Componentes do meio recipiente	Número de componentes de meio recipiente adicionados	Aparência (inspeção visual)
Controle - 13vPnC sem AIPO ₄	Nenhum	Sem particulado
Rolhas de Si cinza BD Hypak BSCF 1-3 ml 4432/50 WWD	10	Particulados
Rolhas de Si cinza processadas por Huber BD Hypak BSCF 1-3 ml 4432/50	10	Particulados
Rolhas prontas para esterilizar West 890	10	Particulados
Rolhas de Si cinza BD Hypak BSCF 1-3 ml W4416/50 1000 WWD	10	Particulados
Rolhas Helvoet 6213	10	Particulados
Rolhas para frasco Daikyo (rolhas para êmbolo D777-1 B2-40 F451)	10	Sem particulado
Corpos de seringa BD Hypak BSCF 1-3 ml LLA EZGTC W7025/65	4	Particulados
Rolhas Hypak NSCF 1-3 ml 4023/50 B2-40 Daikyo	10	Sem particulado
Seringa E-Z Tampa com Ponta de Aperto W7025/65 EZ IITC	10	Sem particulado
Frascos de vidro de 2 ml, 13 mm Schott Tipo 1	4	Sem particulado
Óleo de silicone (Dow Chemical Medical Grade 360)	500 mL (1,43%)	Particulados
Seringas Schott TopPac	4	Sem particulado

[00131] O *S. pneumoniae* sorotipo 6B monovalente foi escolhido como um modelo para o 13vPnC e foi formulado a 61,6 µg/ml (sem AIPO₄) para simular a concentração total de sacarídeo na formulação 13vPnC. Silicone (fluido Médico Dow Corning 360) foi adicionado a aliquotas do 6B monovalente formulado na faixa de 2 ppm a 100 ppm. As misturas foram colocadas em um agitador orbital Labline® por 2 horas a 50 rpm

como indicado abaixo na tabela 4, particulados brancos fibrosos foram observados em todas as concentrações de silicone (Si).

TABELA 4

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SILICONE SOBRE A FORMAÇÃO DE PARTICULADOS

Concentração de silicone	Aparência (inspeção visual)
2 ppm (1 µl de Si a 500 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra
5 ppm (2,5 µl de Si a 500 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra
10 ppm (5 µl de Si a 500 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra
15 ppm (7,5 µl de Si a 500 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra
20 ppm (10 µl de Si a 500 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra
100 ppm (2 µl de Si a 20 mL de Formulação)	Particulados brancos semelhantes à fibra

[00132] A quantidade de silicone em formulações de 13vPnC (sem AlPO_4) foi também examinada. A concentração de silicone foi determinada através de Espectroscopia por Emissão de Plasma DC (dados não mostrados). Nesse método, o conteúdo de 25 seringas foi succinado e extraído com duas porções de 50 ml de uma mistura de ciclohexano/álcool isopropílico. Os extratos foram combinados e evaporados. O resíduo foi solubilizado e testado conforme os métodos existentes para determinação de silicone em rolas de borracha. Os resultados indicaram que entre 15,8 e 19,0 µg de silicone são extraíveis de cada seringa. Essa quantidade corresponde a 2,7% a 3,3% de silicone.

[00133] Em uma série de experimentos distintos, nos quais a 13vPnC foi formulada na presença de recipiente e submetida ao mesmo meio recipiente apresentado na Tabela 3, foi elucidado que o sili-

cone e a proteína "livre" (13vPnC) em solução eram responsáveis pela formação dos particulados (dados não mostrados). Análise por FTIR das partículas também indicou que os particulados consistiam em proteína e silicone (dados não-mostrados). Foi determinado, nesses experimentos, que cerca de 85% da 13vPnC estavam ligados ao AlPO_4 , em que os 15% restantes eram 13vPnC livre (não ligada ao AlPO_4) em solução. Em contraste, foi observado que a 7vPnC formulada com AlPO_4 estava 100% ligada ao AlPO_4 (dados não mostrados).

[00134] Para elucidar o efeito da polissacarídeo-proteína livre sobre a formação de partículas, 25 ml de ambos 13vPnC e 7vPnC foram transformados em alíquota e transferidos para um tubo para centrifuga de 50 ml. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante foi cuidadosamente extraído e transferido para uma garrafa Nalgene®. Dez rolhas siliconizadas (Rolhas 4432) foram adicionadas a cada garrafa e colocadas sobre o agitador orbital a 50 rpm. Após inspeção visual cuidadosa, foi observado que o sobrenadante de 7vPnC não exibia formação de particulado, desse modo, permanecendo claro e incolor. Contudo, o sobrenadante de 13vPnC começou a mostrar baixos níveis de particulados na quarta hora de observação (dados não mostrados). Esse resultado sugeriu que o polissacarídeo-proteína em solução, em conjunto com silicone, é responsável pela formação dos particulados.

[00135] Para elucidar adicionalmente a contribuição do polissacarídeo-proteína livre em solução para a formação de particulados, sorotipos 4 e 6B monovalentes de *S. pneumoniae* foram formulados em uma concentração de proteína oscilando de 25 ng/ml a 200 µg/ml na ausência e na presença de AlPO_4 . Dez rolhas siliconizadas (Rolhas 4432) foram colocadas em cada formulação as quais foram, então, colocadas sobre o agitador orbital a 50 rpm. Conforme indicado abaixo na Tabela 5, particulados brancos semelhantes à fibra foram observados

para ambos os sorotipos monovalentes em todas as concentrações de proteína na ausência de AlPO_4 . Contudo, na presença de AlPO_4 , particulados foram detectados em menores concentrações para o sorotipo 4 (100 ng/ml) versus sorotipo 6B (200 ng/ml), dados não mostrados.

TABELA 5

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOBRE A FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS

	Aparência (inspeção visual)	
	Sem AlPO_4	Com AlPO_4
25 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
50 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
75 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
100 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
200 $\mu\text{g/mL}$ de 6B	Particulados brancos semelhantes à fibra	Particulados brancos semelhantes à fibra
25 $\mu\text{g/mL}$ de Tipo 4	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
50 $\mu\text{g/mL}$ de Tipo 4	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
75 $\mu\text{g/mL}$ de Tipo 4	Particulados brancos semelhantes à fibra	Sem particulados
100 $\mu\text{g/mL}$ de Tipo 4	Particulados brancos semelhantes à fibra	Particulados brancos semelhantes à fibra
200 $\mu\text{g/mL}$ de Tipo 4	Particulados brancos semelhantes à fibra	Particulados brancos semelhantes à fibra

EXEMPLO 4

ADJUVANTES DE ALUMÍNIO INIBEM A FORMAÇÃO DE PARTICULADOS DE 13vPnC NA PRESENÇA DE MEIOS RECIPIENTES SILI-

CONIZADOS

[00136] Conforme apresentado acima no Exemplo 3, uma composição imunogênica de 13vPnC é uma formulação líquida compreendendo 4,4 ng/ml de *S. pneumoniae* sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F e 8,8 ng/mL de tipo 6B em tampão de succinato a 5 mM (pH de 5,8) e NaCl a 0,85%, a qual também pode ser formulada com ou sem um adjuvante (por exemplo, um adjuvante de alumínio). A 13vPnC pode também ser formulada com ou sem um adjuvante, tal como 0,25 mg de alumínio/ml de fosfato de alumínio (AlPO₄). Foi observado no Exemplo 3 que a 13vPnC formulada sem AlPO₄ e enchida em seringas Hypak SCF[®] (revestidas com êmbolos Hypak) falhou na inspeção visual em virtude da observação de particulados, em que outros estudos revelaram que os particulados eram, em parte, um resultado de interações de polissacarídeo-proteína com silicone. No exemplo a seguir, seringas (e êmbolos) de vários vendedores foram avaliados com formulações de 13vPnC, em que as condições de transporte e manipulação foram simuladas via agitação (descrito abaixo).

Materiais

[00137] A 13vPnC foi formulada em tampão de succinato a 5 mM contendo NaCl a 0,85% e 4,4 µg/ml de *S. pneumoniae* sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F e 8,8 ng/ml de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, com e sem 0,25 mg/ml de fosfato de alumínio. Os meios recipientes testados são listados abaixo na Tabela 6.

TABELA 6

MEIOS RECIPIENTES

	Meio recipiente	Descrição
1	Seringas Vetter Tipo 1 de vidro não tratado	Formato com 1 ml de comprimento
2	Seringas Schott TopPac [®]	Seringas plásticas

	Meio recipiente	Descrição
3	Seringas BD Baked do Tipo 1 de vidro não tratado	0,1 mg de silicone/corpo
4	Seringas BD Baked do Tipo 1 de vidro não tratado	0,04 mg de silicone/corpo
5	Seringas BD de alta viscosidade do Tipo 1 de vidro não tratado	Seringas de 2,25 ml, 12500 cst de silicone
6	Seringas BD de alta viscosidade do Tipo 1 de vidro não tratado	Seringas de 1,0 ml, 12500 cst de silicone
7	Seringas BunderGlas, PS2 Tipo 1 de vidro não tratado	0,056 mg de silicone/corpo
8	Seringas BunderGlas, PS4 Tipo 1 de vidro não tratado	0,14 mg de silicone/corpo
1	Êmbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Êmbolos Flurotec®
2	Êmbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Êmbolos Flurotec®
1	13vPnC com AlPO ₄ em seringas BD Hypak com êmbolos pronto para uso West 4432 e tampas 7025/65 EZ Tip	Controle positivo, alto teor de silicone
2	13vPnC com AlPO ₄ em seringas não siliconizadas com êmbolos West 4023/50 Flurotec® B2-40	Controle negativo, não tratado com silicone

Métodos

[00138] **Formulação e procedimento de enchimento.** Listada abaixo na Tabela 7 está a receita para uma formulação de 2 litros de 13vPnC. Resumidamente, a solução salina a 0,85% foi primeiro adicionada a um béquer de vidro, seguido pelo tampão de succinato a 5 mM (pH de 5,8) e, então, sequencialmente, cada um dos conjugados de sorotipo de *S. pneumoniae*. A formulação foi, então, gentilmente misturada sobre uma placa de agitação e filtrada através de uma unidade de filtro Millipore® de 0,22 µm. Para a formulação compreenden-

do AlPO_4 , o AlPO_4 (concentração final de 0,25 mg/ml) foi, então, adicionado e a formulação gentilmente misturada. As seringas de teste foram, então, enchidas (0,58 ml/seringa) e tampadas com êmbolos.

[00139] **Simulação de transporte via agitação.** Um aparelho de turbilhonamento VWR® Signature Digital Multitube (Catálogo No. 14005-826) foi usado para agitar as amostras. As seringas enchidas com 13vPnC foram colocadas horizontalmente e fixadas pelas duas placas de suporte do aparelho de turbilhonamento. As amostras foram mantidas na posição horizontal e agitadas a 500 rpm no modo de pausa a 2-8°C durante vinte e quatro horas.

[00140] **Nefelometria.** As antigenicidades sorotipo-específicas foram determinadas através de um ensaio de nefelometria de taxa usando anticorpos tipo-específicos. Para 13vPnC com AlPO_4 , o fosfato de alumínio foi solubilizado através da adição de NaOH a 1N a solução foi imediatamente neutralizada pela adição de ácido cítrico a 1M para 13vPnC sem AlPO_4 , nenhum procedimento de solubilidade e neutralização foi realizado. O ensaio mede a taxa de alteração da intensidade de dispersão de luz derivada do complexo de anticorpo-antígeno formado na amostra usando um nefelômetro Beckman Array 360.

TABELA 7

TABELA DE FORMAÇÃO DE 13vPnC

Componente	Tam. de lote (L)	Conc. Vol. (mg/mL)	Conc. Requerida (ug/mL)	13vPnC com AlPO_4 Volume (mL)	13vPnC sem AlPO_4 Volume (mL)
sorotipo 1	2.000	0,506	4,4	17,39	17,39
sorotipo 3	2.000	0,256	4,4	34,38	34,38
sorotipo 4	2.000	0,530	4,4	16,60	16,60
sorotipo 5	2.000	0,515	4,4	17,09	17,09
sorotipo 6A	2.000	0,519	4,4	16,96	16,96
sorotipo 6B	2.000	0,489	8,8	35,99	35,99
sorotipo 7F	2.000	0,500	4,4	17,60	17,60
sorotipo 9V	2.000	0,521	4,4	16,89	16,89
sorotipo 14	2.000	0,518	4,4	16,99	16,99

sorotipo 18C	2.000	0,509	4,4	17,29	17,29
sorotipo 19A	2.000	0,511	4,4	17,22	17,22
sorotipo 19F	2.000	0,520	4,4	16,92	16,92
sorotipo 23F	2.000	0,511	4,4	17,22	17,22
Tampão de succinato em solução salina a 0,85%, pH de 5,8	2.000	50,0	5000	200,0	200,0
AlPO ₄	2.000	3,250	250	153,85	NA
Solução salina	2.000	NA	NA	1387,62	1541,46

RESULTADOS

[00141] Nesse estudo, seringas de diferentes vendedores, tendo diferentes níveis de silicone (Tabela 6) foram submetidas a condições de agitação controladas. A antigenicidade total de cada sorotipo foi medida através do ensaio de Nefelometria para amostras pré-agitação e pós-agitação. A perda de antigenicidade após agitação (percentual) foi calculada e é mostrada nas figura 2 a figura 7.

[00142] Antes do estudo, as condições de agitação foram otimizadas baseado na perda de antigenicidade dos dois controles: (1) o controle com pior caso (controle positivo, alto teor de silicone; FIG. 2) e (2) o controle com melhor caso (controle negativo, sem silicone; FIG. 3). As condições foram, então, otimizadas de modo que a perda de antigenicidade fosse baixa no controle positivo, ainda detectável no controle negativo. Isso foi para assegurar que a agitação não fosse muito fraca para produzir precipitação nas seringas, nem muito forte, de modo que a precipitação poderia ser causada por outros fatores que não a interação com silicone (por exemplo, através de forças de cisalhamento). Assim, agitação a 500 rpm (modo de pausa) durante vinte e quatro horas foi escolhida como a condição de agitação mais adequada, enquanto que uma temperatura de 2-8°C e uma posição horizontal foram usadas para simular as condições no transporte e manipulação do produto em tempo real.

[00143] Os resultados do estudo são resumidos como segue: as

maiores perdas de antigenicidade da 13vPnC formulada com AlPO_4 ocorreram nas seringas com maiores níveis de silicone (dados não mostrados). Por exemplo, das seringas listadas na Tabela 6, a seringa BD Hypak (controle 1), a seringa BD Baked (seringa 3; 0,1 mg de silicone), a seringa BD de alta viscosidade (seringa 5) e a seringa BunderGlas PS4 (seringa 8, 0,14 mg de silicone) tinham, cada uma, um ou mais dos sorotipos de 13vPnC com mais de 10% de perda de antigenicidade. As menores perdas de antigenicidade da 13vPnC formulada com AlPO_4 ocorreram nas seringas com menores níveis de silicone. Por exemplo, as seringas Vetter (FIG. 4) e as seringas plásticas Schott TopPac (FIG. 5) eram mais similares às seringas não siliconizadas (FIG. 2), ambas demonstrando menores perdas de antigenicidade para 13vPnC formulada com AlPO_4 .

[00144] A influência do fosfato de alumínio sobre a estabilização da 13vPnC e inibição da formação de partícula na presença de seringas siliconizadas foi analisada em experimentos usando 13vPnC formulada com e sem 0,25 mg/ml de AlPO_4 , em que foram usadas seringas BD Baked com baixo teor de silicone (seringa 4 na Tabela 6) e as seringas BunderGlas PS2 com baixo teor de silicone (seringa 7 na Tabela 6). As seringas BD Baked com baixo teor de silicone (0,04 mg de silicone/corpo) tinham tipicamente, menos de 10% de perda de antigenicidade para os sorotipos de 13vPnC formulados com AlPO_4 (FIG. 6A), enquanto que a perda de antigenicidade para os sorotipos de 13vPnC formulados sem AlPO_4 (FIG. 6B) tinham perdas de antigenicidade oscilando de 5% (sorotipo 1) até cerca de 50% (sorotipo 23F). As seringas BunderGlas SP2 com baixo teor de silicone (0,056 mg de silicone/corpo) tinham uma perda de antigenicidade de menos de 5-8% (dependendo do sorotipo) para 13vPnC formulada com AlPO_4 (FIG. 7A), enquanto que a perda de antigenicidade para os sorotipos de 13vPnC formulados sem AlPO_4 (FIG. 7B) oscilava de cerca de 5% a

cerca de 30% (dependendo do sorotipo).

[00145] Assim, esses dados, tomados juntos, indicam que: (1) a perda de antigenicidade de 13vPnC foi maior nas seringas com maiores níveis de silicone e (2) a 13vPnC formulada sem AlPO_4 sustentou maiores perdas de antigenicidade do que a 13vPnC com AlPO_4 em todas as seringas testadas.

EXEMPLO 5

FORMULAÇÕES COMPREENDENDO TENSOATIVO OTIMIZAM A LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS MENINGOCÓCICAS A ADJUVANTES DE SAL DE ALUMÍNIO

[00146] A proteína 2086 de *N. meningitidis* recombinante lipidada (rl_P2086) usada nesse exemplo foi expressa e purificada como segue. A rl_P2086 foi expressa recombinantemente em *E. coli* utilizando uma sequência líder nativa. Protocolos-padrão de fermentação para *E. coli* usando meio definido isento de soro animal e subsequente lise celular foram seguidos. Proteína 2086 de *N. meningitidis* recombinante lipidada foi purificada a partir do pélete de membrana com Tris-HCl a 50 mM/EDTA a 5 mM/sarcosila a 1%, pH de 8. Esse extrato de sarcosila foi ajustado com Zwittergent 3-14 (Z3-14) a 1% e submetido à diálise contra um excesso de 30 vezes de Tris-HCl a 50 mM/EDTA a 5 mM/Z3-14 a 1%. O extrato de rl_P2086 submetido à diálise foi precipitado com etanol a 90% para remover a sarcosila restante e solubilizado com Tris-HCl a 50 mM/EDTA a 5 mM/Z3-14 a 1%, pH de 8. Material insolúvel foi removido através de centrifugação, o sobrenadante foi passado sobre uma coluna de cromatografia de troca de ânions e rl_P2086 foi coletada na fração não ligada. O material não ligado foi, então, submetido à diálise duas vezes contra um excesso de 30 vezes de NaAc a 25 mM/Z3-14 a 1%, pH de 4,5 e passado sobre uma coluna de cromatografia de troca de cátions. A rl_P2086 foi eluída com um gradiente de NaCl a 0-0,3 M e armazenada congelada (-25°C).

[00147] A rl_P2086 purificada foi, então, formulada com NaCl a 150 mM, Tween[®]80 a 0,020%, 0,25 mg/mL de AlPO₄ e nos seguintes tampões: tampão de fosfato a 10 mM em um pH de 7,0 e tampão de succinato a 5 mM em um pH de 6,0. A Tabela 8 compara o percentual de ligação de proteína ao adjuvante AlPO₄.

TABELA 8

LIGAÇÃO DE RLP2086 AO ADJUVANTE

Tampão	Conc. Total de proteína (µg/mL)	Proteína ligada a AlPO ₄ (%)
Tampão de fosfato a 10 mM, pH de 7,0 contendo NaCl a 150 mM, 0,02% de polisorbato 80 e 0,25 mg de Al/mL de AlPO ₄	400	68
	120	82
Tampão de succinato a 5 mM, pH de 6,0 contendo NaCl a 150 mM, 0,02% de polisorbato 80 e 0,25 mg de Al/mL de AlPO ₄	400	81
	120	100

REFERÊNCIAS

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

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

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

Bartzoka, Brook e McDormott, "Protein-Silicone Interactions: How

- Compatible Are the Two Species?", *Langmuir* 14: 1887-1891, 1998^a.
- Bartzoka, Chan e Brook, "Protein-Silicone Synergism at Liquid/Liquid Interfaces", *Langmuir* 16: 4589-4593, 2000.
- Bernstein, "Clouding and Deactivation of Clear (Regular) Human Insulin: Association with Silicone Oil from Disposable Syringes", *Diabetes Care* 10: 786-787, 1987.
- Bernstein, "Clouding and deactivation of clear (regular) human insulin: Association with silicone oil from disposable syringes?", *Diabetes Care*, 10: 786-787, 1987.
- Bolgiano et al., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* Type b Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 19: 3189-3200, 2001.
- Chantelau e Berger, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes", *Lancet*, 1: 1459, 1985.
- Chantelau et al., "Silicone oil released from disposable insulin syringes", *Diabetes care*, 9: 672-673, 1986.
- Chantelau, "Silicone oil contamination of insulin", *Diabet. Med.*, 6: 278, 1989.
- Chantelau, Burger e Bohlken, "Silicone Oil Released from Disposable Insulin Syringes", *Diabetes Care* 9: 672-673, 1986.
- Collier e Dawson, "Insulin syringes and silicone oil", *Lancet*, 5: 789-790, 1985.
- Ho et al., "Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 20: 3509-3522, 2002.
- Ho et al., "Solution Stability of the Subunit Components of Meningococcal C Oligosaccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines", *Biotech. Appl. Biochem.*, 33: 91-98, 2001.
- Jones et al., "Silicone Oil Induced Aggregation of Proteins", *J. Pharmaceutical Sci.*, 94(4): 918-927, 2005.

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

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação que inibe a agregação induzida por silicone de um conjugado polissacarídeo-proteína compreendido em um meio de recipiente siliconizado, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) uma solução salina com pH tamponado, em que o tampão apresenta um pKa de 3,5 a 7,5,

(ii) um sal de alumínio,

(iii) um tensoativo, selecionado do grupo consistindo em polissorbato 20 (Tween[®]20), polissorbato 40 (Tween[®]40), polissorbato 60 (Tween[®]60), polissorbato 65 (Tween[®]65) ou polissorbato 85 (Tween[®]85); e

(iv) um ou mais conjugados polissacarídeo-proteína, em que o conjugado polissacarídeo-proteína compreende um ou mais polissacarídeos pneumocócicos.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a solução salina com pH tamponado na formulação apresenta um pH de 5,5 a 7,5.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o tampão na formulação é fosfato, succinato, histidina ou citrato.

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão é succinato a uma concentração final de 1 mM a 10 mM e pH 5,8 a 6,0.

5. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o sal na solução salina com pH tamponado compreende cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio ou uma combinação dos mesmos.

6. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o sal de alumínio é hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio ou sulfato de alumínio.

7. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o sal de alumínio é fosfato de alumínio.

8. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que um ou mais polissacarídeos pneumocócicos são um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A.

9. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a proteína da formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é selecionada do grupo consistindo em CRM₁₉₇, um toxoide do tétano, um toxoide do cólera, um toxoide de coqueluche, toxoide termicamente lábil de *E. coli* (LT), um toxoide de pneumolisina, proteína A da superfície pneumocócica (PspA), proteína A de adesina pneumocócica (PsaA), uma peptidase C5a de *Streptococcus*, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovalbumina, hemocianina do caramujo "keyhole limpet" (KLH), albumina de soro bovino (BSA) e derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD).

10. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado pneumocócico 7-valente (7vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S.*

pneumoniae sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

11. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a formulação de conjugado de polissacarídeo-proteína é uma formulação de conjugado pneumocócico 13-valente (13vPnC) compreendendo um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 4 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6B conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 14 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 18C conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 23F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 1 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 3 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 5 conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 6A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇, um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 7F conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇ e um polissacarídeo de *S. pneumoniae* sorotipo 19A conjugado a um polipeptídeo de CRM₁₉₇.

12. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o referido recipiente é uma seringa.

13. Formulação, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o referido recipiente é uma seringa de vidro.

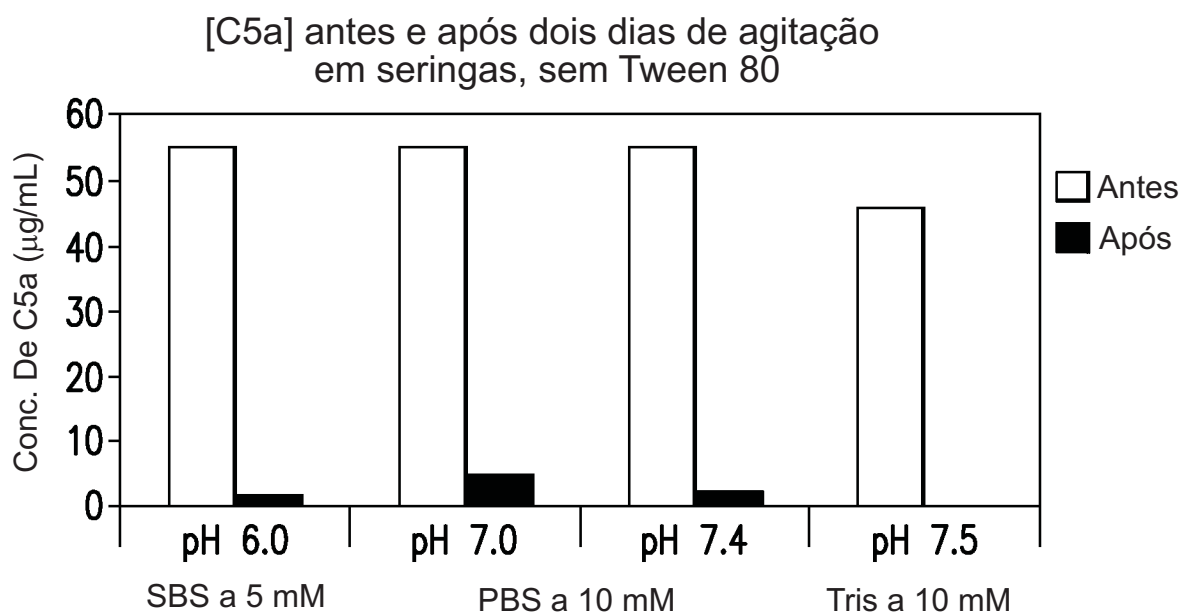


FIG. 1A

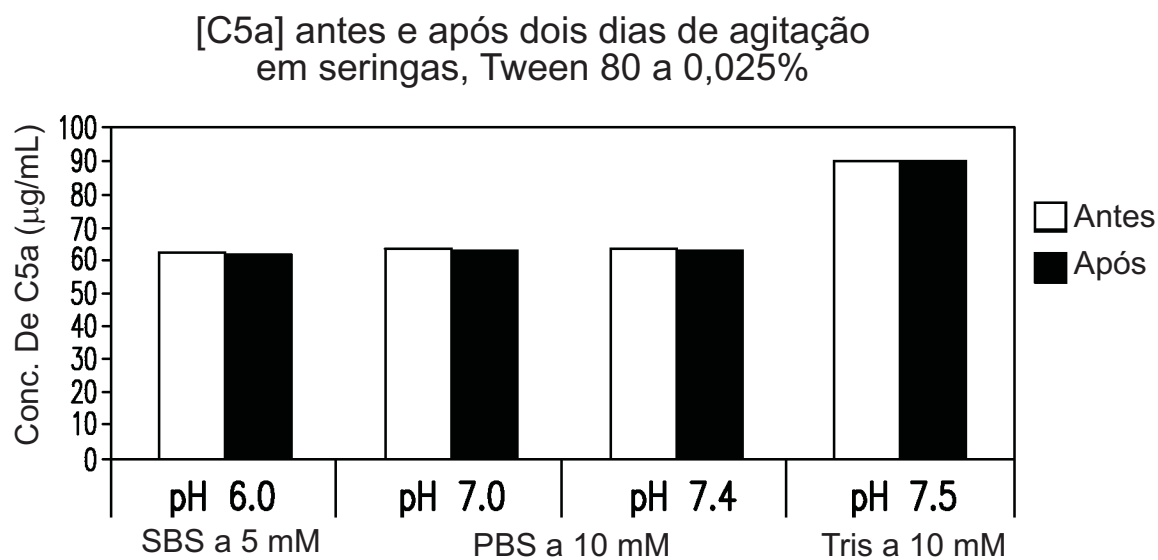


FIG. 1B

2 horas de agitação
 8 horas de agitação
 24 horas de agitação

Perda de antigenicidade de $^{13}\text{vPnC}$ com AlPO_4 em seringa de vidro do tipo 1/rolhas 4432

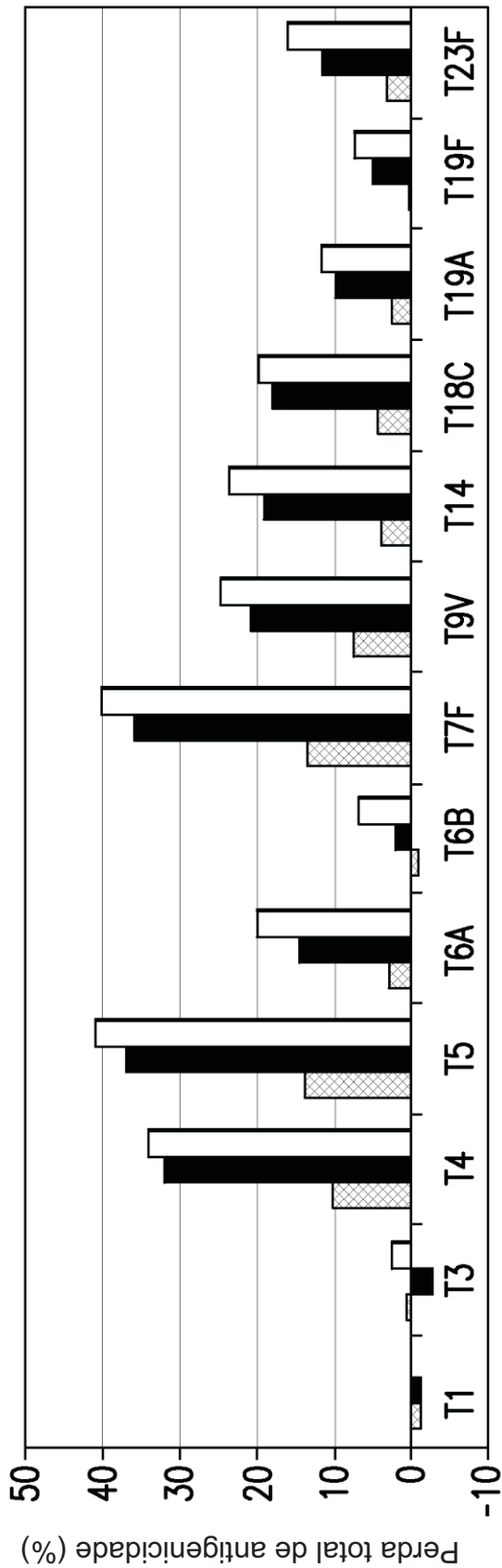
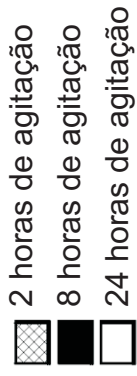


FIG.2



Perda de antigenicidade de 13vPnC
com $AlPO_4$ em seringas não siliconizadas

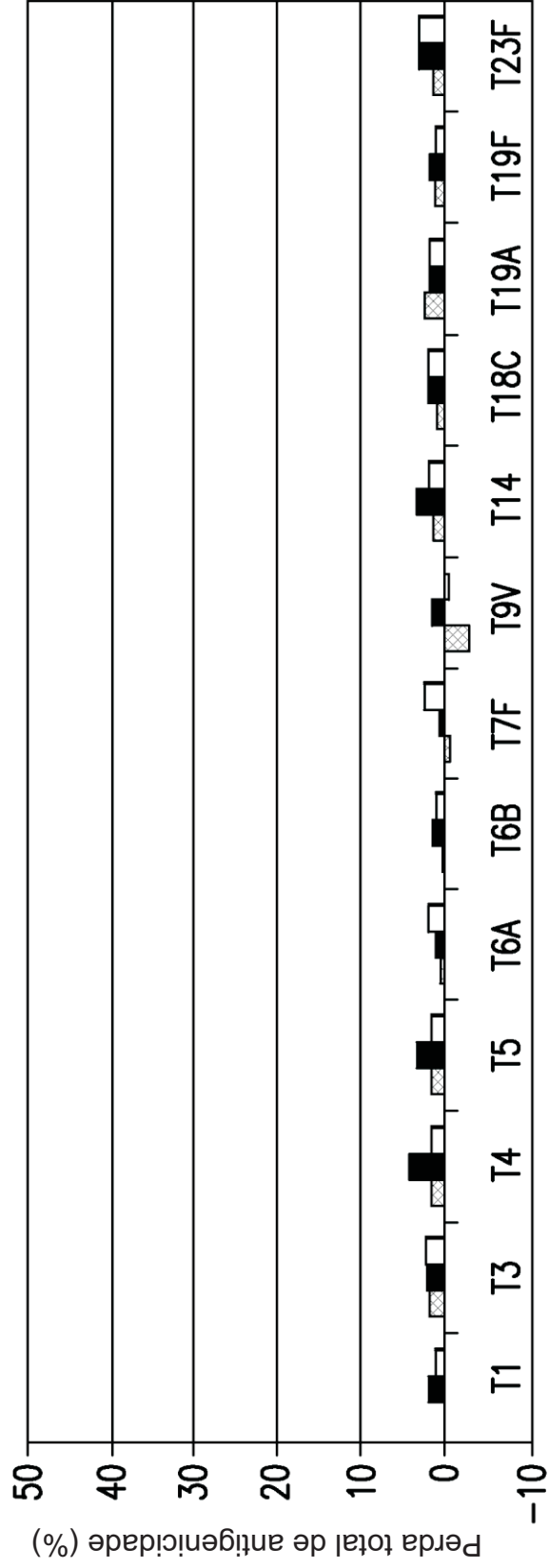


FIG.3

2 horas de agitação
8 horas de agitação
24 horas de agitação

Perda de antigenicidade de 13vPnC
com $AlPO_4$ em seringas Vetter

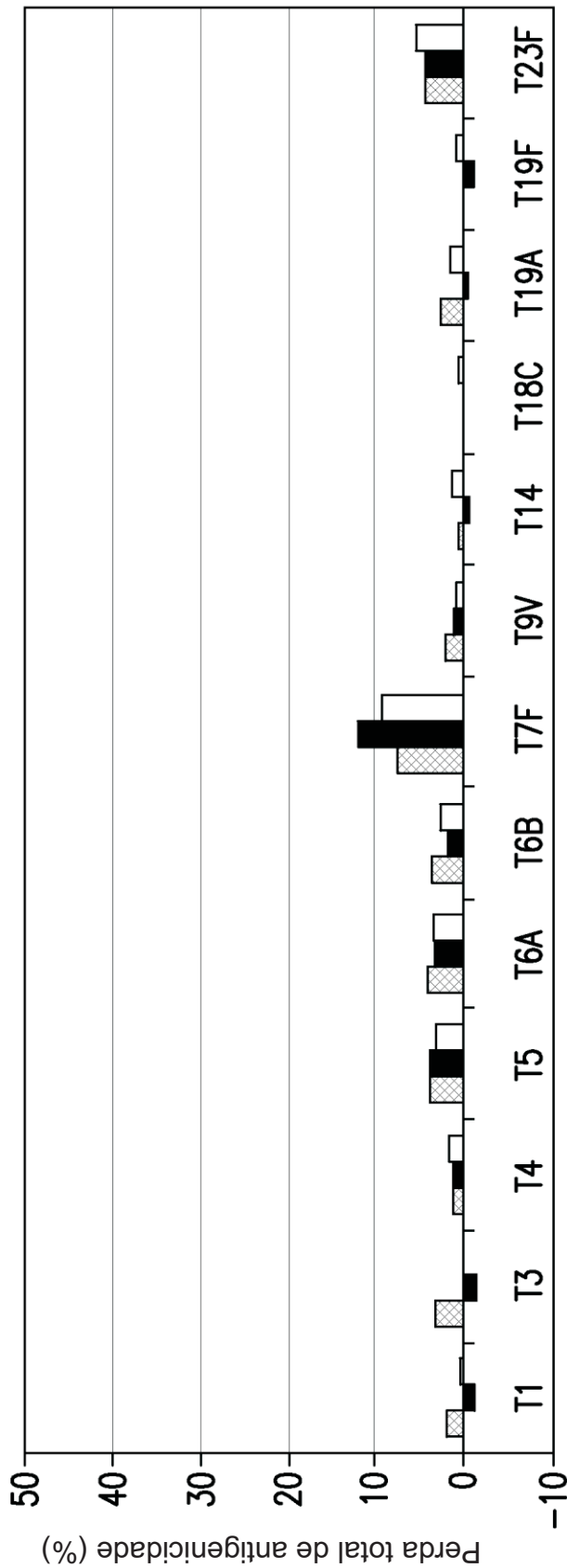


FIG.4

2 horas de agitação
8 horas de agitação
24 horas de agitação

Perda de antigenicidade de 13vPnC
com $AlPO_4$ em seringas Schott TopPac

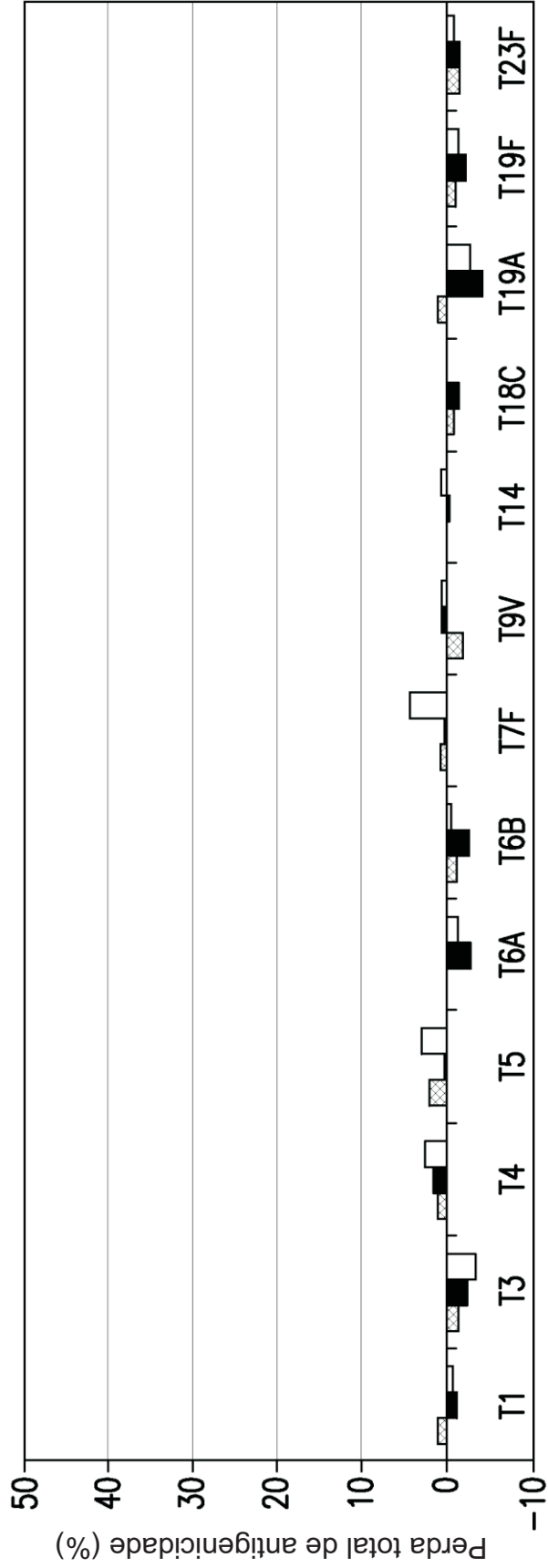


FIG.5

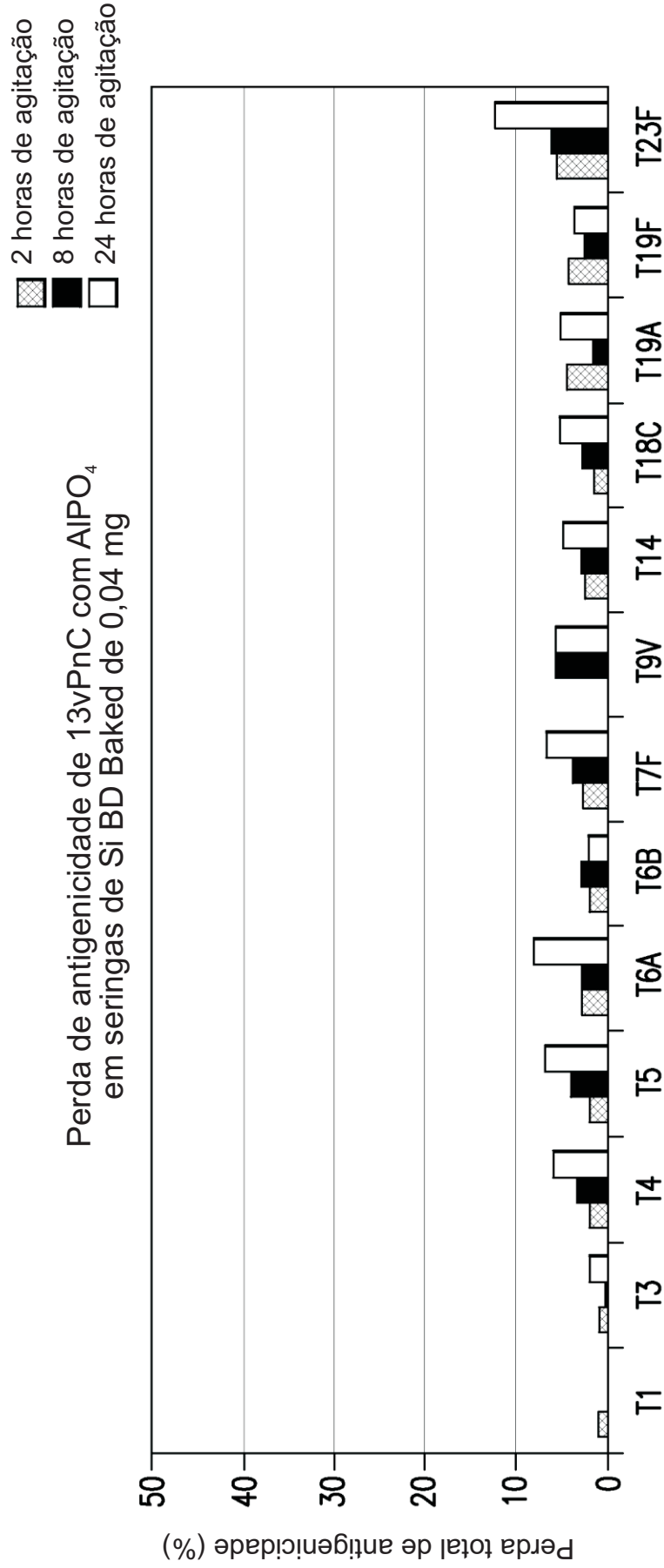


FIG. 6A

2 horas de agitação
8 horas de agitação
24 horas de agitação

Perda de antigenicidade de $^{13}\text{vPnC}$ sem AlPO_4
em seringas de Si BD Baked de 0,04 mg

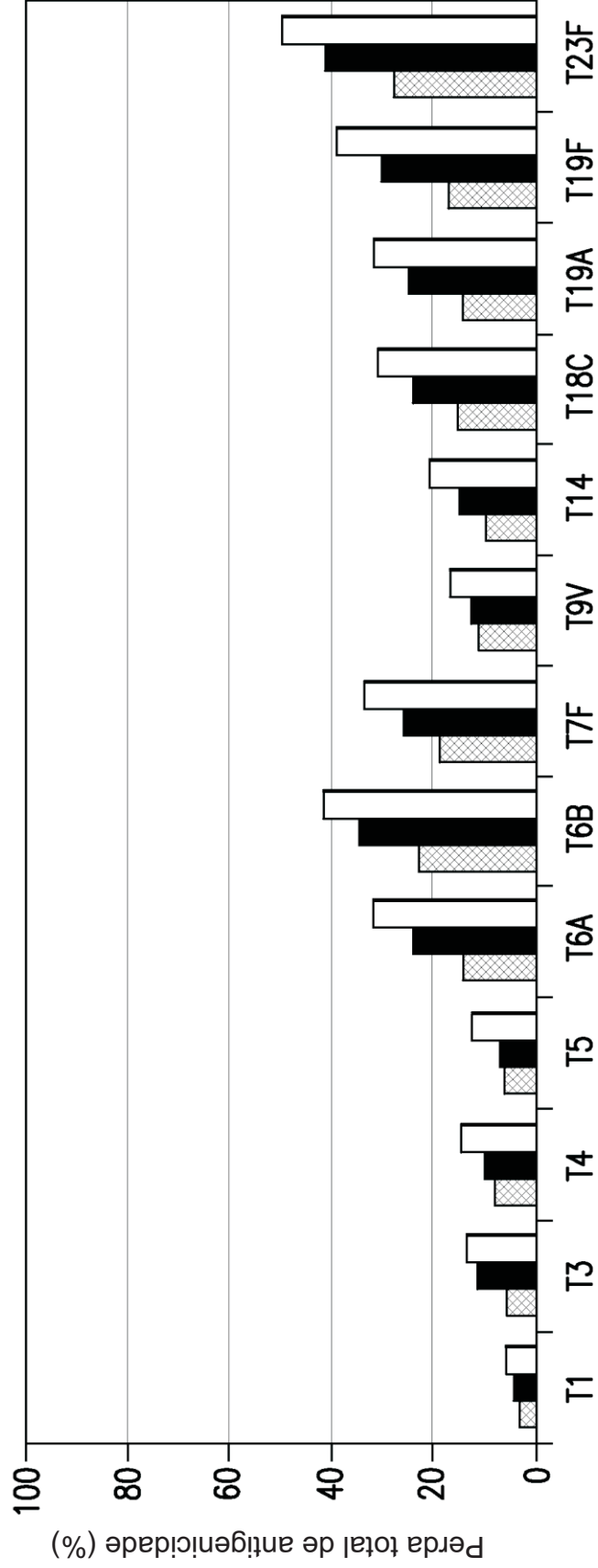


FIG. 6B

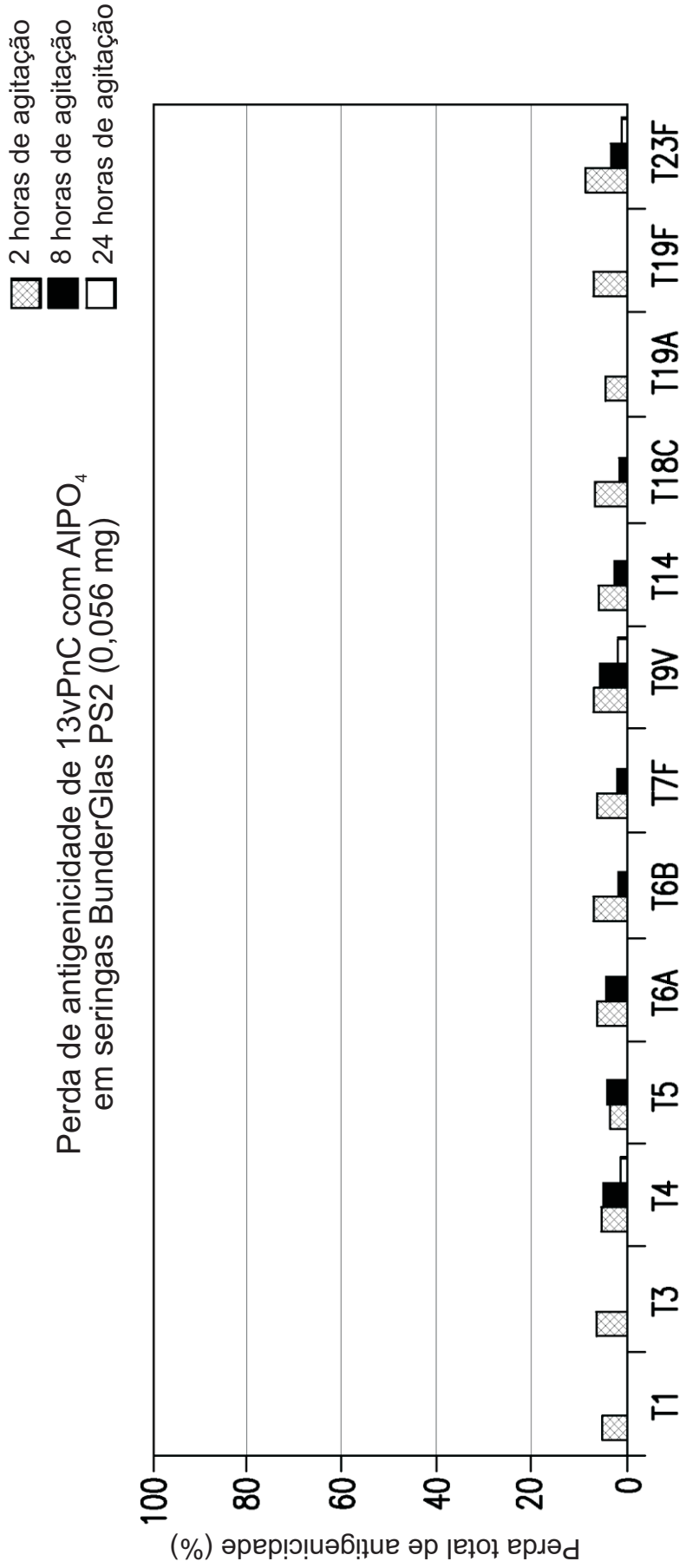


FIG.7A

2 horas de agitação
 8 horas de agitação
 24 horas de agitação

Perda de antigenicidade de $^{13}\text{vPnC}$ sem AlPO_4 em seringas BunderGlas PS2 (0,056 mg)

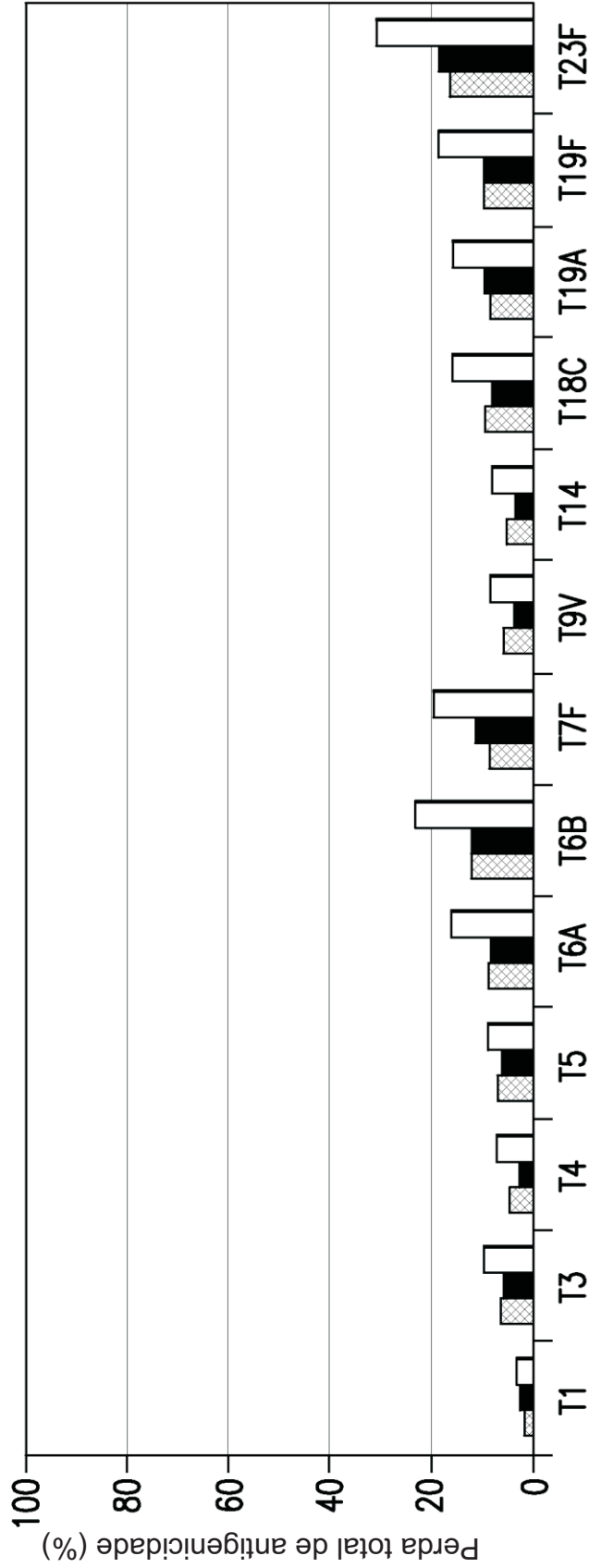


FIG. 7B