



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0711635-7 A2**

(22) Data de Depósito: 11/05/2007
(43) Data da Publicação: 08/11/2011
(RPI 2131)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/385
A61K 47/06

(54) **Título:** FORMULAÇÃO DE VACINA DE NICOTINA-VEÍCULO

(30) **Prioridade Unionista:** 12/05/2006 EP 06 113895.4

(73) **Titular(es):** CYTOS BIOTECHNOLOGY AG

(72) **Inventor(es):** Gerhard Winter, Lorenz Vogt, Rainer Lang

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007054604 de 11/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/131972de 22/11/2007

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO DE VACINA DE NICOTINA-VEÍCULO. A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, vacina e formulação de fármaco. A invenção proporciona formulações de composições que compreendem um conjugado de nicotina-veículo e um estabilizador, em que o dito estabilizador compreende um dissacarídeo não-redutor e um tensoativo não-iônico. As formulações de composições são estáveis após um longo tempo de armazenagem na temperatura ambiente.



PI0711635-7

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "FORMULAÇÃO DE VACINA DE NICOTINA-VEÍCULO".

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se aos campos de medicina, vacina e formulação farmacêutica. A invenção proporciona formulações que compreendem um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus e um estabilizador, onde o dito estabilizador compreende um dissacarídeo não-redutor e um tensoativo não-iônico. As formulações liofilizadas são estáveis após um
10 longo tempo de armazenagem na temperatura ambiente.

Técnica Relacionada

As vacinas para o tratamento ou a prevenção da dependência de nicotina têm atraído recentemente a atenção do público. Estas vacinas tipicamente contêm moléculas de nicotina que estão covalentemente ligadas a um veículo, visto que a nicotina é um composto orgânico de baixo peso
15 molecular e não é capaz de produzir uma resposta imune sozinha. Além disso, uma vez que a nicotina não possui grupos funcionais adequados para tal ligação a um veículo, a introdução de uma seqüência de ligação nas moléculas de nicotina é tipicamente requerida. O desenvolvimento de diversas vacinas foi recentemente descrito, por exemplo, em US 5.876.727, US 6.232.082,
20 US 6.656.469 e US 6.932.971. Os conjugados descritos não somente variam na natureza do veículo, como também na natureza da seqüência de ligação e no local onde a seqüência de ligação é introduzida na nicotina.

A US 6.932.971 descreve o acoplamento das moléculas de nicotina a uma partícula similar a vírus (VLP) por uma seqüência de ligação com
25 uma funcionalidade de éster, que forma um conjugado de nicotina-veículo ordenado e repetitivo e resulta na produção de alto título de anticorpos específicos para a nicotina. Os mesmos autores mostraram recentemente que uma vacina compreendendo uma partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA Q β , ao qual estão covalentemente ligadas moléculas de nicotina por
30 uma seqüência de ligação com uma funcionalidade de éster, pode ser eficaz para a cessação de fumar em seres humanos (Maurer et al, Eur. J. Immun.

2005 35:2031-40).

A exigência das composições de vacina de serem estáveis e minimizarem ou evitarem a degradação química e/ou física implica a necessidade de desenvolvimento de formulações que satisfaçam tais exigências.

5 Sumário da Invenção

Surpreendentemente foi descoberta uma formulação liofilizada que estabiliza os conjugados de nicotina-partícula similar a vírus, os quais contêm moléculas de nicotina covalentemente ligadas à partícula similar a vírus por meio de uma seqüência de ligação, a qual compreende pelo menos
10 uma funcionalidade de éster carboxílico. Além disso, descobriu-se surpreendentemente que esta formulação liofilizada é estável durante um longo período de tempo de armazenagem na temperatura ambiente ou mesmo em temperatura acelerada (40 °C). Ademais, a formulação liofilizada da presente invenção compreende uma composição de estabilizador simples e econômica devido a um número mínimo de excipientes incluídos nela.
15

Assim, em um aspecto, a invenção proporciona uma formulação liofilizada compreendendo (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de
20 nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador compreendendo: (c) pelo menos um dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v) em termos da con-
25 centração na formulação antes da liofilização; (d) pelo menos um tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6 antes da liofilização.

30 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um processo para preparar a formulação liofilizada da invenção.

Ainda em um outro aspecto, a invenção proporciona uma formu-

lação reconstituída compreendendo a formulação liofilizada da invenção dissolvida e/ou suspensa em uma solução fisiológica aceitável ou em água estéril, preferivelmente em água para injeção (WFI). Em uma modalidade preferida adicional, a formulação reconstituída adicionalmente compreende um adjuvante.

Descrição Detalhada da Invenção

A não ser que definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm os mesmos significados como comumente entendidos por alguém de versado na técnica à qual pertence esta invenção.

Adjuvante: O termo "adjuvante", como usado neste documento, refere-se a estimuladores não específicos da resposta imune ou substâncias que permitem a geração de um depósito no hospedeiro, que, quando combinadas com a vacina e a composição farmacêutica, respectivamente, da presente invenção, podem proporcionar uma resposta imune ainda mais aumentada. Pode ser usada uma variedade de adjuvantes. Os exemplos incluem o adjuvante de Freund completo e incompleto, o hidróxido de alumínio e o dipeptídeo de muramila modificado. Os adjuvantes adicionais são os géis minerais, tais como o hidróxido de alumínio, as substâncias tensoativas, tais como a lisolecitina, os polióis pluronic, os poliânions, os peptídeos, as emulsões de óleos, as hemocianinas de lapas de buraco da fechadura, o dinitrofenol, e os adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como o BCG (bacilo de Calmette Guerin) e o *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bastante conhecidos na técnica. Os adjuvantes adicionais que podem ser administrados com as composições da invenção incluem, porém não estão limitados ao imunomodulador de lipídio de monofosforila, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, Sais de alumínio (Alúmen), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294, e a Tecnologia de adjuvante virossômico. Os adjuvantes podem também compreender uma mistura destas substâncias. A VLP tem sido, em geral, descrita como um adjuvante. Entretanto, o termo "adjuvante", como usado dentro do contexto deste pedido, refere-se a um adjuvante não sendo a VLP usada para a formulação inventiva, preferivelmente além da

dita VLP.

Proteína de cobertura: O termo "proteína de cobertura", e o termo usado de modo intercambiável "proteína de capsídio" dentro deste pedido, refere a uma proteína viral, preferivelmente uma subunidade de um capsídio natural de um vírus, preferivelmente de um bacteriófago de RNA, que é capaz de ser incorporada em um capsídio de vírus ou uma VLP.

Formulação antes da liofilização: O termo "formulação antes da liofilização" refere-se à formulação líquida da presente invenção, a qual é submetida ao processo de liofilização, típica e preferivelmente dentro de 24 horas, e adicionalmente, típica e preferivelmente dentro de 8 horas, e ainda mais típica e preferivelmente dentro de 2 a 4 horas. O termo "processo de liofilização" e o termo "processo de dessecação por congelamento" são usados de modo intercambiável neste documento e serão considerados como sinônimos.

Formulação liofilizada: o termo "formulação liofilizada" refere-se à composição que é obtida ou obténível pelo processo de dessecação por congelamento de uma formulação líquida. Típica e preferivelmente, ela é uma composição sólida tendo um teor de água de menos do que 5%, preferivelmente de menos do que 3%. De preferência, o termo "formulação liofilizada" refere-se à composição obtida ou obténível pelo processo de preparar a formulação liofilizada da presente invenção.

Formulação reconstituída: o termo "formulação reconstituída" refere-se à formulação líquida que resultou da dissolução e/ou suspensão da formulação liofilizada em uma solução fisiologicamente aceitável.

Seqüência de ligação: o termo "seqüência de ligação", conforme usado neste documento, refere-se a uma entidade molecular que liga covalentemente a molécula de nicotina à partícula similar a vírus.

Temperatura ambiente: o termo "temperatura ambiente", conforme usado neste documento, refere-se a uma temperatura de 15°C a 30 °C, preferivelmente de 20°C a 27°C, mais preferivelmente 25°C.

Estável: o termo "estável", como usado neste documento, refere-se ao estado da formulação liofilizada da invenção compreendendo conjuga-

dos de nicotina-VLP, preferivelmente compreendendo conjugados de nicotina-VLP de bacteriófago de RNA Q β , e ainda mais preferivelmente compreendendo Nic-Q β , no qual, até 15 semanas, preferivelmente até 20 semanas, mais preferivelmente até 25 semanas de armazenagem na temperatura ambiente ou em temperatura acelerada (40°C), (i) a quantidade total de nicotina e derivados de nicotina livres é menos do que 7%, preferivelmente menos do que 5%, mais preferivelmente menos do que 3%, ainda mais preferivelmente menos do que 2%, da quantidade total de nicotina na formulação, e (ii) a quantidade da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP, preferivelmente da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP de bacteriófago de RNA Q β , preferivelmente da soma de Nic-oligômeros e agregados de Q β , não aumenta mais do que 10%, preferivelmente 7%, mais preferivelmente 4% em comparação com a quantidade da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP, preferivelmente da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP de bacteriófago de RNA Q β , preferivelmente da soma de Nic-oligômeros e agregados de Q β , na formulação antes da liofilização. A quantidade da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP na formulação após a armazenagem subtraída a quantidade da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP antes da liofilização dá a porcentagem de aumento, como usado neste documento. Por exemplo, se na formulação antes da liofilização houver 1% de Nic-oligômeros e agregados de Q β e, após a liofilização de acordo com a presente invenção e 15 semanas de armazenagem, houver 4% de Nic-oligômeros e agregados de Q β na formulação reconstituída, então a porcentagem de aumento é 3%. O termo "nicotina e derivados de nicotina livres", conforme usado neste documento, refere-se à nicotina e aos derivados de nicotina que não estão covalentemente ligados à partícula similar a vírus da invenção. O método para determinar a quantidade total de nicotina, bem como de nicotina ou derivados de nicotina livres, é preferivelmente o ensaio de RP-HPLC, como descrito no EXEMPLO 1 aqui contido. O método para determinar a quantidade da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP, preferivelmente da soma de nicotina-oligômeros e agregados de VLP de bacteriófago de RNA Q β , prefe-

rivelmente da soma de Nic-oligômeros e agregados de Q β , é preferível o ensaio de fracionamento de fluxo de campo de fluxo assimétrico (AF4), como descrito no EXEMPLO 1 aqui contido, em que as frações contendo partículas maiores do que os monômeros e os dímeros de nicotina-VLP, preferi-
5 velmente maiores do que os monômeros e os dímeros de nicotina-VLP de bacteriófago de RNA Q β , preferivelmente maiores do que os monômeros e os dímeros de Nic-Q β , são combinadas no cálculo.

Oligômero: O termo "oligômero", conforme usado no termo "nicotina-oligômero de VLP", "nicotina-oligômero de VLP de bacteriófago de RNA
10 Q β " e "Nic-oligômero de Q β ", refere-se à agregação de pelo menos três e até dez VLPs ou VLPs de Q β , respectivamente.

Agregado: O termo "agregado", conforme usado no termo "nicotina-agregado de VLP", "nicotina-agregado de VLP de bacteriófago de RNA
15 Q β " e "Nic-agregado de Q β ", refere-se à agregação de pelo menos dez VLPs ou VLPs de Q β , respectivamente.

Partícula de vírus: O termo "partícula de vírus", conforme usado neste documento, refere-se à forma morfológica de um vírus. Em alguns tipos de vírus, compreende um genoma circundado por um capsídeo de proteína; outros têm estruturas adicionais (p.ex., cápsulas, caudas, etc.).
20

A partícula similar a vírus (VLP), conforme usada neste documento, refere-se a uma partícula de vírus não replicativa ou não-infecciosa, preferivelmente uma não replicativa e não-infecciosa, ou refere-se a uma estrutura não replicativa ou não-infecciosa, preferivelmente uma não replicativa e não-infecciosa, que se parece com uma partícula de vírus, preferivel-
25 mente um capsídeo de um vírus. O termo "não replicativa", conforme usado neste documento, refere-se a ser incapaz de replicar o genoma compreendido pela VLP. O termo "não-infecciosa", conforme usado neste documento, refere-se a ser incapaz de entrar na célula hospedeira. De preferência, uma partícula similar a vírus de acordo com a invenção é não replicativa e/ou
30 não-infecciosa visto que não tem todo o, ou parte do, genoma ou função do genoma viral. Em uma modalidade, uma partícula similar a vírus é uma partícula de vírus, na qual o genoma viral tenha sido física ou quimicamente

inativado. De modo típico e mais preferivelmente, uma partícula similar a vírus não tem todos os, ou parte dos, componentes replicativos e infecciosos do genoma viral. Uma partícula similar a vírus de acordo com a invenção pode conter ácido nucléico distinto de seu genoma. Uma modalidade típica e preferida de uma partícula similar a vírus de acordo com a presente invenção é um capsídio viral, tal como o capsídio viral do vírus, do bacteriófago, preferivelmente do fago de RNA, correspondente. Os termos "capsídio viral" ou "capsídio" referem-se a um agrupamento macromolecular composto de subunidades de proteínas virais. Tipicamente, existem 60, 120, 180, 240, 300, 360 e mais do que 360 subunidades de proteínas virais. Típica e preferivelmente, as interações destas subunidades resultam na formação de capsídio viral ou estrutura similar ao capsídio viral com uma organização repetitiva inerente, onde a dita estrutura é, tipicamente, esférica ou tubular. Por exemplo, os capsídios de fagos de RNA ou HBcAgs têm uma forma esférica de simetria icosaédrica. O termo "estrutura similar a capsídio", conforme usado neste documento, refere-se a um agrupamento macromolecular composto de subunidades de proteínas virais que se parecem com a morfologia do capsídio no sentido acima definido, porém que se desviam do agrupamento simétrico típico, ao mesmo tempo mantendo um grau suficiente de ordem e repetição. Uma característica comum da partícula de vírus e da partícula similar a vírus é seu arranjo altamente ordenado e repetitivo de suas subunidades.

Partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA: Conforme usado neste documento, o termo "partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA" refere-se a uma partícula similar a vírus compreendendo, ou preferivelmente consistindo essencialmente em, ou consistindo em, proteínas de cobertura, mutantes ou fragmentos delas, de um bacteriófago de RNA. Além disso, partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA que se parece com a estrutura de um bacteriófago de RNA, que é não replicativa e/ou não-infecciosa, e que não tem pelo menos o gene ou os genes que codificam para o mecanismo de replicação do bacteriófago de RNA, e tipicamente também que não tem o gene ou os genes codificando a proteína ou

as proteínas responsáveis pela união viral ao, ou entrada no, hospedeiro. Esta definição deve, entretanto, também incluir as partículas similares a vírus de bacteriófagos de RNA, nas quais o gene ou os genes antes mencionados ainda estão presentes, porém inativos, e, portanto, também resultan-

5 do em partículas similares a vírus não replicativas e/ou não-infecciosas de um fago de RNA. As VLPs preferidas derivadas de bacteriófagos de RNA exibem simetria icosaédrica e consistem em 180 subunidades. Dentro desta presente divulgação, os termos "subunidade" e "monômero" são usados de modo intercambiável e equivalente dentro deste contexto. Os métodos prefe-

10 ridos para tornar uma partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA não replicativa e/ou não-infecciosa é por inativação física, química, tal como irradiação de UV, tratamento com formaldeído, típica e preferivelmente por manipulação genética.

Um ou uma: quando os termos "um" ou "uma" são usados nesta

15 descrição, eles significam "pelo menos um(a)" ou "um(a) ou mais", a não ser que de outro modo indicado.

Em um aspecto, a invenção proporciona uma formulação liofilizada compreendendo: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo

20 menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador compreendendo: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-

25 redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e onde a dita

30 composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6 antes da liofilização. Como se sabe na técnica que a liofilização da composição de proteína normalmente resulta em um produto que é mais estável e, portanto, tem

uma vida útil mais longa. Além disso, a formulação liofilizada tem uma estabilidade aumentada da funcionalidade de éster presente no conjugado de nicotina-VLP e uma estabilidade aumentada do componente de RNA.

Alternativamente, em um outro aspecto, a invenção proporciona
5 uma formulação líquida compreendendo: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação
10 compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador compreendendo: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v) em termos da concentração na dita formulação; (d) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concen-
15 tração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na dita formulação; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6. Além disso, a invenção proporciona uma formulação obtível por um método de liofilização que compreende a etapa de congelar a dita formulação líquida e secar a dita formulação líquida.

20 Em um outro aspecto alternativo, a invenção proporciona uma formulação líquida compreendendo: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita VLP por uma se-
25 quência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador compreendendo ou consistindo em: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na dita formulação; e onde a dita
30 composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6.

Em uma modalidade preferida, a formulação líquida ou liofilizada da invenção compreende somente um carboidrato, preferivelmente somente

um açúcar, o açúcar é preferivelmente um dissacarídeo não-redutor. Em uma modalidade preferida, a formulação líquida ou liofilizada da invenção não compreende um aminoácido adicionado. Isto significa que nenhum aminoácido adicional é adicionado à formulação. Entretanto, a formulação pode
5 compreender uma quantidade mínima de aminoácidos devido à degradação da partícula similar a vírus.

Em uma modalidade preferida, a formulação líquida ou liofilizada da invenção não compreende um soro albumina bovina ou uma soro albumina humana. Em uma modalidade preferida adicional, a formulação da invenção não compreende qualquer tipo de uma proteína do soro. A exclusão do soro vantajosamente evita o problema potencial de contaminação do soro.
10

Em uma modalidade preferida, a formulação líquida ou liofilizada da invenção, em particular a formulação liofilizada da invenção, não compreende o cloreto de sódio. A exclusão do NaCl evita a osmolaridade alta desnecessária na formulação. Além disso, a exclusão do sal adicionalmente elimina o efeito adverso possível do sal sobre a estabilidade da proteína durante a liofilização.
15

Em uma modalidade preferida, o pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor é a sacarose ou a trealose. Em uma modalidade preferida adicional, o dissacarídeo não-redutor é a trealose.
20

Em uma modalidade preferida, a concentração do pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor é de 3% a 15% (p/v), preferivelmente de 5% a 12% (p/v), preferivelmente de 5% a 10% (p/v), preferivelmente de 7,5% a 10% (p/v), preferivelmente 10% (p/v) em termos de concentração na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos da concentração na formulação antes da liofilização. A concentração de trealose expressa no pedido inteiro, a não ser que de outro modo explicitamente indicado, refere-se à concentração de diidrato ($2H_2O$) de trealose. É conhecimento geral para uma pessoa versada converter entre a concentração de diidrato de trealose e a concentração de trealose sem água.
25
30 Por exemplo, 10% de diidrato de trealose são iguais a 9% de trealose sem água.

Em uma modalidade preferida, a composição de estabilizador da formulação líquida ou liofilizada da invenção, preferivelmente da formulação liofilizada, adicionalmente compreende pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa. Em uma modalidade preferida adicional, a concentração total do dito dissacarídeo não-redutor e do dito agente de massa é de 0,5% a 15% (p/v), com a condição que a concentração do dito dissacarídeo não-redutor seja pelo menos 0,5% (p/v), preferivelmente pelo menos 1% (p/v), em termos da concentração na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos da concentração na formulação antes da liofilização. Ainda em uma modalidade preferida adicional, a concentração total do dito pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor e do dito pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa é de 3% a 10%, preferivelmente de 3% a 8% (p/v), preferivelmente de 3% a 7%, preferivelmente de 4,5% a 7%, mais preferivelmente de 4,5% a 6% (p/v) na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos da concentração na formulação antes da liofilização.

Em uma modalidade preferida, a concentração total do dito pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor e do dito pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa é de 3% a 10% (p/v), preferivelmente de 4,5% a 7% (p/v) na formulação antes da liofilização, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é pelo menos 1% (p/v). De preferência, a osmolaridade da formulação é de 250 a 350 mosm/Kg, mais preferivelmente cerca de 300 mosm/Kg.

Em uma modalidade preferida, a concentração total do dito pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor e do dito pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa é de 3% a 10% (p/v), preferivelmente de 4,5% a 7% (p/v) na formulação antes da liofilização, onde a concentração do dito agente de massa é pelo menos 1% (p/v). De preferência, a osmolaridade da formulação é de 250 a 350 mosm/Kg, mais preferivelmente cerca de 300 mosm/Kg.

Em uma modalidade preferida, a concentração total do dito pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor e do dito

pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa é de 3% a 10% (p/v), preferivelmente de 4,5% a 7% (p/v) na formulação antes da liofilização, onde a concentração do dito agente de massa é pelo menos 1% (p/v) e a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é pelo menos 1% (p/v). De preferência, a osmolaridade da formulação é de 250 a 350 mosm/Kg, mais preferivelmente cerca de 300 mosm/Kg.

Em uma modalidade preferida, o dissacarídeo não-redutor é a trealose e o agente de massa é o manitol.

Em uma modalidade muito preferida, a concentração total do dito pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor e do dito pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa é de 5,0 a 6,5% (p/v) na formulação antes da liofilização. Em uma modalidade preferida adicional, a razão entre o agente de massa e o dissacarídeo não-redutor é de 3,5:1 a 4,5:1, preferivelmente 4:1. Ainda em uma modalidade preferida adicional, o dissacarídeo não-redutor é a trealose e o agente de massa é o manitol. Em uma modalidade muito preferida, a concentração de trealose é 1,1% (p/v) e a concentração de manitol é 4,4% (p/v), na formulação antes da liofilização.

Em uma modalidade preferida, o agente de massa é o manitol ou a glicina. Em uma modalidade preferida adicional, o agente de massa é o manitol. A inclusão do agente de massa, preferivelmente o manitol, contribui para a obtenção de uma estrutura de torta estável e pode permitir uma temperatura de secagem primária mais elevada no processo de liofilização, o que vantajosamente reduz o custo de produção.

Em uma modalidade preferida, o pH da composição de estabilizador é de 5,4 a 6,6, preferivelmente de 5,6 a 6,4, preferivelmente de 5,8 a 6,4, preferivelmente de 6,0 a 6,4, preferivelmente 6,2. Em uma modalidade preferida adicional, o pH está a 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 e 6,6.

Em uma modalidade preferida, o tensoativo não-iônico é de 0,0025% a 0,02% (p/v), preferivelmente 0,0025%-0,01% (p/v), preferivelmente 0,005% (p/v), na formulação líquida, ou com relação à formulação liofiliza-

da, em termos da concentração na formulação antes da liofilização.

Em uma modalidade preferida, o tensoativo não-iônico é o polissorbato 20 ou o polissorbato 80. Em uma modalidade preferida, o tensoativo não-iônico é o polissorbato 20.

5 As partículas similares a vírus podem ser de qualquer vírus conhecido na técnica tendo uma estrutura ordenada e repetitiva. Os vírus de DNA ou RNA ilustrativos, cuja proteína de cobertura ou de capsídio pode ser usada para a preparação das VLPs, foram descritos no WO 2004/009124 na página 25, linhas 10-21, na página 26, linhas 11-28, e na página 28, linha 4,
10 até a página 31, linha 4. Estas descrições são incorporadas neste documento como forma de referência.

Em uma modalidade preferida adicional, a partícula similar a vírus é de um vírus selecionado a partir de um grupo que consiste em: a) bacteriófagos de RNA; b) bacteriófagos; c) vírus da Hepatite B, preferivelmente a sua proteína de capsídio (Ulrich, et al, *Virus Res.* 50:141-182 (1998)) ou a sua proteína de superfície (WO 92/11291); d) vírus do sarampo (Warnes, et al., *Gene* 160:173-178 (1995)); e) vírus de Sindbis; f) rotavírus (US 5.071.651 e US 5.374.426); g) vírus da febre aftosa (Twomey, et al., *Vaccine* 13:1603 1610, (1995)); h) vírus de Norwalk (Jiang, X., et al., *Science* 250:1580 1583 (1990); Matsui, S.M., et al., *J. Clin. Invest.* 87:1456 1461 (1991)); i) Alfavírus; j) retrovírus, preferivelmente a sua proteína GAG (WO 96/30523); k) retrotransposon Ty, preferivelmente a proteína p1; l) vírus do papiloma humano (WO 98/15631); m) vírus do polioma; n) vírus do mosaico do tabaco; o) vírus do mosaico do feijão-de-corda; e p) Vírus Flock House; q)
25 Vírus do Mosqueado Clorótico do Feijão-de-Corda; e r) um Vírus do Mosaico da Alfafa. Os métodos para produzir a VLP de Vírus Mosqueado Clorótico de Feijão-de-Corda, Vírus do Mosaico da Alfafa e vírus do mosaico do feijão-de-corda foram descritos em US 2005/0260758 e em WO05067478.

Em uma modalidade preferida, a partícula similar a vírus é de
30 um bacteriófago de RNA. Em uma modalidade preferida adicional, o bacteriófago de RNA é selecionado a partir do grupo que consiste em a) bacteriófago Q β ; b) bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bac-

teriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; l) bacteriófago PP7 e m) bacteriófago AP205. Em uma modalidade preferida, a partícula similar a vírus é uma partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA Q β . Os métodos para a
5 produção de VLP de um bacteriófago de RNA, em particular VLP de bacteriófago Q β e VLP de bacteriófago AP205, foram descritos nas páginas 37-47 do WO 04009124 e nos seus EXEMPLOS 1 e 21.

Em uma modalidade preferida, a partícula similar a vírus é de bacteriófago de RNA Q β . em uma modalidade preferida adicional, a partícula
10 similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β é expressa de modo recombinante em E. coli.

Em uma modalidade preferida, o conjugado de nicotina-VLP é de 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos de concentração na formulação antes da liofilização.
15 Em uma modalidade preferida, o conjugado de nicotina-VLP é de 0,2 mg/ml a 2 mg/ml na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos da concentração na formulação antes da liofilização. Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, a concentração do conjugado de nicotina-VLP na formulação líquida, típica e preferivelmente
20 em termos de concentração na formulação antes da liofilização, é 0,2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,0 mg/ml ou 2 mg/ml. Em uma outra modalidade preferida novamente da presente invenção, a concentração do conjugado de nicotina-VLP na formulação líquida, típica e preferivelmente em termos de concentração na formulação antes da liofilização, é 0,2 mg/ml ou 0,6 mg/ml, preferi-
25 velmente 0,2 mg/ml.

Diversas seqüências de ligação, que compreendem uma funcionalidade de éster carboxílico com a qual as moléculas de nicotina podem ser ligadas covalentemente a um veículo, foram descritas em US 5876727, US 6656469 e US 6932971. Estes ensinamentos específicos são incorporados
30 neste documento como referência. As seqüências de ligação utilizáveis para a presente invenção e compreendendo uma funcionalidade de éster são, por exemplo, as seqüências de ligação chamadas CJ2, CJ2.1, CJ2.2, CJ2.3,

CJ4, CJ4.1, CJ5, CJ5.1, CJ8, CJ8.1, CJ9 e CJ11, conforme descrito na coluna 17 da US5876727.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a seqüência de ligação compreende A-X-CO(O)-Y-Z-B, onde A representa a molécula de nicotina e onde B representa a partícula similar a vírus, e onde X = (CH₂)_m, com m = 1-4, Y = (CH₂)_n, com n = 1-8, e Z = C(O).

Em uma modalidade muito preferida, a seqüência de ligação compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em: CH₂OCO(CH₂)_nCO, onde n = 1-8, preferivelmente n = 1-4, preferivelmente n = 1 ou 2, e mais preferivelmente n = 2. Novamente em uma modalidade muito preferida, a seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, onde A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus.

A seqüência de ligação pode estar covalentemente ligada à piridina ou ao anel de pirrolidina da molécula de nicotina. Os exemplos sobre isso são, em particular, descritos em US 5876727, US 6656469 e US 6932971. Em uma modalidade muito preferida, a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina.

A totalidade das moléculas de nicotina covalentemente ligadas está presente na mesma configuração absoluta, isto é, todas as moléculas de nicotina têm a configuração (*R*) ou todas as moléculas de nicotina têm a configuração (*S*) de ocorrência natural, ou elas estão presentes em qualquer mistura destas. De preferência, as moléculas de nicotina estão covalentemente ligadas como, por exemplo, aproximadamente uma mistura igual ou uma mistura igual tanto da configuração (*R*) quanto da configuração (*S*) de ocorrência natural está presente. Em uma modalidade muito preferida, o conjugado de nicotina-VLP compreendido pelas formulações inventivas é obtível ou obtido usando uma mistura racêmica de moléculas de nicotina ou derivados de nicotina, típica e preferivelmente usando uma mistura racêmica de moléculas de nicotina ou derivados de nicotina compreendendo as moléculas de nicotina com a dita seqüência de ligação covalentemente ligada a elas, para a reação de acoplamento à partícula similar a vírus, resultan-

do no conjugado de nicotina-partícula similar a vírus de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferida, o conjugado de nicotina-VLP, preferivelmente nicotina-VLP de bacteriófago de RNA Q β , preferivelmente
5 NicQ β , é formado a partir do material de partida O-succinil-3'-hidroximetilnicotina e do material de partida VLP de Q β .

Em uma modalidade preferida, a composição de estabilizador compreende um agente de tamponamento tal como Succinato, Acetato, Maleato, Citrato, Lactato, Tartarato, Tris, Bis-tris, Trietanolamina, Tricina, Bicina,
10 Histidina, Aspartato, Glicinato, Glutamato, Lisina, Ftalato, Formiato, Alanina, Fenilalanina, Arginina e Prolina.

Em uma modalidade preferida, o agente de tamponamento é selecionado a partir do grupo consistindo em fosfato de sódio, fosfato de potássio e histidina/histidina HCl, acetato de sódio, succinato de sódio. Em
15 uma modalidade preferida adicional, a concentração do agente de tamponamento é de 10-20 mM em termos de concentração na formulação líquida, ou com relação à formulação liofilizada, em termos de concentração na formulação antes da liofilização. Em uma modalidade preferida adicional, o agente de tamponamento é o fosfato de sódio ou o fosfato de potássio, preferivelmente o fosfato de sódio. Em uma modalidade preferida, o agente de tamponamento é histidina/histidina HCl. Em uma modalidade preferida, o agente de tamponamento é o acetato de sódio. Em uma modalidade preferida, o agente de tamponamento é o succinato de sódio.
20

Em uma modalidade preferida, a formulação líquida ou liofilizada da invenção adicionalmente compreende o cloreto de sódio de 0 a 90 mM, preferivelmente de 0 a 60 mM, mais preferivelmente de 0 a 30 mM. De preferência, a inclusão do cloreto de sódio é para estabilizar a solução líquida ou para ajustar a osmolaridade das formulações líquidas ou liofilizadas da invenção.
25

Em uma modalidade muito preferida adicional, a invenção proporciona uma formulação liofilizada da invenção que compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou consiste em: (i) pelo menos um
30

conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de

5 ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador consistindo em: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v), preferivelmente de 3% a 12% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) pelo menos um,

10 preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (e) um agente de tamponamento, onde o dito agente de tamponamento é preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de sódio, fosfato de potássio, acetato de

15 sódio, succinato de sódio e Histidina/Histidina HCl; (f) opcionalmente 0-30 mM de NaCl em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6 antes da liofilização.

Em uma modalidade alternativamente preferida, a invenção proporciona uma formulação liofilizada da invenção que compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou consiste em: (i) pelo menos um

20 conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de

25 ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador consistindo em: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v), em termos da concentração na formulação

30 antes da liofilização; (d) pelo menos um, preferivelmente um único, agente de massa, onde a concentração total do dito dissacarídeo não-redutor e do dito agente de massa é de 0,5% a 15% (p/v) com a condição que a concen-

tração do dito dissacarídeo não-redutor seja pelo menos 0,5% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização, (e) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (f) um agente de tamponamento, onde o dito agente de tamponamento é preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste em fosfato de sódio, fosfato de potássio, acetato de sódio, succinato de sódio e Histidina/Histidina HCl; (g) opcionalmente 0-30 mM de NaCl em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6 antes da liofilização.

Em uma modalidade muito preferida, a invenção proporciona uma formulação liofilizada da invenção que compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou consiste em: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus, preferivelmente pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA, preferivelmente pelo menos um de nicotina-partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , ainda preferivelmente um conjugado de NicQ β , compreendendo (a) uma partícula similar a vírus, preferivelmente uma partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , onde a concentração do dito conjugado é preferivelmente de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml, preferivelmente de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml, em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus, preferivelmente à dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador consistindo em: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor, preferivelmente a trealose, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 5% a 12%, preferivelmente 10% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, preferivelmente o polissorbato

20, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,005% a 0,1% (p/v), preferivelmente 0,005% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (e) um agente de tamponamento, onde o dito agente de tamponamento é preferivelmente o fosfato de sódio, o fosfato de potássio, o acetato de sódio, o succinato de sódio ou a Histidina/Histidina HCl; mais preferivelmente é a Histidina/Histidina HCl, e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,6 a 6,2 antes da liofilização.

A presente invenção proporciona uma formulação liofilizada compreendendo ou alternativamente consistindo em: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β ; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, e onde A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , e onde a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina; e (ii) uma composição de estabilizador compreendendo: (c) um dissacarídeo não-redutor, onde o dito dissacarídeo não-redutor é a trealose, e onde a concentração de trealose é 10% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) um tensoativo não-iônico, onde o dito tensoativo não-iônico é o polissorbato 20, e onde a concentração de polissorbato 20 é 0,005% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 6,2 antes da liofilização.

A presente invenção proporciona uma formulação liofilizada compreendendo ou alternativamente consistindo em: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β ; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, e on-

de A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , e onde a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina; e (ii) uma composição de estabilizador consistindo essencialmente em, ou consistindo em: (c) um dissacarídeo não-redutor, onde o dito dissacarídeo não-redutor é a trealose, e onde a concentração de trealose é 10% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) um tensoativo não-iônico, onde o dito tensoativo não-iônico é o polissorbato 20, e onde a concentração de polissorbato 20 é 0,005% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (e) um agente de tamponamento, onde o dito agente de tamponamento é o fosfato de sódio ou a Histidina/Histidina HCl, e onde a concentração do dito fosfato de sódio ou da dita Histidina/Histidina HCl é 20 mM; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 6,2 antes da liofilização.

Em uma modalidade muito preferida adicional, a invenção proporciona uma formulação liofilizada da invenção que compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou consiste em: (i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo: (a) uma partícula similar a vírus; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e (ii) uma composição de estabilizador consistindo em: (c) pelo menos um, preferivelmente um único, dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 5% a 15% (p/v), preferivelmente 10% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (d) pelo menos um, preferivelmente um único, tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v), preferivelmente 0,005% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização; (e) um agente de tamponamento, onde o dito agente de tamponamento é preferivelmente selecionado a partir de acetato de sódio, succinato de sódio e Histidina/Histidina HCl; (f) opcionalmente 0-30 mM de NaCl em termos da concen-

tração na formulação antes da liofilização; e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 6,0 a 6,4, preferivelmente 6,2, antes da liofilização.

5 Em uma modalidade preferida, a formulação liofilizada da invenção é estável por pelo menos 15 semanas, preferivelmente pelo menos 25 semanas, na temperatura ambiente ou mesmo na temperatura acelerada (40°C).

10 Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma formulação reconstituída compreendendo a composição liofilizada da invenção dissolvida e/ou suspensa em uma solução fisiologicamente aceitável ou em água estéril, preferivelmente em água para injeção. Em uma outra modalidade preferida, a solução é a solução de NaCl. De preferência, a formulação reconstituída tem um valor de osmolaridade fisiologicamente aceitável.

15 Em uma modalidade preferida, a formulação reconstituída adicionalmente compreende um adjuvante. Em uma modalidade preferida adicional, o adjuvante são os géis hidratados de hidróxido de alumínio ou os géis hidratados de fosfato de alumínio.

20 Em um aspecto, a presente invenção proporciona um processo para preparar a formulação liofilizada da invenção, compreendendo as etapas de: (i) congelamento da formulação antes da liofilização por redução da temperatura de prateleira abaixo de -35°C, preferivelmente abaixo de -38°C, preferivelmente abaixo de -40°C, preferivelmente abaixo de -45°C e preferivelmente abaixo de -50°C; (ii) secagem primária da formulação na temperatura de prateleira de -45°C a -15°C, preferivelmente de -40°C a -20°C, preferivelmente de -35°C a -25°C, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar); (iii) secagem secundária da dita formulação na temperatura de prateleira de 10°C a 40°C, preferivelmente de 10°C a 30°C, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar). O processo opcionalmente compreende uma etapa de secagem da formulação na temperatura de prateleira a -30°C até -15°C, preferivelmente a -20°C, após a etapa (ii), com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar).

30 Em uma modalidade preferida, a pressão da câmara durante a

secagem primária e secundária é de $0,005 \times 10^5$ mPa (0,005 mbar) a $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar), preferivelmente de $0,020 \times 10^5$ mPa (0,020 mbar) a $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar); preferivelmente de $0,03 \times 10^5$ a $0,1 \times 10^5$ mPa (0,03 a 0,1 mbar), preferivelmente de $0,040 \times 10^5$ a $0,05 \times 10^5$ mPa (0,040 a 0,05 mbar).

Em uma outra modalidade preferida, a redução da temperatura de prateleira é efetuada na taxa de $0,1^\circ\text{C}$ a $1,0^\circ\text{C}/\text{min}$, preferivelmente de $0,5^\circ\text{C}$ a $1,0^\circ\text{C}/\text{min}$.

Em uma modalidade específica, o processo da invenção compreende as etapas de: (i) congelamento da formulação antes da liofilização por redução da temperatura de prateleira abaixo de -40°C , preferivelmente abaixo de -50°C ; (ii) secagem primária da formulação na temperatura de prateleira de -35°C por pelo menos 10 horas, preferivelmente por 20 horas, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar); (iii) secagem secundária da dita formulação na temperatura de prateleira de 10°C a 30°C , com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar). O processo opcionalmente compreende uma etapa de secagem da formulação na temperatura de prateleira a -20°C após a etapa (ii), com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar).

Em uma modalidade preferida, a presente invenção proporciona um processo para preparar a formulação liofilizada da invenção compreendendo as etapas de: (i) congelamento da formulação antes da liofilização por redução da temperatura de prateleira abaixo de -40°C , preferivelmente até -50°C ; (ii) secagem primária da formulação na temperatura de prateleira a -35°C , preferivelmente por 25 horas; elevação da temperatura de prateleira e secagem da formulação na temperatura de prateleira a -20°C , preferivelmente por 10 horas, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar); preferivelmente a $0,045 \times 10^5$ mPa (0,045 mbar); (iii) secagem secundária da dita formulação na temperatura de prateleira a 20°C , com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar). preferivelmente a $0,045 \times 10^5$ mPa (0,045 mbar).

Em uma modalidade preferida, o processo da invenção compre-

ende uma etapa de anelamento adicional, preferivelmente a -10 até -20°C, tipicamente por duas a cinco horas, após o congelamento da formulação por um dos processos de congelamento como descritos na invenção. Tal etapa de anelamento é preferivelmente usada quando a composição de estabilizador da invenção compreender pelo menos um agente de massa, tal como o manitol ou a glicina. Em uma outra modalidade preferida, a presente invenção proporciona um processo para a preparação da formulação liofilizada da invenção, compreendendo as etapas de: (i) congelamento da formulação antes da liofilização por redução da temperatura de prateleira abaixo de -40°C, preferivelmente até -50°C, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar), preferivelmente a $0,045 \times 10^5$ mPa (0,045 mbar); (ii) opcionalmente anelamento a -15°C; (iii) secagem primária da formulação na temperatura de prateleira a -15°C, preferivelmente por 20 horas; (iv) secagem secundária da formulação na temperatura de prateleira a 40°C, com a pressão da câmara abaixo de $0,2 \times 10^5$ mPa (0,2 mbar), preferivelmente a $0,007 \times 10^5$ mPa (0,007 mbar).

Exemplos

Exemplo 1

Materiais e métodos

"NicQ β " - O termo "NicQ β ", conforme usado neste documento, deve referir-se a pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo (a) uma partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β ; e (b) pelo menos uma molécula de nicotina, onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, e onde A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , e onde a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina. O NicQ β foi produzido conforme descrito no EXEMPLO 1 da US 6.932.971. A substância de fármaco de NicQ β foi descongelada na temperatura ambiente.

Protocolos da dessecação por congelamento

Tabela 1: Processo de dessecação por congelamento I.

Etapa	Tempo [h]	Temperatura [°C]	Pressão [mPa (mbar)]
Carga	0:00:00	20	1013 x 10 ⁵ (1013)
Congelamento	1:10:00	-50	1013 x 10 ⁵ (1013)
	3:00:00	-50	1013 x 10 ⁵ (1013)
Secagem primária	0:01:00	-50	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	0:15:00	-35	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	20:00:00	-35	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
Secagem secundária	2:30:00	-20	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	10:00:00	-20	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	1:20:00	20	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	10:00:00	20	0,045 x 10 ⁵ (0,045)

Tabela 2: Processo de dessecação por congelamento II.

Etapa	Tempo [h]	Temperatura [°C]	Pressão [mPa (mbar)]
Carga	0:00:00	20	1013 x 10 ⁵ (1013)
Congelamento	1:10:00	-50	1013 x 10 ⁵ (1013)
	3:00:00	-50	1013 x 10 ⁵ (1013)
Secagem primária	0:01:00	-50	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	4:00:00	-15	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
	20:00:00	-15	0,045 x 10 ⁵ (0,045)
Secagem secundária	0:01:00	-15	0,007 x 10 ⁵ (0,007)
	6:00:00	40	0,007 x 10 ⁵ (0,007)
	10:00:00	40	0,007 x 10 ⁵ (0,007)

Reconstituição dos liofilizados

- 5 Conforme conhecido para a pessoa versada, para algumas das análises descritas abaixo, os liofilizados necessitam ser colocados em solução aquosa. Assim, os liofilizados foram reconstituídos com água filtrada estéril, típica e preferivelmente com água filtrada estéril de um volume para ajustar até o volume total da formulação antes da liofilização. Como exemplo,

se a formulação antes do processo de liofilização consistisse em 0,7 ml por frasco pequeno, então a torta preferivelmente formada, resultante do processo de liofilização, é reconstituída em um volume tal de água estéril de modo tal que a composição final novamente consista em 0,7 ml.

5 *Medições de fracionamento de fluxo de campo de fluxo assimétrico (AF4) para determinar os agregados de VLP*

As medições de AF4 foram conduzidas usando um canal de separação Wyatt com um espaçador de 350 μm , sistema de separação Eclipse2 (Wyatt Technology Corporation), bomba isocrática Agilent 1100 G1310A, removedor de gases Agilent 1100 G1379A, autoamostrador Agilent 1100 G1329A, termostato para o autoamostrador Agilent 1100 G1330B, detector de MWD Agilent 1100 G1365B, detector de RI Agilent 1100 G1362A e detector Wyatt DAWN EOS MALS.

O fluxo de canal era 1,5 ml/min. O fluxo cruzado era 2,0 ml/min por 18 minutos, subseqüentemente reduzido para 0,15 ml/min em 15 minutos e mantido por 5 minutos a 0,15 ml/min. Em uma etapa final, o fluxo cruzado era 0,0 ml/min por 5 minutos.

A concentração de VLP foi determinada a 260 nm com o detector de MWD. O detector Wyatt DAWN EOS MALS foi usado para a determinação do raio hidrodinâmico e do peso molecular da amostra de VLP. Uma quantidade de aproximadamente 20 μg de VLP a partir das formulações líquidas e dos liofilizados reconstituídos (reconstituídos com água, como descrito acima) foi injetada no AF4, respectivamente.

25 *Medições de calorimetria por varredura diferencial (DSC) para determinar a temperatura de transição vítrea*

As medições de DSC foram conduzidas com um Calorímetro de Varredura Diferencial Netzsch 204 Phoenix. Tipicamente, 1 a 25 mg da amostra foram pesados para painéis de alumínio. As painéis foram então firmemente fechadas com uma tampa de alumínio, usando uma prensa de fechamento universal. A panela de referência permaneceu vazia e foi preparada no mesmo modo. As painéis foram colocadas na célula de medição. A célula foi inundada com nitrogênio. As amostras foram medidas em uma taxa

de aquecimento de 10°C/min.

A temperatura de transição vítrea, T_g, dos liofilizados foi determinada por meio de varreduras individuais do DSC.

Análise do teor de água

- 5 As medições do teor de umidade dos liofilizados foram conduzidas com um aparelho de titulação Karl Fischer coulométrico, com um forno de espaço superior (Analytic Jena AG). Os liofilizados foram medidos exatamente no frasco pequeno de vidro 2R em uma temperatura do espaço superior de 80°C. As amostras foram aquecidas na câmara do forno por pelo
- 10 menos 5 minutos.

Medições da difusão de luz dinâmica (DLS) para determinar a homogeneidade da formulação

- As medições de difusão de luz dinâmica foram conduzidas com um aparelho Zetasizer Nano ZS. 0,5 a 1,0 ml da formulação líquida ou dos
- 15 liofilizados reconstituídos (reconstituídos conforme descrito acima) foi pipetado para microcubetas de UV Plastibrand e medido aplicando-se um protocolo padrão LMU Munich validado (SOP protein_m_99%). O índice de polidispersidade PI, a proporção do pico principal de NicQb e o tamanho de pico principal aplicando-se os modelos de conversão de volume e intensidade
- 20 foram calculados.

Medições do bloqueio de luz para determinar a contaminação da partícula e os agregados de VLP

- As medições do bloqueio de luz foram calculadas com um aparelho PAMAS SVSS-C. O sistema foi inundado com uma parte da formulação e subseqüentemente 0,1 - 0,3 ml da formulação líquida ou dos liofilizados reconstituídos foi avaliado quanto à contaminação da partícula. A solução foi removida através da célula de medição e a quantidade de partículas maiores do que 1, 10 e 25 µm, calculada por ml, foi determinada.
- 25

SE-HPLC - integridade do RNA

- 30 As partículas foram homogeneizadas em Reagente TRI (uma combinação de fenol e tiocianato de guanidina em uma solução de monofase para inibir a atividade da RNase), seguido por extração do RNA com o

1-bromo-3-cloropropano (BCP) - Reagente de Separação de Fases. O RNA extraído foi precipitado com isopropanol e o precipitado lavado com etanol O RNA foi então dissolvido em DEPC-H₂O e analisado por HPLC (monitoramento efetuado a A_{260nm}, eluição isocrática). O tempo de retenção do RNA extraído foi determinado em relação a um tRNA padrão, analisado na mesma série.

RP-HPLC - nicotina livre

Os derivados de nicotina solúveis hidroximetil-nicotina (devido à hidrólise da ligação de éster) e succinil-hidroximetil-nicotina (devido à degradação da ligação de amida) foram separados do NicQ β por filtração em filtros de rotação. O fluxo foi analisado por RP-HPLC (A_{260nm} - comprimento de ondas de absorção da nicotina e dos derivados de nicotina). A concentração dos derivados de nicotina foi calculada a partir da regressão de uma curva padrão de nicotina efetuada em paralelo. Os valores da nicotina livre foram dados em porcentagem de nicotina total.

RP-HPLC - nicotina total

A porção de nicotina ligada covalentemente à proteína Q β foi clivada quantitativamente durante a incubação de 3 h, a 40°C e pH > 11, após o que as proteínas foram precipitadas. O produto da hidrólise Hidroximetil-Nicotina permaneceu no sobrenadante e foi quantificado por RP-HPLC (A_{260 nm}) usando uma curva padrão de nicotina, visto que tanto o produto da hidrólise quanto a nicotina compartilham o mesmo cromóforo.

SE-HPLC - integridade da VLP

A SE-HPLC é um método analítico para separar diferentes compostos em uma amostra de acordo com o seu tamanho. Assim, as partículas Q β grandes podem ser separadas das moléculas menores, por exemplo, os monômeros de proteína de cobertura Q β ou os fragmentos de ácidos nucléicos e, portanto, o método foi usado para confirmar a integridade da VLP. O método foi também usado para confirmar a pureza da substância de fármaco. Como um controle, uma VLP padrão foi analisada com a amostra na mesma série. A detecção foi efetuada a 260 nm. As impurezas relacionadas ao produto podem ser agregados de proteínas, produtos da clivagem menores e/ou

ácidos nucleicos. Todas estas impurezas relacionadas ao produto foram detectadas por SE-HPLC, que tinha sido mostrada ser capaz de separar estas impurezas do pico de produto. Para a detecção, é usado um comprimento de ondas de 260 nm.

5 *Medições da turbidez*

O grau de opalescência das soluções de amostras líquidas foi determinado usando um turbidímetro de laboratório (2100 AN, empresa HACH). As medições da turbidez foram efetuadas por turbidimetria da razão, a qual determina a razão de luz transmitida e luz difundida pelas partículas na solução de amostra. O instrumento foi calibrado usando suspensões padrão de turbidez da formazina em células de amostras definidas. Para medir os volumes das amostras de 1-5 ml em tubos de teste menores, uma curva de calibração definida pelo usuário foi estabelecida em uma faixa de 0-200 NTU. 1 ml de amostra foi medido em tubos de teste de vidro descartáveis aos quais tinha sido aplicado o óleo de silício para reduzir os efeitos de difusão causados pelo vidro.

Medições de Transmissão de VIS

As medições de transmissão foram conduzidas com um Espectrofotômetro de UV/Visível de feixe duplo UV1 (Thermo Spectronic). 0,5 a 1,0 ml da formulação líquida foi pipetado para micro cubetas de UV Plastibrand. A transmissão a 600 nm foi determinada.

Exemplo 2

Efeito do pH sobre a estabilidade do NicQ β

A estabilidade do NicQ β foi analisada em dez pH's diferentes na faixa de 4,6 a 8,2. O pH do produto em massa foi ajustado usando uma solução de NaOH a 0,1 N ou uma solução de H₃PO₄ a 0,1 N. Todas as amostras foram diluídas até uma concentração de 1 mg/ml de NicQ β usando água. As amostras foram armazenadas na temperatura ambiente até 14 dias. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados - Estudo do pH sobre a Estabilidade do NicQ β

pH	RP-HPLC	SE-HPLC	PI	DLS
	Teor de derivados de nicotina livres [% do total] no dia 7	Pico principal Área de pico rel. no dia 7		Pico principal (determinado usando o modelo de intensidade conversão) [%]
4,6	1,7	98,5	0,26	82,9
5,0	1,5	98,2	0,23	89,8
5,4	1,9	97,8	0,20	93,6
5,8	1,6	97,3	0,21	91,8
6,2	3,1	97,1	0,19	94,3
6,6	3,9	96,6	0,17	94,0
7,0	7,2	96,3	0,14	98,9
7,4	11,1	91,4	0,12	100,0
7,8	22,6	89,1	0,08	100,0
8,2	34,8	84,0	0,10	100,0

A estabilidade química do NicQ β foi investigada usando os métodos de RP-HPLC e SE-HPLC. A instabilidade química do NicQ β resulta na degradação da VLP em monômeros ou multímeros da proteína de cobertura Q β e/ou na dissociação entre a nicotina e a VLP de Q β .

O teor dos derivados de nicotina livres aumentou com os valores de pH crescentes. Entre pH 4,6 e 6,2, somente pequenos aumentos dos derivados de nicotina livres foram detectados. Acima de pH 6,2, a quantidade dos derivados de nicotina livres aumentou rapidamente durante o tempo de armazenagem. Ademais, a integridade da VLP foi influenciada negativamente pelos valores de pH crescentes. Em pH igual ou maior do que 7,4, a integridade do capsídio de Q β diminuiu drasticamente após 7 dias, como medido por SE-HPLC. O teor relativo de NicQ β em pH 7,0, após 7 dias na temperatura ambiente, foi aproximadamente 96%, enquanto que em pH 7,4, aproximadamente 91 %.

A estabilidade física de NicQ β foi investigada por medições de bloqueio da luz, DLS e Transmissão de VIS. Estabilidade física de Nic-Q β : o termo "estabilidade física de Nic-Q β ", conforme usado neste documento, re-

fere-se à agregação das VLPs de Q β . Todos os três métodos analíticos mostraram que o NicQ β tendeu a agregar-se em valores de pH iguais e abaixo de 5,8. A medição de DLS mostrou que a proporção do pico principal diminuiu, enquanto que o pico compreendendo os agregados e os oligômeros de VLP aumentou e o índice de polidispersidade (PI) aumentou em valores de pH iguais e abaixo de 5,8. Os resultados obtidos pelas medições do bloqueio de luz e Transmissão de VIS validaram a verificação que, com um pH decrescente, o NicQ β tendia à agregação.

Exemplo 3

10 Efeito das condições de tensão de congelamento descongelamento sobre a estabilidade do NicQ β

Um total de 36 formulações diferentes de NicQ β foi submetido aos ciclos de congelamento/descongelamento. As amostras foram congeladas a -80°C e descongeladas a 20°C até 25°C. Estes ciclos de congelamento/descongelamento foram repetidos por 5 vezes. As formulações foram analisadas antes e depois dos ciclos de congelamento/descongelamento por medições de DLS e por medições de bloqueio da luz.

Efeito da trealose e da adição de polissorbato 20 - As formulações compreendiam 0,2 mg/ml de NicQ β , 0 ou 10% de trealose, pH = 6,4, NaCl a 30 mM, com ou sem 0,005% de polissorbato 20. Os resultados das medições de DLS obtidos com as formulações contendo trealose sem o polissorbato mostraram uma ligeira diminuição do pico principal e um aumento do PI. Assim, a trealose resultou em um ligeiro aumento no nível de agregação de NicQ β . Entretanto, este efeito pôde ser impedido pela adição de polissorbato 20. Os resultados do bloqueio da luz suportaram as medições de DLS. Um número menor significativo de partículas > 1 μ m foi detectado na formulação contendo polissorbato 20 após o congelamento/descongelamento, em comparação com o número de partículas > 1 μ m nas formulações sem polissorbato.

30 *Efeito da concentração diferente de NaCl e da adição de polissorbato 20* - As formulações compreendiam 0,2 mg/ml de NicQ β , 10% de trealose, pH = 6,4, diversas concentrações de NaCl, com ou sem 0,005% de

polissorbato 20. Os resultados da medição de DLS mostraram que o NaCl teve uma influência sobre o nível de agregação do NicQ β após ter congelado/descongelado. Os PI's das soluções aumentaram com as concentrações crescentes de NaCl após os ciclos de congelamento/descongelamento. Assim, a estabilidade física do NicQ β foi significativamente reduzida com as concentrações crescentes de NaCl. Entretanto, com a adição de polissorbato 20, esta instabilidade física pôde ser compensada para as concentrações de NaCl iguais e abaixo de 90 mM. Estes resultados foram suportados pela medição de bloqueio da luz. Após o congelamento/descongelamento, as formulações sem o polissorbato mostraram um aumento significativo de partículas maiores do que 1 μ m, o que indicou uma quantidade maior de agregados. A adição de polissorbato 20 impediu a agregação, visto que quase nenhuma partícula maior do que 1 μ m foi detectada.

Efeito dos diferentes pH's e da adição de polissorbato 20 - O efeito do pH variando de 5,4 a 7,2 sobre a estabilidade das formulações, na presença ou na ausência de polissorbato 20, foi investigado. As formulações compreendiam 0,2 mg/ml de NicQ β , 10% de trealose, diversos pHs, NaCl 30 mM, com ou sem 0,005% de polissorbato 20. Os resultados suportaram as verificações a partir do estudo do pH sobre a estabilidade descrito no EXEMPLO 2. Já durante a preparação das soluções de formulação, a proporção do pico principal de NicQ β foi diminuindo com o pH decrescente, como determinada por medições de DLS usando o modelo de conversão de volume. Por outro lado, o PI estava aumentando. A adição de polissorbato 20 impediu a agregação do NicQ β nos valores de pH testados de 6,4 e 7,2. Além disso, a adição de polissorbato 20 reduziu a agregação de NicQ β em pH 5,4. Além das medições de DLS, os resultados obtidos pela medição do bloqueio da luz suportaram estas verificações. As observações acima descritas, feitas no curso deste estudo de pH por medições de DLS e bloqueio da luz, estavam consistentes para as concentrações de NaCl de 30, 60, 90 e 150 mM.

Exemplo 4

Influência das composições variadas sobre a estabilidade do NicQ β durante

a dessecação por congelamento

O NicQ β foi descongelado na temperatura ambiente. Diversas formulações (como mostrado na figura. 1) com concentrações variadas de NicQ β , trealose, polissorbato, NaCl e com sistema de tamponamento variado foram produzidas pipetando-se o NicQ β para as soluções de estoque de excipientes. As soluções foram agitadas sobre um agitador magnético IKA por 5 - 10 minutos. As soluções de fármacos finais foram filtradas estéreis (filtro de membrana de 0,22 μ m) e foram então liofilizadas.

Resumidamente, as soluções de estoque foram despejadas em frascos pequenos de vidro 2R estéreis. A partir das formulações F29RL, F48RL e F49RL, 0,7 ml foi despejado por frasco pequeno. A partir das outras formulações, 0,6 ml foi despejado por frasco pequeno. O polidimetilsiloxano e as tampas de liofilização revestidas com ETFE (Etilenotetrafluoretileno) (West Pharmaceutical Services) foram colocados sobre os frascos pequenos. Os frascos pequenos foram transferidos para a câmara de liofilização de uma secadora por congelamento Christ Epsilon 2-12 D (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH), a Temperatura de prateleira foi diminuída a 0,5°C a 1,0°C/min para -40°C e mantida abaixo de -40°C por 3 horas. A pressão da câmara foi então reduzida para 0,045 x 10⁵ mPa (0,045 mbar), a prateleira foi reduzida para -35°C a 1°C/min e mantida por 20 horas. Depois, a temperatura de prateleira foi elevada para -20°C a 0,1°C/min e mantida por 10 horas. Subseqüentemente, a temperatura de prateleira foi elevada para 20°C a 0,5°C/min e mantida por 10 horas. A câmara de liofilização foi então aerada com o nitrogênio seco filtrado para 800 x 10⁵ mPa (800 mbar) e os frascos pequenos foram tampados na câmara de liofilização. Os frascos pequenos foram removidos da câmara e vedados com vedações Flip-Off[®]. Após a dessecação por congelamento, os liofilizados estáveis foram obtidos, uma estrutura de torta suficiente foi dada.

Os resultados são mostrados na figura. 2. Assim, todos os liofilizados a partir das formulações antes da liofilização, com concentrações variadas de Nic-Q β (testado a partir de 0,2 mg/ml até 2,0 mg/ml), trealose (testada a partir de 5% até 10%), polissorbato (testado de 0,005 até 0,01%),

NaCl (a partir de 0 até 60 mM), tiveram um teor de umidade menor do que 1 %. A soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β das formulações acima mencionadas não aumentou mais do que 1% após a dessecação por congelamento, em comparação com a formulação antes da dessecação por congelamento, como analisado por AF4. As medições de DLS mostraram que estas formulações tinham índices de polidispersidade (PI) tipicamente iguais e abaixo de 0,2 e a proporção do pico principal de NicQ β era maior do que 98,5%, respectivamente, como determinada usando o modelo de conversão de volume. As medições analíticas efetuadas resultaram na conclusão que estas formulações acima mencionadas eram capazes de estabilizar o NicQ β na concentração a partir de 0,20 mg/ml até 2 mg/ml.

A F22RL, que não continha o polissorbato 20, teve um valor de índice de polidispersidade (PI) em torno de 0,35. Além disso, a soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β aumentou cerca de 5,5% após a dessecação por congelamento, em comparação com a formulação antes da dessecação por congelamento. Estes resultados mostraram que o tensoativo não-iônico é necessário para a prevenção da agregação de VLP.

A F08RL, a F39RL, a F37RL, a F38RL compreendiam 30 mM, 60 mM, 90 mM e 150 mM de cloreto de sódio, respectivamente. Embora a presença de polissorbato 20 compensasse o efeito do NaCl (em uma concentração igual e abaixo de 60 mM) sobre a estabilidade física do NicQ β (a F08RL e a F39RL não tiveram nenhum aumento substancial das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β após a liofilização), a presença do polissorbato 20 somente compensou parcialmente o efeito do NaCl nas concentrações de NaCl iguais e maiores do que 90 mM, visto que a soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β aumentou 2,8 e 3,5% após a dessecação por congelamento. Além disso, a presença de NaCl igual ou maior do que 90 mM resultou em valores de osmolaridade maiores do que 400 mosm/kg.

Exemplo 5

Teste das composições de manitol/trealose como estabilizadores para o NicQ β durante a dessecação por congelamento

Tabela 4: Formulações

Formu- lação	NicQ β	Polis- sorba- to 20	Tampão e mola- ridade	Mani- tol	Diidrato de trea- lose	pH
	[mg/ml]	[%]	[mM]	[%]	[%]	
F30RL	1,0	0,005	Fosfato de po- tássio 20	4,0	1,0	6,2
F32RL	1,0	0,005	Fosfato de po- tássio 20	5,3	1,3	6,2
F42RL	1,0	0,005	Fosfato de sódio 20	4,4	1,1	6,2
F54RL	1,0	0,005	Fosfato de sódio 20	5,0	0,0	6,2

5 Quatro formulações (F30RL, F32RL, F42RL, F54RL na figura. 1) foram produzidas substancialmente iguais como descrito no EXEMPLO-4. O volume de despejo dos frascos pequenos foi 0,6 ml. As formulações F30RL, F32RL e F42RL foram liofilizadas rapidamente sob as seguintes condições: A temperatura de prateleira foi diminuída a 1,0°C/min para -50°C e mantida em -50°C por 3 horas. A pressão da câmara foi então reduzida para 0,045 x 10⁵ mPa (0,045 mbar), a prateleira foi reduzida para -15°C a 0,15°C/min e mantida por 20 horas. Alternativamente, as formulações F42RL e F54RL foram liofilizadas aplicando-se o mesmo processo de dessecação por congelamento, porém incluindo-se uma etapa de anelamento conduzida a -15°C por 2 horas. Subseqüentemente, a pressão da câmara foi reduzida para 0,007 x 10⁵ mPa (0,007 mPa) e a prateleira foi reduzida para 40°C a 0,15°C/min e mantida por mais 10 horas. A câmara de liofilização foi então aerada com nitrogênio seco filtrado para 800 x 10⁵ mPa (800 mbar) e os frascos pequenos foram tampados na câmara de liofilização. Os frascos pequenos foram removidos da câmara e vedados com as vedações Flip-Off®.

Os resultados foram parcialmente mostrados na figura. 2. Após a liofilização, os liofilizados estáveis foram obtidos e uma estrutura de torta

suficiente foi obtida. O teor de umidade das três formulações liofilizadas estava tipicamente abaixo de 0,3 %. A osmolaridade das formulações estava tipicamente na faixa de 250 a 340 [mosm/kg]. A osmolaridade aumentou com as concentrações crescentes de trealose e manitol.

5 A fração de manitol nas formulações F30RL, F32RL e F42RL produzidas sem a aplicação de uma etapa de anelamento era amorfa ou parcialmente amorfa. A fração de manitol das formulações F42RL e F54RL produzidas por aplicação de uma etapa de anelamento era cristalina após a dessecação por congelamento.

10 As formulações F30RL, F32RL e F42RL não mostraram nenhum aumento claro significativo da soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β após a dessecação por congelamento, como analisado por medições de AF4. As medições de DLS mostraram que as três formulações tinham índices de polidispersidade (PI) abaixo de 0,2 e a pro-
15 porção do pico principal de NicQ β era tipicamente maior do que 99 %, como determinada usando o modelo de conversão de volume. Para a formulação F54RL, um aumento da soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β após a dessecação por congelamento pôde ser determinado via AF4.

20 As medições de bloqueio da luz mostraram que a contaminação de partículas dos liofilizados reconstituídos era tipicamente de 100 partículas > 10 μ m por ml e a quantidade de partículas > 1 μ m estava tipicamente abaixo de 2000 partículas por ml. Estes resultados mostraram que uma mistura de trealose e um agente de massa, tal como o manitol, pode estabilizar o
25 NicQ β durante a dessecação por congelamento.

Exemplo 6

Estudos da estabilidade das formulações de NicQ β dessecadas por congelamento

30 Cinco formulações F42RL, F35RL, F10RL, F16RL e F54RL foram produzidas substancialmente iguais como descrito no EXEMPLO 4 e no EXEMPLO 5. O volume de despejo dos frascos pequenos foi 0,6 ml.

As formulações contendo trealose somente (F35RL, F10RL,

F16RL) foram liofilizadas sob as seguintes condições: A temperatura de prateleira foi diminuída a 1,0°C/min para -50°C e mantida a -50°C por 3 horas. A pressão da câmara foi então reduzida para 0,045 x 10⁵ mPa (0,045 mbar), a prateleira foi reduzida para -35°C a 1°C/min e mantida por 25 horas. Subseqüentemente, a temperatura de prateleira foi elevada para -20°C a 0,1°C/min e mantida por 10 horas. Subseqüentemente, a temperatura de prateleira foi elevada para 20°C a 0,5°C/min e mantida por 10 horas.

A formulação contendo tanto a trealose quanto o manitol (F42RL) foi liofilizada sob as seguintes condições: A temperatura de prateleira foi diminuída a 1,0°C/min para -50°C e mantida a -50°C por 3 horas. A pressão da câmara foi então reduzida para 0,045 x 10⁵ mPa (0,045 mbar), a prateleira foi reduzida para -15°C a 0,15°C/min e mantida por 20 horas. Subseqüentemente, a pressão da câmara foi reduzida para 0,007 x 10⁵ mPa (0,007 mbar) e a prateleira foi reduzida para 40°C a 0,15°C/min e mantida por mais 10 horas.

A formulação contendo somente o manitol (F54RL) foi liofilizada sob as seguintes condições: A temperatura de prateleira foi diminuída a 1,0°C/min para -50°C e mantida a -50°C por 2 horas. Uma etapa de anelamento a -15°C foi aplicada por 2 horas. A temperatura de prateleira foi diminuída para -50°C e mantida a -50°C por 2 horas. A pressão da câmara foi então reduzida para 0,045 x 10⁵ mPa (0,045 mbar), a prateleira foi reduzida para -15°C a 0,15°C/min e mantida por 20 horas. Subseqüentemente, a pressão da câmara foi reduzida para 0,007 x 10⁵ mPa (0,007 mbar) e a prateleira foi reduzida para 40°C a 0,15°C/min e mantida por mais 10 horas.

Após a liofilização, os liofilizados estáveis foram obtidos com todas as formulações dessecadas por liofilização e uma estrutura de torta suficiente foi obtida.

As amostras foram armazenadas a 2 a 8°C, 25°C e 40°C até 25 semanas. Os resultados analíticos foram parcialmente mostrados na figura. 3. A estrutura de torta dos liofilizados de todas as formulações à base de trealose ou trealose/manitol era estável durante a armazenagem, mesmo em temperaturas aceleradas. Isto foi observado para todas as condições de ar-

mazenagem e pontos de tempo. A temperatura de transição vítrea dos liofilizados sem o manitol estava tipicamente na faixa de 60°C a 110°C e não foi alterada significativamente durante a armazenagem. A osmolaridade das formulações estava na faixa de 300 a 350 [mosm/kg].

5 O teor de umidade inicial das formulações liofilizadas estava abaixo de 1,0 %. O teor de umidade dos liofilizados armazenados a 2-8°C e 25°C foi estável por toda a armazenagem, por 25 semanas, com um aumento de teor de água de menos do que 0,5%. Os liofilizados armazenados a 40°C resultaram em teores de umidade ligeiramente aumentados; o teor de
10 água após a armazenagem estava tipicamente abaixo de 1,7%, comparado a aproximadamente 1% antes da armazenagem.

A soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β não aumentou nas formulações à base de trealose ou trealose/manitol após a dessecação por congelamento, como analisada por medições de AF4. Após a armazenagem, observou-se um ligeiro aumento de
15 menos do que 3 % em comparação com as formulações antes da liofilização, como analisado por AF4. A formulação à base de manitol mostrou um claro aumento da soma das quantidades de oligômeros de NicQ β e agregados de NicQ β .

20 As medições de bloqueio da luz mostraram que a contaminação de partículas dos liofilizados reconstituídos após a armazenagem estava tipicamente abaixo de 500 partículas > 10 μ m por ml por todas as formulações, condições de armazenagem e pontos de tempo.

As medições de DLS mostraram que os liofilizados reconstituídos após armazenagem a partir das quatro formulações à base de trealose ou trealose/manitol tinham índices de polidispersidade (PI) tipicamente abaixo de 0,2 e a proporção do pico principal de NicQ β era tipicamente maior do que 98,5 %, respectivamente, como determinada usando o modelo de conversão de volume. Isto foi observado para todas as formulações, condições
25 de armazenagem e pontos de tempo. A formulação F54RL mostrou um aumento do índice de polidispersidade até 0,24 na armazenagem por 6 semanas, a 40°C.
30

As medições de IEF, SE-HPLC (integridade do RNA), RP-HPLC (nicotina total), Espectrometria (teor de RNA), turbidez e LDS-Page não mostraram nenhuma alteração significativa de todas as formulações à base de trealose e trealose/manitol para todas as condições de armazenagem e pontos de tempo. As partículas similares a vírus de Q β produzidas de modo recombinante tipicamente contêm moléculas de RNA hospedeiras, as quais estão normalmente no espaço interno das partículas similares a vírus.

O teor dos derivados de nicotina livres estava, para todas as formulações à base de trealose e trealose/manitol, todas as condições de armazenagem e pontos de tempo, tipicamente abaixo de 1,5% da nicotina acoplada total, como determinado com medições de RP-HPLC. A quantidade de derivados de nicotina livres foi aumentada até 4,2 % na formulação F54RL na armazenagem a 40°C por 6 semanas.

As medições de SE-HPLC (integridade da VLP) mostraram que o teor relativo de NicQ β era maior do que 97 % por todas as formulações à base de trealose e trealose/manitol, pontos de tempo e condições de armazenagem. O teor relativo de NicQ β foi reduzido para 93 % na formulação F54RL, após a armazenagem a 40°C por 6 semanas.

As medições analíticas efetuadas resultaram na conclusão que todas as formulações à base de trealose e trealose/manitol são capazes de estabilizar o NicQ β durante a liofilização e após a armazenagem, mesmo em temperaturas aceleradas (40°C).

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação liofilizada compreendendo:

(i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo:

5 (a) uma partícula similar a vírus; e

(b) pelo menos uma molécula de nicotina,

onde a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação compreende uma funcionalidade de éster; e

10 (ii) uma composição de estabilizador compreendendo:

(c) pelo menos um dissacarídeo não-redutor, onde a concentração do dito dissacarídeo não-redutor é de 0,5% a 15% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização;

15 (d) pelo menos um tensoativo não-iônico, onde a concentração do dito tensoativo não-iônico é de 0,0005% a 0,1% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização;

e onde a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 5,4 a 6,6 antes da liofilização.

20 2. Formulação liofilizada de acordo com a reivindicação 1, em que o dito dissacarídeo não-redutor é a sacarose ou a trealose.

3. Formulação liofilizada de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde o dito dissacarídeo não-redutor é a trealose.

25 4. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração do dito pelo menos um dissacarídeo não-redutor é de 3% a 12% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização, e em que preferivelmente a concentração do dito pelo menos um dissacarídeo não-redutor é 10% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização.

30 5. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a dita composição de estabilizador adicionalmente compreende um agente de massa.

6. Formulação liofilizada de acordo com a reivindicação 5, em

que a concentração total do dito dissacarídeo não-redutor e do dito agente de massa é de 0,5% a 15% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização, com a condição que a concentração do dito dissacarídeo não-redutor seja pelo menos 0,5% (p/v), em termos da concentração na
5 formulação antes da liofilização.

7. Formulação liofilizada de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o dito agente de massa é o manitol.

8. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração do dito tensoativo não-
10 iônico é de 0,0025% a 0,01% (p/v), preferivelmente 0,005% (p/v), em termos da concentração na formulação antes da liofilização.

9. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito tensoativo não-iônico é o polissorbato 20.

15 10. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a dita partícula similar a vírus é uma partícula similar a vírus de um bacteriófago de RNA, e onde preferivelmente a dita partícula similar a vírus é uma partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β .

20 11. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, em que A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus.

25 12. Formulação liofilizada de acordo com a reivindicação 11, em que a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina.

30 13. Formulação liofilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a dita composição de estabilizador adicionalmente compreendendo um agente de tamponamento selecionado a partir de fosfato de sódio, fosfato de potássio e Histidina/Histidina HCl, e em que preferivelmente a dita composição de estabilizador adicionalmente compreendendo um agente de tamponamento que é a Histidina/Histidina HCl.

14. Formulação liofilizada compreendendo:

(i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo:

(a) uma partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β ; e

5 (b) pelo menos uma molécula de nicotina,

em que a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, onde a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, e em que A representa a dita molécula de nicotina e onde B representa a dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , e em que a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina; e

(ii) uma composição de estabilizador compreendendo:

15 (c) um dissacarídeo não-redutor, em que o dito dissacarídeo não-redutor é a trealose, e em que a concentração de trealose é 10% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização;

20 (d) um tensoativo não-iônico, em que o dito tensoativo não-iônico é o polissorbato 20, e em que a concentração do polissorbato 20 é 0,005% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização; e em que a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 6,2 antes da liofilização.

15. Formulação liofilizada compreendendo:

(i) pelo menos um conjugado de nicotina-partícula similar a vírus compreendendo:

25 (a) uma partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β ; e

(b) pelo menos uma molécula de nicotina,

em que a dita pelo menos uma molécula de nicotina está covalentemente ligada à dita partícula similar a vírus por uma seqüência de ligação, em que a dita seqüência de ligação consiste em A-CH₂OCO(CH₂)₂CO-B, e em que A representa a dita molécula de nicotina e em que B representa a dita partícula similar a vírus de bacteriófago de RNA Q β , e onde a dita seqüência de ligação está covalentemente ligada à posição 3' da dita molécula de nicotina; e

30

(ii) uma composição de estabilizador compreendendo:

(c) um dissacarídeo não-redutor, em que o dito dissacarídeo não-redutor é a trealose, e onde a concentração de trealose é 10% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização;

5 (d) um tensoativo não-iônico, em que o dito tensoativo não-iônico é o polissorbato 20, e em que a concentração do polissorbato 20 é 0,005% (p/v) em termos da concentração na formulação antes da liofilização;

(e) um agente de tamponamento, em que o dito agente de tamponamento é a Histidina/Histidina HCl, e em que a concentração da dita Histidina/Histidina HCl é 20 mM;

10 e em que a dita composição de estabilizador tem um valor de pH de 6,2 antes da liofilização.

15 16. A formulação liofilizada de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a dita formulação liofilizada é estável na temperatura ambiente por pelo menos 15 semanas, preferivelmente por pelo menos 25 semanas.

FIG. 1: Formulações

Formulações	CYT002- NicQβ [mg/ml]	pH	Polissorbato 20 [%]	Fosfato de sódio [mM]	Fosfato de potássio [mM]	Histidina Histidina HCl	Succinato de sódio [mM]	Diidrato de trealose [%]	Manitol [%]	Cloreto de sódio [mM]
F29RL	0.2	6.2	0.005	20	0	0	0	10	0	0
F49RL	0.6	6.2	0.005	20	0	0	0	10	0	0
F10RL	1.0	6.2	0.005	20	0	0	0	10	0	0
F 48RL	2.0	6.2	0.005	20	0	0	0	10	0	0
F16RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	10	0	0
F08RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	10	0	30
F39RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	10	0	60
F37RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	10	0	90
F38RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	10	0	150
F40RL	1.0	6.2	0.005	20	0	0	0	5	0	0
F41RL	1.0	6.2	0.005	20	0	0	0	7.5	0	0
F01RL	0.2	6.2	0.005	10	0	0	0	10	0	30
F22RL	0.2	6.2	0.0	10	0	0	0	10	0	30
F19RL	1.0	6.2	0.01	0	20	0	0	10	0	0
F34RL	1.0	6.2	0.005	0	0	20	0	10	0	0
F30RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	1.0	4.0	0
F32RL	1.0	6.2	0.005	0	20	0	0	1.3	5.3	0
F42RL	1.0	6.2	0.005	20	0	0	0	1.1	4.4	0
F35RL	1.0	5.8	0.005	20	0	0	0	10	0	0
F15RL	1.0	6.2	0.005	0	0	0	20	10	0	0
F54RL	1.0	6.2	0.005	20	0	0	0	0	5.0	0

FIG. 2: Resultados

Formulação	Teor de água		Osmolaridade [mosm/kg]	Quantidade aumentada da soma de oligômeros e agregados após a liofilização (AF4)		Difusão de Luz Dinâmica (DLS)*	
	[%]			[%]		PI	Pico principal [%]
F29RL	0.5	307	0.0		0.19	98.6	
F49RL	0.6	310	0.7		0.15	99.3	
F10RL	0.5	318	0.1		0.16	99.1	
F48RL	0.5	302	1.0		0.13	99.8	
F16RL	0.3	301	0.0		0.20	99.2	
F08RL	0.6	331	0.3		0.20	99.3	
F39RL	0.7	369	0.0		0.15	99.1	
F37RL	0.9	417	2.8		0.16	99.8	
F38RL	1.2	483	3.5		0.18	99.1	
F40RL	0.4	169	0.0		0.18	99.6	
F41RL	0.4	230	0.0		0.19	99.5	
F01RL	0.7	n/a	0.0		0.13	100.0	
F22RL	0.8	n/a	5.5		0.35	98.5	
F19RL	0.2	295	0.0		0.19	99.3	
F34RL	0.4	281	0.0		0.18	99.6	
F30RL	0.1	258	0.0		0.18	99.6	
F32RL	0.1	327	0.0		0.19	99.5	
F42RL [#]	0.2	320	0.4		0.15	99.0	
F42RL ^o	0.2	328	1.1		0.11	99.9	
F35RL	0.5	314	0.0		0.16	96.0	
F15RL	0.7	n.a	3.0		0.12	99.9	
F54RL	0.3	336	6.4		0.16	99.6	

* conforme determinada usando o modelo
de conversão de volume

Produzida sem a etapa
de anelamento

o Produzida com a etapa de anelamento

FIG. 3 Teste da estabilidade

Formulação	Temperatura de armazenagem	Teor de água [%]			Quantidade aumentada da soma de oligômeros e agregados como determinada por AF4						DLS						Teor de derivados de nicotina livres [% do total]			
		Teor de água [%]			PI			Pico principal*[%]			Teor de derivados de nicotina livres [% do total]									
		6 semanas	15 semanas	25 semanas	6 semanas	15 semanas	25 semanas	6 semanas	15 semanas	25 semanas	0 semanas	6 semanas	15 semanas	25 semanas						
F42RL#	2-8°C	0.1	0.1	n/d	1.4	1.8	n/d	0.145	0.148	n/d	99.2	99.5	n/d	0	0	0	n/d			
	25°C	0.2	0.3	n/d	0.8	2.1	n/d	0.147	0.149	n/d	99.8	99.3	n/d	0	0	0.5	n/d			
	40°C	0.5	0.9	n/d	1.3	1.1	n/d	0.143	0.146	n/d	99.2	99.6	n/d	0	0.6	1.4	n/d			
F42RL°	2-8°C	0.5	n/a	n/d	3.9	n/d	n/d	0.116	n/d	n/d	99.9	n/d	n/d	0.8	1.0	n/d	n/d			
	25°C	0.7	n/a	n/d	3.6	n/d	n/d	0.120	n/d	n/d	99.5	n/d	n/d	0	1.1	n/d	n/d			
	40°C	0.8	n/a	n/d	4.1	n/d	n/d	0.128	n/d	n/d	99.5	n/d	n/d	0	1.7	n/d	n/d			
F10RL	2-8°C	0.6	0.5	0.7	1.1	2.1	3.0	0.155	0.153	0.155	99.0	98.6	98.6	0	0	0	0.1			
	25°C	0.6	0.7	0.8	1.3	1.1	2.8	0.155	0.153	0.164	98.9	98.9	98.9	0	0	0.4	0.5			
	40°C	0.9	1.2	1.6	1.6	1.6	2.1	0.153	0.155	0.168	99.4	99.3	98.8	0	0.7	1.1	1.1			
F35RL	2-8°C	0.6	0.5	0.5	1.5	1.5	3.0	0.162	0.162	0.174	98.7	99.5	99.6	0	0	0	0			
	25°C	0.6	0.6	0.7	1.4	1.7	1.9	0.161	0.168	0.163	99.1	98.7	99.4	0	0	0.4	0.4			
	40°C	0.8	1.2	1.4	1.6	2.5	2.4	0.161	0.157	0.186	99.5	99.5	99.3	0	0.6	0.9	1.0			
F16RL	2-8°C	0.5	0.4	n/d	0.4	1.1	n/d	0.149	0.146	n/d	99.4	99.1	n/d	0	0	0	n/d			
	25°C	0.6	0.7	n/d	0.1	0.9	n/d	0.173	0.149	n/d	99.4	98.8	n/d	0	0	0.5	n/d			
	40°C	0.8	1.1	n/d	0.3	0.9	n/d	0.144	0.148	n/d	99.4	99.1	n/d	0	0.7	1.1	n/d			
F54RL	2-8°C	0.5	n/d	n/d	6.7	n/d	n/d	0.177	n/d	n/d	99.7	n/a	n/d	0.8	0.8	n/d	n/d			
	25°C	0.6	n/d	n/d	14.4	n/d	n/d	0.179	n/d	n/d	100	n/a	n/d	0.8	1.1	n/d	n/d			
	40°C	0.8	n/d	n/d	28.0	n/d	n/d	0.239	n/d	n/d	100	n/a	n/d	4.2	n/d	n/d	n/d			

Os resultados das cinco formulações no dia 0 foram mostrados na Figura 2.

* conforme determinado usando o modelo de conversão de volume

produzida sem a etapa de anelamento

° produzida com a etapa de anelamento

RESUMO

Patente de Invenção: "FORMULAÇÃO DE VACINA DE NICOTINA-VEÍCULO".

5 A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, vacina e formulação de fármaco. A invenção proporciona formulações de composições que compreendem um conjugado de nicotina-veículo e um estabilizador, em que o dito estabilizador compreende um dissacarídeo não-redutor e um tensoativo não-iônico. As formulações de composições são estáveis após um longo tempo de armazenagem na temperatura ambiente.