

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 504**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2007 E 07760907 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2010219**

54 Título: **Formulaciones que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas**

30 Prioridad:

**26.04.2006 US 795261 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.01.2016**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**KHANDKE, LAKSHMI;  
CHEN, YING;  
HAN, HANYOUNG;  
SEID, ROBERT CHANCEY, JR.;  
JIN, ZHAOWEI;  
LOOK, JEE LOON;  
MALONE, RONALD y  
YANG, XUDONG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 557 504 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente los campos de inmunología, bacteriología, formulación de vacunas, estabilidad de proteínas y desarrollo de procedimientos. Más particularmente, la invención se refiere a nuevas formulaciones que inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas.

### Antecedentes de la invención

10 En las técnicas biofarmacéuticas se acepta generalmente que la mejora de la estabilidad de una composición inmunogénica (por ejemplo, un inmunógeno de proteína, un conjugado de polisacárido-proteína) es un objetivo necesario y altamente deseable. Por ejemplo, una composición inmunogénica debe parecer recién preparada, elegante y profesional cuando se administra a un paciente. Cualquier cambio en la estabilidad y/o aspecto físico de la composición inmunogénica, tal como cambio de color, opacidad o turbidez puede hacer que un paciente o consumidor pierda la confianza en el producto. Además, debido a que muchas formulaciones inmunogénicas se dispensan en recipientes de múltiples dosis, con el tiempo se debe asegurar la uniformidad del contenido dosis del principio activo (por ejemplo, un conjugado polisacárido-proteína) (por ejemplo, una solución turbia puede conducir a una patrón de dosis no uniforme). Además, la composición inmunogénica debe ser activa durante su vida útil "esperada", en la que cualquier descomposición de la composición inmunogénica a una forma inactiva o de otro modo no deseada (por ejemplo, un agregado) disminuye la concentración total del producto.

20 Varios informes en la bibliografía han sugerido que la estabilidad de una composición inmunogénica en particular (por ejemplo, un inmunógeno de proteína, un conjugado de polisacárido-proteína) es al menos en parte dependiente de la proteína específica o proteína vehículo (Ho y col., 2001; Ho y col., 2002; Bolgiano y col., 2001). Por ejemplo, el análisis de estabilidad de polisacáridos de meningococos C (MenC) y polisacáridos de tipo b de *Haemophilus influenzae* (Hib), conjugados a cualquiera de un toxoide del tétanos (TT) o una proteína vehículo de CRM<sub>197</sub>, reveló diferentes perfiles de estabilidad dependientes de la proteína vehículo (Ho y col., 2002). En otro estudio (Ho y col., 25 2001), se analizaron conjugados de MenC-CRM<sub>197</sub> de dos fabricantes diferentes (Ho y col., 2001), en los que los conjugados de MenCCRM<sub>197</sub> diferían en su química de conjugación y longitud del polisacárido conjugado (teniendo ambos la misma proteína vehículo, CRM<sub>197</sub>). Algunos datos de este estudio indicaban adicionalmente que algunos factores tales como la química de conjugación (por ejemplo, aminación reductora ya sea directamente o a través de un grupo espaciador químico), número de sitios de conjugación, longitud de la cadena de polisacáridos, pH, tampón de almacenamiento, temperatura o temperaturas de almacenamiento y ciclos de congelación/descongelación también influyen en la estabilidad de una composición inmunogénica.

35 Por lo tanto, cuando se desarrolla una formulación para una composición inmunogénica, se deben considerar muchos factores para asegurar un producto seguro, estable, robusto y rentable. Tales consideraciones incluyen, pero no se limitan a, estabilidad química de la composición inmunogénica (por ejemplo, hidrólisis de sacáridos, despolimerización de polisacáridos, proteólisis o fragmentación de proteínas), estabilidad física/térmica de la composición inmunogénica (por ejemplo, agregación, precipitación, adsorción), compatibilidad de la composición inmunogénica con el recipiente/sistema de cierre, interacciones entre composición inmunogénica e ingredientes inactivos (por ejemplo, tampones, sales, excipientes, crioprotectores), el procedimiento de fabricación, la forma de dosificación (por ejemplo, liofilizada, líquida), las condiciones ambientales encontradas durante el transporte, almacenamiento y manipulación (por ejemplo, temperatura, humedad, fuerzas de cizallamiento), y el tiempo de duración entre la fabricación y el uso.

45 En la técnica se ha sugerido, que el aceite de silicona, que induce cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de proteínas, podrían ser responsables de la agregación/precipitación observada en ciertas preparaciones farmacéuticas de proteínas (Jones y col., 2005). Por ejemplo, varios informes en la década de 1980 implicaban a la liberación de aceite de silicona desde jeringas de plástico desechables como el agente causal en la agregación de insulina humana (Chantelau y Berger, 1985; Chantelau y col., 1986; Chantelau, 1989; Bernstein, 1987; Baldwin, 1988; Collier y Dawson, 1985). Chantelau y col. (1986) observaron que después de tres o más retiradas de una preparación de insulina de diez dosis (usando una jeringa desechable siliconada), el vial comenzaría a presentar turbidez debido a la contaminación por aceite de silicón, dando como resultado de este modo agregación y desactivación de la insulina (Chantelau y col., 1986). De forma paradójica, en aceite de silicona es un componente necesario para las jeringas de plástico, ya que sirve para lubricar el émbolo de goma y facilitar la transferencia del émbolo hacia abajo desde el cilindro de la jeringa (es decir, el aceite de silicona mejora the la inyectabilidad de la formulación).

55 Además, el uso de aceite de silicona no se limita a jeringas, ya que se usa como revestimiento de viales de vidrio para reducir al mínimo la adsorción de proteínas, como un lubricante para evitar el conglomerado de los tapones de goma durante los procedimientos de llenado, como un lubricante fundamental para la procesabilidad/maquinabilidad de los cierres de vidrio y elastómeros y como un lubricante para facilitar la penetración de la aguja de tapones de goma de los viales. Además, la siliconización de jeringas, viales de vidrio, tapones de goma y similares, no es un

procedimiento bien controlado ni estandarizado, y como tal, existe un alto grado de variabilidad del contenido de aceite de silicona de un lote a otro

El documento de patente US2004/047882 desvela una emulsión de aceite en agua denominada MF59 que comprende aproximadamente un 5 % de escualeno, aproximadamente un 0,5 % de polisorbato 80 y que  
5 aproximadamente un 0,5 % de trioleato de sorbitán en tampón de citrato acuoso a pH 6,5 para uso como un adyuvante en vacuna, en particular en una vacuna para la gripe. El documento de patente US2004/047882 no hace referencia a la formulación que comprende polisorbato 80 a una concentración final de al menos un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación ni hace referencia a una formulación que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteínas de neumococos.

10 Por lo tanto, existe una continua necesidad en la técnica de formulaciones que aumenten la estabilidad inhiban la precipitación de composiciones inmunogénicas.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere ampliamente a nuevas formulaciones que estabilizan e inhiben la precipitación de  
15 composición inmunogénicas. De forma más específica en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a nuevas formulaciones que inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas contenidas en medios de recipiente. En una realización específica, la invención se refiere a nuevas formulaciones estabilizan las composiciones inmunogénicas frente a interacciones con aceite de silicona, fuerzas de cizallamiento, agitación en el transporte, y similares.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención se refiere a formulaciones que estabilizan un conjugado de  
20 polisacárido-proteína, formulación que comprende (i) una solución salina con pH tamponado, en la que el tampón tiene un pKa de 3,5 a 7,5, (ii) polisorbato 80 a una concentración final de un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína en la que el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococos. En una realización específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína está contenida en un medio de recipiente. En ciertas  
25 realizaciones, el medio de recipiente se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en un vial, un tapón de vial, un cierre de vial, un cierre de vidrio, un cierre de goma, un cierre de plástico, una jeringa, un tapón de jeringa, un émbolo de jeringa, una matraz, un vaso de precipitados, un cilindro graduado, un fermentador, un biorreactor, tubo, una tubería, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y un lápiz desechable. En ciertas realizaciones, el medio de recipiente está siliconado.

30 En ciertas realizaciones, la solución salina con pH tamponado de la formulación s tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras realizaciones, el tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato. En ciertas realizaciones, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0. En una realización en particular, la concentración final del tampón succinato es 5 mM. En otras realizaciones, la sal en la solución salina con pH tamponado comprende cloruro de magnesio, cloruro potásico, cloruro sódico o una combinación de los mismos. En una realización en  
35 particular, la sal en la solución salina con pH tamponado es cloruro sódico.

El tensioactivo de las formulaciones es polisorbato 80 (Tween™80), la concentración final del polisorbato 80 en la  
40 formulación es de al menos un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación. En otras realizaciones, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es un 0,01 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación. Además, en otras realizaciones, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación.

El conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococos. En ciertas realizaciones,  
45 el uno o más polisacáridos de neumococos son un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae*. En ciertas realizaciones, la proteína de la formulación de conjugado de polisacárido-proteína se selecciona entre el grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, un toxoide del tétanos, un toxoide del cólera, un toxoide del Pertussis, un toxoide lábil al calor de *E. coli* (LT), un toxoide de neumolisina, proteína A de superficie de neumococos (PspA), proteína A de adhesina de neumococos (PsaA), una peptidasa C5a de Streptococcus, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

55 En una realización específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 7-valente (7vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo

18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

5 En otra realización específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

En otras realizaciones, la formulación comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de meningococos, una o más proteínas antigénicas de meningococos, o una combinación de los mismos. Además, en otras realizaciones, la formulación comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de estreptococos, una o más proteínas antigénicas de estreptococos, o una combinación de los mismos.

20 En otras determinadas realizaciones, la formulación comprende adicionalmente uno o más adyuvantes. Algunos adyuvantes adecuados a modo de ejemplo se describen a continuación en el presente documento.

Adicionalmente se desvelan formulaciones que inhiben la precipitación inducida por silicona de un conjugado de polisacárido-proteína contenido en un medio de recipiente siliconado, formulación que comprende (i) una solución salina con pH tamponado, en la que el tampón tiene un pKa de 3,5 a 7,5, (ii) una sal de aluminio y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína. En ciertas realizaciones, el medio de recipiente siliconado se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en un vial, un tapón de vial, un cierre de vial, un cierre de vidrio, un cierre de goma, un cierre de plástico, una jeringa, un tapón de jeringa, un émbolo de jeringa, una matraz, un vaso de precipitados, un cilindro graduado, un fermentador, un biorreactor, tubo, una tubería, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y un lápiz desechable.

30 En ciertas realizaciones, la solución salina con pH tamponado en las formulaciones tiene un pH de 5,5 a 7,5. En otras realizaciones, el tampón en las formulaciones es fosfato, succinato, histidina o citrato. Además, en otras realizaciones, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0. En una realización en particular, la concentración final del tampón succinato es 5 mM. En otras realizaciones más, la sal en la solución salina con pH tamponado comprende cloruro de magnesio, cloruro potásico, cloruro sódico o una combinación de los mismos. En una realización en particular, la sal en la solución salina con pH tamponado es cloruro sódico.

En otras realizaciones, la sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio. En una realización específica, la sal de aluminio es fosfato de aluminio.

40 En otras determinadas realizaciones, la formulación comprende adicionalmente polisorbato 80 (Tween™80). En una realización específica, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es de al menos un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación.

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

50 En otras determinadas realizaciones, la proteína de la formulación de conjugado de polisacárido-proteína se selecciona entre el grupo que consiste en CRM<sub>197</sub>, un toxoide del tétanos, un toxoide del cólera, un toxoide del Pertussis, un toxoide lábil al calor de *E. coli* (LT), un toxoide de neumolisina, proteína A de superficie de neumococos (PspA), proteína A de adhesina de neumococos (PsaA), una peptidasa C5a de *Streptococcus*, proteína D de *Haemophilus influenzae*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

En una realización en particular, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 7-valente (7vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un

5 polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

10 En otra realización específica, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

15 Además, en otras realizaciones, la formulación comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de meningococos, una o más proteínas antigénicas de meningococos, o una combinación de los mismos.

20 En otra realización, la formulación comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de estreptococos, una o más proteínas antigénicas de estreptococos, o una combinación de los mismos.

En otras determinadas realizaciones, la formulación comprende adicionalmente uno o más adyuvantes. Algunos adyuvantes adecuados a modo de ejemplo se describen a continuación en el presente documento.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, de las realizaciones de la misma, y de las reivindicaciones.

### **Breve descripción de las figuras**

30 La Figura 1 muestra la estabilidad de formulaciones de C5a peptidasa de *Streptococcus* (SCP) (cargada en jeringas) antes y después de dos días de agitación suave (60 cpm) en un agitador orbital horizontal. Los datos presentados en la FIG. 1A es la estabilidad de dos días de la SCP formulada sin nada de Tween™80 (es decir, un 0 %), mientras que los datos en la FIG. 1B son la estabilidad de dos días de la SCP formulada con un 0,025 % de Tween™80. Los tampones usados en las formulaciones mostrados en la FIG. 1A y 1B son solución salina tamponada con succinato (SBS), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

35 La Figura 2 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml) y cargado en una jeringa Hypak de BD, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8 °C.

La Figura 3 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml) y cargado en una jeringa no siliconada, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8 °C.

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

La Figura 5 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml) y cargado en una jeringa TopPac de Schott, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8 °C.

45 La Figura 6 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con (FIG. 6A) y sin (FIG. 6B) AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml) y cargado en una jeringa BD al horno, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8 °C.

50 La Figura 7 muestra la pérdida de antigenicidad total del 13vPnC formulado con (FIG. 7A) y sin (FIG. 7B) AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml) y cargado en una jeringa BänderGlas PS2, después de dos horas, ocho horas y veinticuatro horas de agitación a 500 rpm y 2-8 °C.

### **Descripción detallada de la invención**

55 La presente invención se dirige a una necesidad continua en la técnica para mejorar la estabilidad de composiciones inmunogénicas tales como conjugados de polisacárido-proteína e inmunógenos de proteína. Por lo tanto, la presente invención se refiere ampliamente a nuevas formulaciones de tensioactivo y/o nuevas formulaciones de sal de aluminio que estabilizan e inhiben la precipitación de composiciones inmunogénicas. Más particularmente, la invención que se describe en lo sucesivo en el presente documento, se dirige a una necesidad en la técnica de formulaciones que estabilicen e inhiban la formación de partículas (por ejemplo, agregación, precipitación) de composiciones inmunogénicas que se procesan, desarrollan, formulan, fabrican y/o almacenan en medios de

recipiente tales como fermentadores, biorreactores, viales, matraces, bolsas, jeringas, tapones de goma, tubo y similares.

5 Como se ha expuesto anteriormente en los Antecedentes de la Invención, diversos factores influyen en la estabilidad de las composiciones inmunogénicas, que incluyen, pero no se limitan a, estabilidad química de la composición inmunogénica, estabilidad física/térmica de la composición inmunogénica, compatibilidad de la composición inmunogénica con el recipiente/sistema de cierre, interacciones entre composición inmunogénica y principios inactivos (por ejemplo, tampones, sales, excipientes, crioprotectores), procedimientos de fabricación, forma de dosificación, condiciones ambientales encontradas durante el transporte, almacenamiento y manipulación (por ejemplo, temperatura, humedad, fuerzas de cizallamiento), y el tiempo de duración entre fabricación y uso.

10 La estabilidad de una composición inmunogénica de la invención se determina fácilmente usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia. Por ejemplo, una composición inmunogénica se somete a ensayo para estabilidad, agregación, inmunogenicidad, formación de partículas, pérdida de proteína (concentración), y similares, con procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, dispersión de luz, densidad óptica, centrifugación con velocidad de sedimentación, centrifugación con equilibrio de sedimentación, 15 difracción de luz (DLS), ensayo de Lowry, ensayo de ácido bicinconínico (BCA), unión a anticuerpos, y similares.

Como se establece con detalle en el presente documento, la presente invención se refiere a los resultados inesperados y sorprendentes de que la formulación de una composición inmunogénica con un tensioactivo tal como Tween™80 aumenta de forma significativa la estabilidad e inhibe la precipitación de una composición inmunogénica. Por ejemplo, en la presente invención se observó (por ejemplo, véase el Ejemplo 2), que un conjugado de 20 neumococos trece-valente (13vPnC), formulado en solución salina tamponada y cargado en una jeringa de un solo uso, comenzaría a precipitar de la solución en diez minutos a 2-8 °C después de agitación suave a través de un agitador orbital horizontal. (El agitador orbital horizontal se usó para simular condiciones habituales de procedimiento, transporte y almacenamiento de una composición inmunogénica de 13vPnC). Sin embargo, se observó de forma sorprendente que el 13vPnC, formulado en solución salina tamponada y un 0,001 % de 25 Tween™80, cargado en una jeringa de una sola dosis y agitado suavemente a 2-8 °C, era estable durante veinticinco días sin signos visibles de precipitación (los datos no se muestran). Por lo tanto, estos datos demostraban que la adición de un tensioactivo (por ejemplo, Tween™80) a una formulación de composición inmunogénica aumenta la estabilidad de la composición inmunogénica.

Un segundo estudio de estabilidad del 13vPnC confirmó adicionalmente que la adición de un tensioactivo a la 30 formulación aumentaba de forma significativa la estabilidad del 13vPnC. Por ejemplo, la estabilidad (es decir, sometida al ensayo midiendo cambios en la antigenicidad de 13vPnC) de una formulación de 13vPnC con un 0,05 % de Tween™80 (Tabla 1) y sin Tween™80 (0,0 %, Tabla 1) se sometió a ensayo durante un periodo de tiempo de dos horas. Como se muestra en la Tabla 1, se produjo una disminución significativa de la antigenicidad de los trece polisacáridos de serotipo (formulados sin Tween™80) dentro del ensayo de dos horas. Sin embargo, de forma 35 bastante drástica, la formulación de 13vPnC que comprendía un 0,05 % de Tween™80 (Tabla 1), demostraba una robusta estabilidad a través del ensayo de antigenicidad de dos horas. También se observó que el 13vPnC formulado en frascos de vidrio de 250 ml con cualquiera de Tween™80 al 0,01 % o Tween™80 al 0,05 % podría soportar fuerzas de cizallamiento significativas inducidas a través de agitación vorticial de las formulaciones durante treinta minutos a 2-8 °C, con poca o ninguna pérdida de antigenicidad (por ejemplo, véase el Ejemplo 2, Tabla 2).

40 En otros experimentos (Ejemplo 3), se demostró que la estabilidad de una composición inmunogénica de C5a peptidasa de estreptococos (SCP) aumentaba en gran medida cuando se formulaba con un tensioactivo tal como Tween™80. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1A, después de dos días de agitación vorticial de un SCP (y 35 µg/ml) formulado con cualquiera de un tampón de succinato 5 mM buffer (pH 6,0), un tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0 y 7,4) o un tampón de Tris 10 mM (pH 7,5), se producía una disminución significativa (por ejemplo, superior 45 a un 90 %) en la concentración de SCP. Sin embargo, como se muestra en la FIG. 1B, la adición de Tween™80 al 0,025 % a las formulaciones de succinato de SCP, fosfato de SCP y SCP Tris, antes de agitación vorticial durante dos días, inhibían completamente la pérdida de SCP que se observaba en la FIG. 1A.

Una composición inmunogénica de 13vPnC de la invención también se fue de fórmula con o sin un adyuvante, tal como fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>). Por lo tanto, en una serie de experimentos separados (Ejemplo 4), algunas 50 composiciones inmunogénicas de 13vPnC se formularon en tampón de 5 mM (pH 5,8), NaCl al 0,85 % y AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg de aluminio/ml), sin la adición de un tensioactivo (por ejemplo, en la formulación no se incluía Tween™80).

En estos experimentos, la composición inmunogénica de 13vPnC (formulada en presencia de AlPO<sub>4</sub>) se cargó en diversos medios de recipiente siliconados y no siliconados (por ejemplo, véase la Tabla 3) y se sometió a 55 condiciones de transporte y manipulación simuladas a través de agitación a 2-8 °C. En estos experimentos se observó (Ejemplo 4), que el medio de recipiente con contenido de silicona más elevado presentaba un grado más elevado de formación de partículas de 13vPnC y un porcentaje más elevado de pérdida de antigenicidad de 13vPnC. Un análisis de FTIR de las partículas indicaba que las partículas consistían en proteína y silicona (los datos no se muestran) y que aproximadamente un 85 % del 13vPnC se une al AlPO<sub>4</sub>, en el que el 15 % restante estaba libre de (no unido al AlPO<sub>4</sub>) 13vPnC en solución.

En otro experimento que compara algunas composiciones inmunogénicas de 13vPnC formuladas con y sin  $\text{AlPO}_4$ , que a continuación se cargaron en jeringas idénticas, se observaba que el 13vPnC formulado sin  $\text{AlPO}_4$  mantenía pérdidas de antigenicidad mayores que 13vPnC con  $\text{AlPO}_4$  en las jeringas sometidas a ensayo (por ejemplo, véase la FIG. 6 y FIG. 7).

5 Por lo tanto, la invención como se establece en el presente documento, se refiere a nuevas formulaciones que estabilizan e inhiben la agregación o precipitación de composiciones inmunogénicas tales como conjugados de polisacárido-proteína (por ejemplo, un 13vPnC) frente a los diversos factores que influyen en la estabilidad de las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, fuerzas de cizallamiento, agitación en el transporte, interacciones del aceite de silicona, adsorción, procedimientos de fabricación, temperatura, humedad, periodo de tiempo entre  
10 fabricación y uso, etc.).

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una formulación que estabiliza un conjugado de polisacárido-proteína, formulación que comprende una solución salina con pH tamponado, en la que el tampón tiene un pKa de 3,5 a 7,5, polisorbato 80 a una concentración final de un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación y uno o más conjugados de polisacárido-proteína en la que el conjugado de polisacárido-proteína  
15 comprende uno o más polisacáridos de neumococos. En otras realizaciones, la formulación de conjugado de polisacárido-proteína está contenida en un medio de recipiente.

Como se define en lo sucesivo en el presente documento, los términos "precipitación", "precipitado" "formación de partículas", "turbidez" y "agregación" se pueden usar indistintamente y pretenden hacer referencia a cualquier interacción física o reacción química que dé como resultado la "agregación" de un conjugado de polisacárido-proteína o un inmunógeno de proteína (o polipéptido). El proceso de agregación (por ejemplo, agregación de  
20 proteínas) se conoce bien (pero no se entiende bien) y se describe en la técnica, y a menudo está influido por numerosas tensiones fisicoquímicas, que incluyen calor, presión, pH, agitación, fuerzas de cizallamiento, congelación-descongelación, deshidratación, metales pesados, compuestos fenólicos, aceite de silicona, agentes desnaturaliza antes y similares.

25 Como se define en lo sucesivo en el presente documento, un "conjugado de polisacárido-proteína", un "conjugado de neumococos", un "conjugado de neumococos 7-valente (7vPnC)", un "conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC)", una "composición inmunogénica de C5a peptidasa de estreptococos (SCP)" y una "composición inmunogénica de proteínas 2086 de *N. meningitidis*" de la invención incluye formulaciones líquidas, formulaciones líquidas congeladas y formulaciones sólidas (por ejemplo, secadas por congelación o liofilizadas).

### 30 A. TENSIOACTIVOS

Como se ha expuesto anteriormente, la invención se refiere a formulaciones que estabilizan e inhiben la agregación de composiciones inmunogénicas frente a los diversos factores que influyen en la estabilidad de las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, fuerzas de cizallamiento, agitación en el transporte, interacciones del aceite de silicona, adsorción, procedimientos de fabricación, temperatura, humedad, periodo de tiempo entre fabricación y uso, etc.). La  
35 invención se refiere a formulaciones que comprenden un tensioactivo.

Un tensioactivo (o un agente de superficie activa) se define generalmente como (a) una molécula o compuesto que comprende un grupo o resto hidrófilo y un grupo o resto lipófilo (hidrófobo) y/o (b) una molécula, sustancia o compuesto que disminuye o reduce la tensión superficial de una solución. Como se define en el presente documento, un "tensioactivo" es cualquier molécula o compuesto que disminuye la tensión superficial de una  
40 formulación de composición inmunogénica.

Un tensioactivo usado en una formulación de la presente divulgación comprende cualquier tensioactivo o cualquier combinación de tensioactivos que establezca e inhiba la agregación de una composición inmunogénica que se describe en el presente documento. Por lo tanto, un tensioactivo incluye, pero no se limita a, polisorbato 20 (Tween™20), polisorbato 40 (Tween™40), polisorbato 60 (Tween™60), polisorbato 65 (Tween™65), polisorbato 80 (Tween™80), polisorbato 85 (Tween™85), Triton™ N-101, Triton™ X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato de polipéptido de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H15), polioxietileno-35-ricinoleato (Cremophor EL™), lecitina de soja, Poloxamer, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de octadecil aminoácido, lisolecitina, bromuro de dimetil-dioctadecilamonio, metoxihexadecilglicerol, polioles de Pluronic, poliaminas (por ejemplo, pirano, dextranosulfato, poli IC, carbopol), péptidos (por ejemplo, péptido y dipéptido de muramilo, dimetilglicina, tuftsina), emulsiones de aceite, geles minerales (por ejemplo, fosfato de aluminio) y complejos de estimulación inmune (ISCOMS).  
50

Una persona experta en la materia puede determinar fácilmente un tensioactivo o combinación de tensioactivos adecuados midiendo la tensión superficial de una formulación de composición inmunogénica en particular en presencia y ausencia del tensioactivo o tensioactivos. Como alternativa, un tensioactivo se evalúa cualitativamente (por ejemplo, inspección visual de formación de partículas) o cuantitativamente (por ejemplo, dispersión de luz, centrifugación con velocidad de sedimentación, densidad óptica, antigenicidad) para su capacidad para reducir, inhibido evitar la agregación de una composición inmunogénica.  
55

**B. MEDIOS DE RECIPIENTE**

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a formulaciones de composiciones inmunogénicas contenidas en un medio de recipiente. Como se define en el presente documento, un "medio de recipiente" de la presente invención incluye cualquier composición de materia que se usa para "contener", "albergar", "mezclar", "combinar", "distribuir", "inyectar", "transferir", "nebulizar", *etc.* una composición inmunogénica durante investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, fabricación, almacenamiento y/o administración. Por ejemplo, un medio de recipiente de la presente invención incluye, pero no se limita a, arterial de cristal de laboratorio en general, Matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, frascos, viales, cierres de vial (por ejemplo, un tapón de goma, un tornillo en la tapa), ampollas, jeringas, tapones de jeringa, émbolos de jeringa, cierres de goma, cierres de plástico, cierres de vidrio, y similares. Un medio de recipiente de la presente invención no se limita al material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, *etc.*) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, termoplástico-elastómeros).

El experto en la materia observará que el medio de recipiente que se ha expuesto anteriormente no es en modo alguno una lista exhaustiva, sino simplemente sirve como guía para el experto con respecto a la variedad de medios de recipiente que se usan para contener, alojar, mezclar, combinar, distribuir, inyectar, transferir, nebulizar, *etc.* un inmunógeno o composición inmunogénica durante investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, fabricación, almacenamiento y/o administración de la composición. Algunos medios de recipiente adicionales contemplados para uso en la presente invención se pueden encontrar en catálogos publicados de vendedores y fabricantes de equipo de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR™ (West Chester, PA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Fisher Scientific International Inc. (Hampton, NH) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Por lo tanto, las nuevas formulaciones de la presente invención son particularmente ventajosas porque estabilizan e inhiben la precipitación de formulaciones inmunogénicas contenidas en un medio de recipiente a través de las diversas etapas de investigación, procesamiento, desarrollo, formulación, fabricación, almacenamiento y/o administración de la composición. Las nuevas formulaciones de la invención no solamente estabilizan algunas composiciones inmunogénicas frente a tensiones físicas/térmicas (por ejemplo, temperatura, humedad, fuerzas de cizallamiento, *etc.*), sino que también aumentan la estabilidad e inhiben la precipitación de algunas composiciones inmunogénicas frente a factores o influencias negativas tales como incompatibilidad de la composición inmunogénica con el recipiente/sistema de cierre (por ejemplo, un medio de recipiente siliconado).

Por lo tanto, las nuevas formulaciones de la presente invención son particularmente útiles para estabilizar el inmunógeno (es decir, un conjugado de polisacárido-proteína, una proteína o antígeno de polipéptido) frente a la precipitación inducida por aceite de silicona y la precipitación que se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos en trámite junto con la presente N° 60/795.098, presentada el 26 de abril de 2006, describe la agregación de algunas composiciones inmunogénicas en presencia de aceite de silicona encontrado en el medio de recipiente tal como jeringas, viales de vidrio, tapones de goma y similares, en las que la adición de un tensoactivo al medio de recipiente evitaba la agregación inducida por el aceite de silicona de estas composiciones inmunogénicas.

**C. ADYUVANTES Y VEHÍCULOS/EXCIPIENTES FARMACÉUTICOS**

En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la invención se formulan adicionalmente con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha mostrado que una serie de citoquinas o linfoquinas tienen actividad de modulación inmune, y por lo tanto se pueden usar como adyuvantes, que incluyen, pero no se limitan a, las interleuquinas 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.078.996 y el Número de Referencia 39900 de la ATCC), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF). Además, otros ayudantes útiles en la presente invención incluyen quimioquinas, que incluyen sin limitación, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , y RANTES.

En ciertas realizaciones, un adyuvante usado para aumentar la respuesta inmune de una formulación de composición inmunogénica incluye, pero no se limita a, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.912.094, que se incorpora por la presente por referencia. también adecuados para su uso como adyuvantes son algunos análogos sintéticos de lípido A o compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.113.918, que se incorpora por la presente por referencia. Uno de estos AGP es el 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente se conocía como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable (RC529-SE).

Además, otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio *etc.*, Anfígeno, Avridina, L121/escualeno, D-lactida-pollactida/glicósido, polioles de Pluronic, dipéptido de muramilo, *Bordetella* destruida, saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.057.540, que se incorpora por la presente por referencia, y partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOMS (complejos de inmunoestimulación), ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.254.339, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG (documento de Patente de Estados Unidos N° 6.207.646, que se incorpora por la presente por referencia), IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en los documentos de Patente Europea N°s 1.296.713 y 1.326.634, una toxina de Pertussis (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), en particular LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente Internacional N°s WO 93/13302 y WO 92/19265, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Como adyuvantes (y proteínas vehículo) también son útiles algunas toxinas del cólera y mutantes de las mismas, que incluyen las que se describen en la Solicitud de Patente Internacional número WO 00/18434 (en la que el ácido glutámico en la posición 29 del aminoácido se sustituye con otro aminoácido (distinto del ácido aspártico), preferentemente una histidina). Algunas toxinas o mutantes de CT similares se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada con número WO 02/098368 (en la que la isoleucina en la posición 16 del aminoácido se sustituye con otro aminoácido, ya sea solo o en combinación con la sustitución de la serina en la posición 68 del aminoácido por otro aminoácido; y/o en la que la valina en la posición 72 del aminoácido se sustituye con otro aminoácido). Otras toxinas de CT se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada con número WO 02/098369 (en la que la arginina en la posición 25 del aminoácido se sustituye con otro aminoácido; y/o un aminoácido se inserta en la posición 49 del aminoácido; y/o dos aminoácidos se insertan en las posiciones 35 y 36 del aminoácido).

En ciertas realizaciones, las formulaciones de composición inmunogénica comprenden un diluyente, excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es agua estéril, agua para inyección, solución salina isotónica estéril o un tampón biológico. Los conjugados de polisacárido-proteína y/o inmunógeno es de proteína se mezclan con tales diluyentes o vehículos de manera convencional. Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros hospedadores vertebrados. El vehículo apropiado es evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran parte de la vía de administración.

Por ejemplo, algunos excipientes que pueden estar presentes en la formulación de la composición inmunogénica son conservantes, estabilizantes químicos y agentes de suspensión o dispersión. Por lo general, algunos estabilizantes, conservantes y similares optimizan para determinar la mejor formulación para su eficacia en el receptor al que se dirigen (por ejemplo, un sujeto humano). Algunos ejemplos de conservantes incluyen clorobutanol, sorbato potásico, ácido sórbico, bióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainillina, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Algunos ejemplos de ingredientes estabilizantes incluyen casaminoácidos, sacarosa, gelatina, rojo fenol, N-Z amina, difosfato monopotásico, lactosa, hidrolizado de lactoalbúmina, y leche seca.

En ciertas realizaciones, una formulación de composición inmunogénica se prepara para administración a sujetos humanos en forma de goma por ejemplo, líquidos, polvos, aerosoles, comprimidos, cápsulas, comprimidos o cápsulas revestidos de forma entérica, o supositorios. Por lo tanto, las formulaciones de composición inmunogénica también pueden incluir, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones como emulsiones en vehículos oleosos u acuosos, pastas, y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención, no se limitan mediante la selección de los vehículos, diluyentes y excipientes fisiológicamente aceptables, convencionales tales como disolventes, tampones, adyuvantes, u otros ingredientes útiles en preparaciones farmacéuticas de los tipos que se han descrito anteriormente. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, a partir de los componentes que se han descrito anteriormente, que tienen una isotonicidad de pH, estabilidad y otras características convencionales apropiadas está dentro de la experiencia en la materia.

#### D. INMUNÓGENOS

La formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende uno o más polisacáridos de neumococos. En otras realizaciones, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende uno o más polisacáridos de estreptococos. Además, en otras realizaciones, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende uno o más polisacáridos de meningococos. En otras realizaciones más, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína de la invención comprende una combinación de uno o más polisacáridos de neumococos, uno o más polipéptidos de neumococos, uno o más polisacáridos de estreptococos, uno o más polipéptidos de estreptococos, uno o más polisacáridos de meningococos, y/o uno o más polipéptidos de meningococos.

Como se define en lo sucesivo en el presente documento, el término "polisacárido" pretende incluir cualquier elemento sacárido antigénico (o unidad antigénica) usada normalmente en las técnicas de vacunas inmunológicas y bacterianas, que incluye, pero no se limita, un "sacárido", un "oligosacárido", un "polisacárido", a "liposacárido", a "lipo-oligosacárido (LOS)", un "lipopolisacárido (LPS)", un "glicosilato", un "glicoconjugado" y similares.

5 En una realización en particular de la invención, el uno o más polisacáridos de neumococos son un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae*.

15 En ciertas realizaciones, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 7-valente (7vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

20 En otras determinadas realizaciones, una formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

Algunos polisacáridos se preparan mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los polisacáridos capsulares que se exponen en la presente invención se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, en las que cada serotipo se cultivan en un medio basado en soja y los polisacáridos individuales se purifican a continuación a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía en columna. De forma análoga, algunos polisacáridos de estreptococos (por ejemplo, uno o más polisacáridos (u oligosacáridos) de un grupo de *Streptococcus* β-hemolítico tal como *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus* del grupo C y *Streptococcus* del grupo G) y sacáridos de meningococos (por ejemplo, un lipo-oligosacárido (LOS) o lipo-polisacárido (LPS) de *N. meningitidis*) se prepara a partir de serotipos o serogrupos clínicamente relevantes, usando técnicas y procedimientos generales conocidos para un experto en la materia. A continuación los polisacáridos purificados se activan químicamente (por ejemplo, mediante aminación reductora) para fabricar los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína vehículo. Una vez activado, cada polisacárido capsular se conjuga por separado con una proteína vehículo (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) para formar un glicoconjugado (o como alternativa, cada polisacárido capsular se conjuga con la misma proteína vehículo) y se formula una formulación de forma de dosificación individual.

La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación a la proteína vehículo (es decir, un conjugado de polisacárido-proteína) se consiguen mediante medios convencionales. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N° 4.673.574 y 4.902.506.

50 Algunas proteínas vehículo son preferentemente proteínas que no son tóxicas y no son reactogénicas y se pueden obtener en una cantidad y pureza suficientes. Las proteínas vehículo deberían ser responsables de algunos procedimientos de conjugación convencionales. En una realización en particular de la presente invención, el CRM<sub>197</sub> se usa como la proteína vehículo.

El CRM<sub>197</sub> (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina de difteria aislada de cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (β197) cultivada en casaminoácidos y medio basado en extracto de levadura. El CRM<sub>197</sub> se purifica a través de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, el CRM<sub>197</sub> se prepara de forma recombinante de acuerdo con el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.614.382. Otros toxoides de difteria también son adecuados para uso como proteínas vehículo.

En otras realizaciones, una proteína vehículo de la invención es una C5a peptidasa de estreptococos (SCP) enzimáticamente inactiva (por ejemplo, una o más de las variantes de SCP que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.951.653, documento de Patente de Estados Unidos N° 6.355.255 y documento de Patente de Estados Unidos N° 6.270.775).

- 5 Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivas tales como toxoide del tétanos, toxoide de Pertussis, toxoide del cólera (por ejemplo, CT E29H, que se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También se pueden usar algunas proteínas de membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína A de superficie de neumococos (PspA), proteína adhesina de neumococos (PsaA), o proteína D de *Haemophilus influenzae*. Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas vehículo.

- 15 Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína vehículo, los conjugados de polisacárido-proteína se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una diversidad de técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna, y filtración en profundidad.

- 20 Después de purificar los glicoconjugados individuales, se forman compuestos con éstos para formular la composición inmunogénica de la presente invención. La formulación de los conjugados de polisacárido-proteína de la presente invención se puede realizar usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los 13 conjugados de neumococos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptables para preparar la composición. Algunos ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

### E. Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos se realizan usando técnicas convencionales, que se conocen bien and y son de rutina para los expertos en la materia, excepto cuando se describa de otro modo con detalle. Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos.

#### Ejemplo 1

#### **LAS FORMULACIONES INMUNOGÉNICAS QUE COMPRENDEN UN 0,001 %-0,05 % DE TWEEN™ 80 ESTABILIZAN Y PREVIENEN LA AGREGACIÓN DEL INMUNÓGENO**

- 30 El conjugado de polisacárido-proteína usado en este ejemplo era un conjugado de polisacárido de neumococos trece-valente (13vPnC) que comprende polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 18C, 19F, 14, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A de *S. pneumoniae*, cada uno de los cuales se conjugaban con CRM<sub>197</sub>. Los polisacáridos capsulares se prepararon mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. En resumen, cada serotipo de polisacárido de neumococos se cultivó en un medio basado en soja, a continuación, los polisacáridos individuales se purificaron mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración, y cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados se activaron químicamente para conjugación y cada polisacárido se conjugó por separado a una proteína vehículo de CRM<sub>197</sub> para formar un glicoconjugado y se formularon en una formulación de dosificación individual.

- 40 La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína de vehículos se consiguieron por medios convencionales (por ejemplo, véanse los documentos de patente de Estados Unidos N° 4.673.574 y 4.902.506). CRM<sub>197</sub> (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de toxina de difteria aislada de cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (β197) cultivada en casaminoácidos y medio basado en extracto de levadura. CRM<sub>197</sub> se purifica a través de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio iónico.

- 45 Los experimentos de antigenicidad que se describen a continuación se realizaron mezclando las muestras de 13vPnC con uno de los trece antisueros (Ab) específicos para cada uno de los serotipos del polisacárido y a continuación detectando los complejos inmunes mediante medidas de dispersión de luz en un sistema Array® 360 (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). Las medidas de dispersión de luz detectada para cada uno de los trece serotipos se compararon a continuación con una curva patrón y se informaron como antigenicidad (µg/ml).

- 50 Las jeringas (BD Hypak SCF™) y los tapones de jeringa (BD Hypak SCF™) se adquirieron en BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Los viales de borosilicato transparente (VWR TraceClean™, 40 ml) con cierres revestidos con Teflon® se adquirieron en VWR™ (West Chester, PA). El Polisorbato 80 (Tween™80) se adquirió en J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc.; Phillipsburg, NJ). La solución salina tamponada era succinato (5 mM) y NaCl (0,85 %) a pH 5,8.

- 55 El 13vPnC se formuló (volumen total de 500 ml) a diferentes concentraciones de tensioactivo (Tween™80; 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % y 0,05 %, en peso/volumen) como sigue a continuación: se añadió solución salina al 0,85 %

- (NaCl 150 mM) a un vaso de precipitados de vidrio Pirex® de un litro, seguido de tampón succinato 50 mM (concentración final 5 mM) y el 13vPnC. La concentración final de cada conjugado de serotipo era de 4,4 µg/ml (excepto para el serotipo 6B, que era de 8,8 µg/ml). A continuación, la formulación de 13vPnC se dividió en cinco viales de vidrio separados (50 ml por vial), en los que se añadió cualquiera de Tween™80 al 0,0 %, al 0,001 %, al 0,005 %, al 0,01 % o al 0,05 % en (p/v) a uno de los cinco viales y cada solución se filtró a través de un filtro Durapore® de 0,22 µm (Millipore; Billerica, MA). Posteriormente, se cargaron 0,65 ml de cada solución en una jeringa de vidrio HYPAK™ SCF™ de BD de 3 ml separada con tapones de color gris w4432 (BD Medical Pharmaceutical Systems; Franklin Lakes, NJ), y las jeringas se colocaron en un agitador orbital horizontal (60 cpm) durante 100 horas de 2 °C a 8 °C.
- 5
- 10 Mediante inspección visual se observó (los datos no se muestran), que el 13vPnC formulado en ausencia de Tween™80 (es decir, un 0,0 %), comenzaría a precipitar de la solución a los diez minutos a 2-8 °C después de agitación suave mediante un agitador orbital horizontal. Por el contrario, el 13vPnC formulado en Tween™80 al 0,001 %, al 0,005 %, al 0,01 % o al 0,05 % y agitados suavemente a 2-8 °C, era estable hasta veinticinco días sin signos visibles de precipitación (los datos no se muestran). Por lo tanto, estos datos demostraban que la adición de un tensioactivo (por ejemplo, Tween™80) a una formulación de composición inmunogénica aumenta la estabilidad de la composición inmunogénica.
- 15
- Un segundo experimento de estabilidad del 13vPnC confirmaba adicionalmente que la adición de tensioactivo a la formulación aumentaba de forma significativa la estabilidad del 13vPnC. En este experimento, el 13vPnC se formuló con y sin Tween™80 al 0,05 %. El 13vPnC formulado sin Tween™80 (es decir, un 0,0 %) se preparó como sigue a continuación: se añadió solución salina al 0,85 % (NaCl 150 mM) a un vaso de precipitados de vidrio Pirex® de un litro, seguido de tampón succinato 50 mM (concentración final 5 mM) y el 13vPnC, hasta un volumen total de 500 ml. la formulación de 13vPnC con Tween™80 al 0,05 % se preparó como sigue a continuación: 0 se añadió solución salina al 0,85 % (NaCl 150 mM) a un vaso de precipitados de vidrio Pirex® de un litro, seguido de tampón succinato 50 mM (concentración final 5 mM), Tween™80 al 0,05 % y el 13vPnC, hasta un volumen total de 500 ml. La concentración final de cada conjugado de serotipo en las formulaciones de 500 ml era de 4,4 µg/ml (excepto para el serotipo 6B, que era de 8,8 µg/ml). Las formulaciones de 500 ml se homogeneizaron mediante un homogeneizador de rotor/estátor a 6.000 rpm (2-8 °C) durante 120 minutos. El procedimiento de homogeneización creó una superficie de contacto de aire-líquido (con burbujas de aire).
- 20
- 25
- La estabilidad de la formulación de 13vPnC con (Tabla 1) y sin (Tabla 1) Tween™80 al 0,05 % se evaluó durante un periodo de tiempo de dos horas como sigue a continuación: Las muestras (20-30 ml) se retiraron a cero, treinta y ciento veinte minutos a partir de las formulaciones de Tween™80 al 0,0 % y al 0,05 %, las muestras se diluyeron a 1:2 en diluyente de proteína (diluyente de proteína Array® 360 (Nº de Cat. 663630); Beckman Coulter Inc.; Fullerton, CA) y la antigenicidad de los trece serotipos del 13vPnC se sometió a ensayo (véase, Tabla 1) en un sistema Array® 360.
- 30
- 35 Como se muestra en la Tabla 1, se produjo una disminución significativa de la antigenicidad de los trece polisacáridos del serotipo (formulados sin Tween™80) dentro del ensayo de dos horas. Sin embargo, de forma bastante significativa, la formulación de 13vPnC que comprende Tween™80 al 0,05 % (Tabla 1), demostró una fuerte estabilidad sin reducción de la antigenicidad durante todo el ensayo de antigenicidad de dos horas.

TABLA 1

ENSAYO DE ESTABILIDAD DE 13PNC FORMULADO CON Y SIN TWEEN™80							
13PnC sin Tween 80			13PnC con Tween 80 al 0,05 %				
Serotipo	Antigenicidad 0 minutos	Antigenicidad 30 minutos	Antigenicidad 120 minutos	Serotipo	Antigenicidad 0 minutos	Antigenicidad 30 min	Antigenicidad 120 min
1	4,8 µg/ml	4,2 µg/ml	2,4 µg/ml	1	5,1 µg/ml	5,0 µg/ml	5,2 µg/ml
3	4,8 µg/ml	4,1 µg/ml	1,7 µg/ml	3	5,0 µg/ml	5,0 µg/ml	5,2 µg/ml
4	5,8 µg/ml	5,0 µg/ml	3,1 µg/ml	4	6,1 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
5	3,4 µg/ml	3,0 µg/ml	2,0 µg/ml	5	3,6 µg/ml	3,6 µg/ml	3,7 µg/ml
6A	4,9 µg/ml	3,8 µg/ml	1,3 µg/ml	6A	5,4 µg/ml	5,4 µg/ml	5,6 µg/ml
6B	10,0 µg/ml	5,6 µg/ml	1,4 µg/ml	6B	10,6 µg/ml	10,6 µg/ml	10,5 µg/ml
7F	4,7 µg/ml	3,4 µg/ml	1,0 µg/ml	7F	5,3 µg/ml	5,2 µg/ml	5,3 µg/ml
9V	5,6 µg/ml	4,7 µg/ml	2,5 µg/ml	9V	6,1 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
14	7,6 µg/ml	6,4 µg/ml	3,0 µg/ml	14	8,2 µg/ml	8,3 µg/ml	8,3 µg/ml
18C	5,6 µg/ml	4,4 µg/ml	1,7 µg/ml	18C	6,2 µg/ml	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml
19A	6,4 µg/ml	4,5 µg/ml	1,9 µg/ml	19A	6,8 µg/ml	6,8 µg/ml	6,8 µg/ml
19F	5,4 µg/ml	2,6 µg/ml	0,0 µg/ml	19F	6,1 µg/ml	6,2 µg/ml	6,0 µg/ml
23F	4,5 µg/ml	2,8 µg/ml	0,9 µg/ml	23F	5,2 µg/ml	5,2 µg/ml	5,2 µg/ml

- La formulación de 13vPnC/Tween™80 se sometió a ensayo adicionalmente para estabilidad frente a fuerzas de cizallamiento elevadas. En este experimento, una composición de 13vPnC de 100 ml (4,4 µg/ml de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 8,8 µg/ml del serotipo 6B, tampón succinato 5 mM, NaCl 150 mM y 0,25 mg/ml de AlPO<sub>4</sub>) se añadieron a tres frascos de vidrio de 250 ml que comprendían Tween™80 ya sea al 0,0 %, 0,01 % o 0,05 %. A continuación, los tres frascos se sometieron a agitación vorticial durante treinta minutos (2-8 °C) en un agitador vorticial (Vortex-Genie® 2; Scientific Industries, Inc.; Bohemia, NY) y se creó una superficie de contacto de aire-líquido en el máximo ajuste de la velocidad. Después de treinta minutos se tomaron muestras de 10-30 ml de cada frasco, se diluyeron a 1:2 en diluyente de proteína Array® 360 y la antigenicidad de los trece serotipos sometidos a ensayo en un sistema Array® 360.
- Como se observa en la Tabla 2 que sigue a continuación, el 13vPnC formulado sin Tween™80 (0,0 %) presentaba como promedio una disminución de la antigenicidad de un 20 % después de agitación vorticial. El 13vPnC formulado con Tween™80 al 0,01 % presentaba una disminución de la antigenicidad que variaba en un 2-10 % (promedio de un 8 %) y el 13vPnC formulado con Tween™80 al 0,05 % presentaba una disminución de la antigenicidad que variaba en un 0-8 % (promedio de un 3 %). Por lo tanto, los datos presentados en la Tabla 2 demuestran que el 13vPnC formulado con cualquiera de Tween™80 al 0,01 % o al 0,05 % estaban significativamente estabilizados frente a fuerzas de cizallamiento, con respecto al 13vPnC formulado en ausencia de Tween™80.

TABLA 2

EFECTO DE ESTABILIZACIÓN DE TWEEN™ 80 FRENTE A FUERZAS DE CIZALLAMIENTO						
Serotipo	Antigenicidad tw80 al 0,0 %	Antigenicidad tw80 al 0,0 % + vórtice	Antigenicidad tw80 al 0,01 %	Antigenicidad tw80 al 0,01 % + vórtice	Antigenicidad tw80 al 0,05 %	Antigenicidad tw80 al 0,05 % + vórtice
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

## Ejemplo 2

20 **LAS FORMULACIONES QUE COMPRENDEN TENSIÓACTIVO ESTABILIZAN Y PREVIENEN LA AGREGACIÓN DE C5A PEPTIDASA DE ESTREPTOCOCOS**

- La C5a peptidasa de estreptococos (SCP) usada en este ejemplo se expresó y se purificó como sigue a continuación. La SCP se expresó de forma recombinante en *E. coli* usando un sistema inducible por arabinosa. A continuación siguieron protocolos de fermentación convencionales para *E. coli* usando medio definido libre de animal y posterior lisis celular. La SCP recombinante se purificó a partir de la fracción soluble del celular mediante saturación hasta un 60 % (aproximadamente 3 M) de sulfato de amonio a la vez que se agitaba durante 12-24 horas. El lisado saturado se centrifugó, el sobrenadante se retuvo y se cargó en una columna de interacción hidrófoba de fenil Sepharose. El material unido se diluyó a continuación con sulfato de amonio 1 M, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, se concentró, y se diafiltró frente a PBS, pH 7,4. La SCP recombinante purificada (rSCP) se diluyó hasta ~10 mg/ml con PBS, pH 7,4 y se pasó a través de un filtro Posidyne para retirar la endotoxina, seguido de una filtración final (0,2 mM) para esterilidad y se almacenó congelado (-25 °C).

La SCP purificada (55 µg/ml) se formuló a continuación con Tween™80 al 0,025 % o sin Tween™80 (0,0 %) en los siguientes tampones: tampón succinato 5 mM a pH 6,0, tampón fosfato 10 mM a pH 7,0, tampón fosfato 10 mM a 7,4 o tampón Tris 10 mM a pH 7,5 y se llenó en jeringas Hypak SCF™ separadas de BD. A continuación, las jeringas se colocaron en un agitador orbital horizontal a 2-8 °C, agitadas a 180 cpm durante dos días y la concentración de la proteína SCP se determinó mediante el ensayo de Lowry modificado.

Como se muestra en la FIG. 1, la estabilidad de SCP aumentaba en gran medida cuando se formulaba con Tween™80. Por ejemplo, después de dos días en el agitador orbital, la SCP formulada sin Tween™80 (FIG. 1A) demostró una disminución significativa (por ejemplo, superior a un 90 %) en la concentración de SCP de cada uno de los tampones sometidos a ensayo. Sin embargo, como se muestra en la FIG. 1B, la adición de Tween™80 al 0,025 % a las formulaciones de tampón de SCP, antes de su colocación en el agitador orbital durante dos días, inhibía completamente la pérdida de SCP que se observa en la FIG. 1A.

La estabilidad en el almacenamiento de la formulación de SCP/Tween™80 (0,025 %) también se sometió a ensayo a 25 °C y 37 °C durante ocho semanas y seis semanas, respectivamente (los datos no se muestran). En resumen, la SCP (200 µg) se formuló ya sea en tampón de succinato o tampón de fosfato como sigue a continuación: tampón de succinato (5 mM, pH 6,0) o tampón fosfato (15 mM, pH 7,4), NaCl al 0,9 % y Tween™80 al 0,025 %. La estabilidad de las formulaciones de SCP/Tween™80 se sometió a ensayo mediante HPLC de exclusión por tamaño, ensayo de proteína total de Lowry modificado la inspección visual para precipitación. En este estudio se observó que las formulaciones de SCP/Tween™80 (en cualquier tampón) eran completamente estables a 25 °C y 37 °C durante todo el estudio de estabilidad (es decir, hasta ocho semanas y seis semanas, respectivamente).

### Ejemplo 3

#### LA INFLUENCIA DEL MEDIO DE ENVASADO SILICONADO EN LA ESTABILIDAD DE 13VPNC

Los experimentos anteriores indicaban (los datos no se muestran) que algunas composiciones inmunogénicas de 13vPnC precipitaban y/o se agregaban cuando se llenaban en jeringas de vidrio de borosilicato de Tipo 1 Hypak Becton Dickinson® (BD) listas para usar (una sola dosis) tratadas con silicona DC 360 de calidad médica Dow Corning® y se tapaban con tapones libres de látex (clorobutilo) West 4432/50 y protección West 7025/65 para la punta EZ (Mezcla Sintética de Isopreno y Bromobutilo; West Pharmaceutical®, Lionville, PA). En estos experimentos, el 13vPnC se formuló en tampón succinato 5 mM que contenía NaCl al 0,85 % y 4,4 µg/ml de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio como un adyuvante. Se observó que, en ausencia de AlPO<sub>4</sub>, las partículas de 13vPnC se podían observar fácilmente, mientras que, en presencia de AlPO<sub>4</sub>, las partículas de 13vPnC disminuían de forma significativa y eran más difíciles de detectar.

En el presente ejemplo, se examinaron una serie de recipientes y componentes de cierre (es decir, medios de recipiente) para identificar que componentes inducían o contribuían a la formación de partículas de 13vPnC. El medio de recipiente sometido a ensayo comprendía jeringas, tapones y viales y se enumeran a continuación en la Tabla 3. Los tapones de BD y West enumerados en la Tabla 3 se siliconaron, usando ya sea el procedimiento de Huber o de Jar. El procedimiento de Huber de siliconado es más controlado y proporcionaba de 30 a 60 µg/cm<sup>2</sup> de silicona en la superficie del tapón, mientras que el procedimiento de Jar de siliconado daba como resultado de 150 a 300 µg/cm<sup>2</sup> de silicona en la superficie del tapón. Basándose en cálculos teóricos, aproximadamente un 15 % del área superficial del tapón se expone al producto en la jeringa, lo que sugiere que para el procedimiento de Huber y Jar se pueden extraer de los tapones entre 4,5 y 9 µg y de 22,5 a 45 µg de silicona, respectivamente.

#### Materiales

La silicona era de Dow Corning® 360 Medical Fluid de 1000 centistokes (Nº de lote 0001846266). El 7vPnC se formuló en tampón succinato 5 mM que contenía NaCl al 0,85 % y 4,4 µg/ml de los serotipos 4, 9, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. El 13vPnC se formuló en tampón succinato 5 mM que contenía NaCl al 0,85 % y 4,4 µg/ml de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. El serotipo 6B de *S. pneumoniae* monovalente se formuló (tampón succinato 5 mM que contenía NaCl al 0,85 %, sin fosfato de aluminio) a una concentración de 61 µg/ml para simular la concentración de sacárido total de las formulaciones de 13vPnC.

#### Procedimientos

El 7vPnC y el 13vPnC se formularon como se ha descrito anteriormente, y se añadieron 35 ml de a una formulación dada a un frasco Nalgene® transparente de 250 ml. En cada frasco Nalgene®, se añadieron los componentes del medio de recipiente enumerados en la Tabla 3. Los frascos Nalgene® se colocaron a continuación en un agitador orbital Labline® y se agitó dando vueltas durante una noche a 50 rpm. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Aspecto Visual. Cada uno de los frascos Nalgene® que contenía los componentes del medio de recipiente se mantuvieron con una luz de fluorescencia en el laboratorio. Una trayectoria de un rayo de luz (efecto Tindal) que pasaba a través de las muestras permitió la detección de las partículas.

5 Ensayo de Proteína. La proteína total y la proteína unida a la aluminio se determinó midiendo la concentración de proteína total en la composición inmunogénica formulada y la proteína asociada con el sedimento de aluminio, respectivamente (una alícuota de la composición inmunogénica se centrifugó y el sedimento se volvió a suspender en solución salina). Los ensayos se realizaron usando el ensayo de proteína de Lowry Modificado por Pierce (N° de catálogo 23240) con albúmina de suero bovino como un patrón.

## RESULTADOS

10 En la primera serie de experimentos, las composiciones inmunogénicas de 13vPnC se formularon sin  $\text{AlPO}_4$  y se expusieron a una serie de medios de recipiente enumerados a continuación en la Tabla 3. A partir de los datos era claramente evidente (Tabla 3), que los componentes del medio de recipiente que se trataban con aceite de silicona inducían la formación de partículas de color blanco. Por el contrario, no se detectaban partículas en presencia de los tapones Daikyo® no siliconados (Daikyo Seiko, Ltd., Japón) y viales de Schott (Schott North America Inc.; Lebanon, PA).

**TABLA 3**

<b>EFFECTO DE DIFERENTES COMPONENTES DE MEDIOS DE RECIPIENTE EN 13VPNC, FORMULADO SIN <math>\text{ALPO}_4</math></b>		
<b>Componentes de Medios de Recipiente</b>	<b>Número de Componentes de Medios de Recipiente Añadidos</b>	<b>Aspecto (Inspección Visual)</b>
Control-13vPnC sin $\text{AlPO}_4$	Ninguno	Sin partículas
Tapones de 4432/50 Grey Si WWD Hypak BSCF de 1-3 ml de BD	10	Partículas
Tapones procesados de 4432/50 Grey Si Huber de 1-3 ml Hypak BSCF de BD	10	Partículas
Tapones Listos para Esterilizar West 890	10	Partículas
Tapones de Si de color gris W4416/50 1000 WWD Hypak BSCF de 1-3 ml de BD	10	Partículas
Tapones de Helvoet 6213	10	Partículas
Tapones para Vial de Daikyo (tapones de clavija D777-1 B2-40 F451)	10	Sin partículas
Cilindros de Jeringa de BSCF LLA EZGTC W7025/65 de 1-3 ml de BD Hypak	4	Partículas
Tapones de Daikyo Hypak NSCF 4023/50 B2-40 de 1-3 ml	10	Sin partículas
Tapa con Punta de Agarre E-Z de Jeringa W7025/65 EZ IITC	10	Sin partículas
Viales de vidrio de Tipo 1 de Schott de 2 ml, 13 mm	4	Sin partículas
Aceite de Silicona (calidad 360 de Dow Chemical Medical)	50 $\mu\text{l}$ (1,43 %)	Partículas
Jeringas TopPac de Schott	4	Sin partículas

15 El serotipo 6B de *S. pneumoniae* monovalente se eligió como un modelo para el 13vPnC y se formuló a 61,6  $\mu\text{g/ml}$  (sin  $\text{AlPO}_4$ ) para simular la concentración total de sacárido en la formulación de 13vPnC. Se añadió silicona (Dow Corning 360 Medical Fluid) a alícuotas del 6B monovalente formulado, que variaban de 2 ppm a 100 ppm. Las mezclas se colocaron en un agitador orbital Labline® durante 2 horas a 50 rpm. Como se indica a continuación en la Tabla 4, se observaron partículas de color blanco de tipo fibra en todas las concentraciones de silicona (Si).

20

TABLA 4

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SILICONA EN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS	
Concentración de Silicona	Aspecto (Inspección Visual)
2 ppm (de 1 µl de Si a 500 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra
5 ppm (2,5 µl de Si a 500 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra
10 ppm (5 µl de Si a 500 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra
15 ppm (7,5 µl de Si a 500 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra
20 ppm (10 µl de Si a 500 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra
100 ppm (2 µl de Si a 20 ml de Formulación)	Partículas de color blanco de tipo fibra

La cantidad de silicona en las formulaciones de 13vPnC (sin  $\text{AlPO}_4$ ) también se examinó. La concentración de silicona se determinó mediante Espectroscopía de Emisión de Plasma DC. (Los datos no se muestran). En este procedimiento, se combinó el contenido de 25 jeringas y se extrajo con dos porciones de 50 ml de una mezcla de ciclohexano/ alcohol isopropílico. Los extractos se combinaron y se evaporaron. El residuo se solubilizó y se sometió a ensayo del mismo modo que los procedimientos existentes para determinación de silicona en tapones de goma. Los resultados indicaban que se pueden extraer entre 15,8 µg y 19,0 µg de silicona de cada jeringa. Esta cantidad corresponde a de un 2,7 % a un 3,3 % de silicona.

En una serie de experimentos separados, en los que el 13vPnC se formuló en presencia de  $\text{AlPO}_4$  y se sometió al mismo medio de recipiente que se establece en la Tabla 3, se elucidó que la silicona y la proteína "libre" (13vPnC) en solución era responsable de la formación de las partículas (los datos no se muestran). El análisis de FTIR de las partículas también indicaba que la particular consistía en proteína y silicona (los datos no se muestran). En estos experimentos se determinó que aproximadamente un 85 % del 13vPnC se une al  $\text{AlPO}_4$ , en los que el 15 % restante era 13vPnC libre (no unido a  $\text{AlPO}_4$ ) en solución. Por el contrario, se observó que el 7vPnC formulado con  $\text{AlPO}_4$  estaba unido en un 100 % al  $\text{AlPO}_4$  (los datos no se muestran).

Para elucidar el efecto de la proteína-polisacárido libre en la formulación de las partículas, se tomaron alícuotas de 25 ml tanto de 7vPnC como de 13vPnC y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 50 ml. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm y el sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se transfirió a un frasco Nalgene®. A cada frasco se le añadieron diez tapones siliconados (Tapones 4432) y se colocaron en un agitador orbital a 50 rpm. Después de una inspección visual cuidadosa, se observó que el sobrenadante de 7vPnC no presentaba formación de partículas, permaneciendo de este modo transparente e incoloro. Sin embargo, el sobrenadante de 13vPnC comenzó a mostrar niveles bajos de partículas la cuarta hora de observación (los datos no se muestran). Este resultado sugiere que la proteína-polisacárido libre en solución, en conjunto con la silicona, es responsable de la formación de las partículas.

Para elucidar adicionalmente la contribución de la proteína-polisacárido libre en solución para la formación de partículas, se eligieron los serotipos 4 y 6B de *S. pneumoniae* monovalente por su unión al aluminio elevada y baja, respectivamente. Estos dos monovalentes se formularon a una concentración de proteína que variaba de 25 µg/ml a 200 µg/ml en ausencia y presencia de  $\text{AlPO}_4$ . En cada formulación se colocaron diez tapones siliconados (tapones 4432), que a continuación se colocaron en un agitador orbital a 50 rpm. Como se indica a continuación en la Tabla 5, se observaron partículas de color blanco de tipo fibra para ambos serotipos monovalentes en todas las concentraciones de proteína en ausencia de  $\text{AlPO}_4$ . Sin embargo, en presencia de  $\text{AlPO}_4$ , se detectaron partículas a concentraciones más bajas para el serotipo 4 (100 µg/ml) con respecto al serotipo 6B (200 µg/ml), los datos no se muestran.

TABLA 5

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS		
	Aspecto (Inspección Visual)	
	Sin $\text{AlPO}_4$	Con $\text{AlPO}_4$
25 µg/ml de 6B	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
50 µg/ml de 6B	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
75 µg/ml de 6B	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas

(continuación)

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS		
	Aspecto (Inspección Visual)	
100 µg/ml de 6B	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
200 µg/ml de 6B	Partículas de color blanco de tipo fibra	Partículas de color blanco de tipo fibra
25 µg/ml de Tipo 4	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
50 µg/ml de Tipo 4	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
75 µg/ml de Tipo 4	Partículas de color blanco de tipo fibra	Sin partículas
100 µg/ml de Tipo 4	Partículas de color blanco de tipo fibra	Partículas de color blanco de tipo fibra
200 µg/ml de Tipo 4	Partículas de color blanco de tipo fibra	Partículas de color blanco de tipo fibra

**Ejemplo 4****5 LOS ADYUVANTES DE ALUMINIO INHIBEN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS DE 13VPNC EN PRESENCIA DE MEDIOS DE ENVASADO SILICONADOS**

Como se ha expuesto anteriormente en el Ejemplo 3, una composición inmunogénica de 13vPnC es una formulación líquida que comprende 4,4 µg/ml de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F de *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml de tipo 6B en tampón succinato 5 mM (pH 5,8) y NaCl al 0,85 %, que también se puede formular con o sin un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de aluminio). El 13vPnC también se puede formular con o sin un adyuvante, tal como 0,25 mg de aluminio/ml de fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>). En el Ejemplo 3 se observó que 13vPnC formulado sin AlPO<sub>4</sub> y cargado en jeringas Hypak SCF™ de BD (protegidas con émbolos Hypak) fallaba en la inspección visual debido a la observación de partículas, en el que algunos estudios adicionales revelaron que las partículas eran en parte un resultado de interacciones de proteína-polisacárido con silicona. En el siguiente ejemplo, se evaluaron jeringas (y émbolos) de diversos vendedores con formulaciones de 13vPnC, en las que se simulaban las condiciones de transporte y manipulación mediante agitación (se describe a continuación).

**Materiales**

El 13vPnC se formuló en tampón de succinato 5 mM que contenía NaCl al 0,85 % y 4,4 µg/ml de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* y 8,8 µg/ml del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, con y sin 0,25 mg/ml de fosfato de aluminio. El medio de recipiente sometido a ensayos se enumera a continuación en la Tabla 6.

**TABLA 6**

MEDIOS DE RECIPIENTE		
	Medios de Recipiente	Descripción
1	Jeringas Vetter de vidrio sin tratar de Tipo 1	1 ml de longitud en formato a granel
2	Jeringas TopPac® de Schott	jeringas de plástico
3	Jeringas de vidrio al horno sin tratar de Tipo 1 de BD	0,1 mg de silicona/cilindro
4	Jeringas de vidrio al horno sin tratar de Tipo 1 de BD	0,04 mg de silicona/cilindro
5	Jeringas de viscosidad elevada de BD de vidrio sin tratar de Tipo 1	jeringas de 2,25 ml de 12500 cst silicona
6	Jeringas de viscosidad elevada de BD de vidrio sin tratar de Tipo 1	jeringas de 1,0 ml de 12500 cst silicona
7	Jeringas de BänderGlas, PS2 de vidrio sin tratar de Tipo 1	0,056 mg de silicona/cilindro
8	Jeringas de BänderGlas, PS4 de vidrio sin tratar de Tipo 1	0,14 mg de silicona/cilindro

(continuación)

MEDIOS DE ENVASADO			
		Medios de Envasado	Descripción
	1	Émbolos B2-40 de Flurotec® West 4023/50	Émbolos de Flurotec®
	2	Émbolos B2-40 de Flurotec® West 4023/50	Émbolos de Flurotec®
	1	13vPnC con AlPO <sub>4</sub> en jeringas Hypak de BD con émbolos West 4432 listos para usar y protecciones de punta 7025/65 EZ	Control positivo, alto contenido de silicona
	2	13vPnC con AlPO <sub>4</sub> en jeringas sin siliconar con émbolos B2-40 de Flurotec® West 4023/50	Control negativo, sin tratar con silicona

### Procedimientos

5 **Procedimiento de Formulación y Llenado.** En la Tabla 7 que sigue a continuación se enumera la fórmula para una formulación de 13vPnC de número 2 litros. En resumen, la solución salina al 0,85 % se añadió primero a un vaso de precipitados de vidrio, seguido del tampón de succinato 5 mM (pH 5,8), y a continuación secuencialmente cada uno de los conjugados de serotipo de *S. pneumoniae*. La formulación se mezcló suavemente en una placa agitadora y se filtró a través de una unidad de filtro Millipore® de 0,22 µm. Para la formulación que comprende AlPO<sub>4</sub>, a continuación se añadió el AlPO<sub>4</sub> (0,25 mg/ml de concentración final) y la formulación se mezcló suavemente. Las jeringas del ensayo se llenaron a continuación (0,58 ml/jeringa) y se cerraron con émbolos.

10 **Simulación de Transporte mediante Agitación.** Para agitar las muestras se usó un agitador vorticial Digital Multitube de la firma VWR® (N° de Catálogo 14005-826). Las jeringas llenadas con 13vPnC se colocaron de forma horizontal y se fijaron con las placas de los soportes del agitador vorticial. Las muestras se mantuvieron en posición y se agitaron en modo pausa a 500 rpm a 2-8 °C durante veinticuatro horas.

15 **Nefelometría.** Las antigenidades específicas del serotipo se determinaron mediante un ensayo de nefelometría de la tasa usando anticuerpos específicos del tipo. Para 13vPnC con AlPO<sub>4</sub>, el fosfato de aluminio se solubilizó mediante la adición de NaOH 1 N. La solución se neutralizó inmediatamente mediante la adición de ácido cítrico 1 M. Para 13vPnC sin AlPO<sub>4</sub>, no se realizaron procedimientos de solubilización ni de neutralización. El ensayo mide la tasa de cambio de la intensidad de la dispersión de luz derivada del complejo de antígeno-anticuerpo formado en la muestra usando un nefelómetro Array 360 de Beckman.

TABLA 7

TABLA DE FORMULACIÓN DE 13VPNC					
Componente	tamaño del Lote (L)	Conc a granel (mg/ml)	Conc Requerida (ug/ml)	Volumen de 13vPnC con AlPO <sub>4</sub> (ml)	Volumen de 13vPnC sin AlPO <sub>4</sub> (ml)
serotipo 1	2,000	0,506	4,4	17,39	17,39
serotipo 3	2,000	0,256	4,4	34,38	34,38
serotipo 4	2,000	0,530	4,4	16,60	16,60
serotipo 5	2,000	0,515	4,4	17,09	17,09
serotipo 6A	2,000	0,519	4,4	16,96	16,96
serotipo 6B	2,000	0,489	8,8	35,99	35,99
serotipo 7F	2,000	0,500	4,4	17,60	17,60
serotipo 9V	2,000	0,521	4,4	16,89	16,89
serotipo 14	2,000	0,518	4,4	16,99	16,99
serotipo 18C	2,000	0,509	4,4	17,29	17,29

(continuación)

TABLA DE FORMULACIÓN DE 13VPNC					
Componente	tamaño del Lote (L)	Conc a granel (mg/ml)	Conc Requerida (ug/ml)	Volumen de 13vPnC con AIPO <sub>4</sub> (ml)	Volumen de 13vPnC sin AIPO <sub>4</sub> (ml)
serotipo 19A	2,000	0,511	4,4	17,22	17,22
serotipo 19F	2,000	0,520	4,4	16,92	16,92
serotipo 23F	2,000	0,511	4,4	17,22	17,22
Tampón de Succinato en Solución Salina al 0,85 %, pH 5,8	2,000	50,0	5000	200,0	200,0
AIPO <sub>4</sub>	2,000	3,250	250	153,85	ND
Solución Salina	2,000	ND	ND	1387,62	1541,46

## RESULTADOS

5 En este estudio, algunas jeringas de diferentes vendedores, que tienen diferentes niveles de silicona (Tabla 6), se sometieron a condiciones de agitación controlada. La antigenicidad total de cada serotipo se midió mediante ensayos de Nefelometría para muestras tanto de agitación previa como de agitación posterior. La pérdida de antigenicidad después de agitación (porcentaje) se calculó y se muestra en la FIG. 2 a FIG. 7.

10 Antes del estudio, las condiciones de agitación se optimizaron basándose en la pérdida de antigenicidad de los dos controles: (1) el control del peor caso (control positivo, alto contenido de silicona; FIG. 2) y (2) el control del mejor caso (control negativo, sin silicona; FIG. 3). A continuación las condiciones se optimizaron de modo que la pérdida de antigenicidad era baja en el control positivo, aunque detectable en el control negativo. Esto se hizo para asegurar que la agitación no era ni demasiado débil para producir precipitación en las jeringas; ni demasiado fuerte, de modo que la precipitación la podrían causar otros factores distintos de la interacción de la silicona (por ejemplo, mediante fuerzas de cizallamiento). Por lo tanto, la agitación a la 500 rpm (modo pausa) durante veinticuatro horas se eligió como la condición de agitación más adecuada, mientras que se usaron una temperatura de 2-8 °C y una posición horizontal para simular las condiciones en tiempo real del transporte y la manipulación del producto.

15 Los resultados del estudio se resumen como sigue a continuación: Las pérdidas de antigenicidad más elevadas del 13vPnC formulado con AIPO<sub>4</sub> se produjo en las jeringas con niveles de silicona más elevados (los datos no se muestran). Por ejemplo, de las jeringas enumeradas en la Tabla 6, la jeringa Hypak de BD (control 1), la jeringa al horno de BD (jeringa 3; 0,1 mg de silicona), cada una de las jeringas de viscosidad elevada de BD (jeringa 5) y BänderGlas PS4 (jeringa 8, 0,14 mg de silicona), presentaba uno o más de los serotipos de 13vPnC con una pérdida de antigenicidad superior a un 10 %. Las pérdidas de antigenicidad más pequeñas del 13vPnC formulado con AIPO<sub>4</sub> se produjeron en las jeringas con niveles de silicona más bajos. Por ejemplo, las jeringas de Vetter (FIG. 4) y las jeringas de plástico TopPac de Schott (FIG. 5) eran las más similares a las jeringas sin siliconar (FIG. 2), demostrando ambas pérdidas de antigenicidad menores para 13vPnC formulado con AIPO<sub>4</sub>.

20 La influencia del fosfato de aluminio en la estabilización del 13vPnC y la inhibición de la formación de partículas en presencia jeringas siliconadas se analizó en experimentos usando el 13vPnC formulado con y sin 0,25 mg/ml de AIPO<sub>4</sub>, en los que las jeringas usadas eran las jeringas de bajo contenido de silicona al horno de BD (jeringa 4 en la Tabla 6) y las jeringas BänderGlas PS2 de bajo contenido de silicona (jeringa 7 en la Tabla 6). Las jeringas de bajo contenido en silicona al horno de BD (0,04 mg de silicona/cilindro) por lo general tenían una pérdida de antigenicidad inferior a un 10 % para los serotipos de 13vPnC formulados con AIPO<sub>4</sub> (FIG. 6A), mientras que la pérdida de antigenicidad para los serotipos de 13vPnC formulados sin AIPO<sub>4</sub> (FIG. 6B) presentaba pérdidas de antigenicidad que variaban de un 5 % (serotipo 1) hasta a aproximadamente un 50 % (serotipo 23F). las jeringas BänderGlas PS2 de bajo contenido en silicona (0,056 mg de silicona/cilindro) presentaban una pérdida de antigenicidad inferior a un 5-8 % (dependiendo del serotipo) para el 13vPnC formulado con AIPO<sub>4</sub> (FIG. 7A), mientras que la pérdida de antigenicidad para los serotipos de 13vPnC formulados sin AIPO<sub>4</sub> (FIG. 7B) presentaba pérdidas de antigenicidad que variaban de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 % (dependiendo del serotipo).

35 Por lo tanto, estos datos tomados en conjunto indican que: (1) la pérdida de antigenicidad de 13vPnC era mayor en las jeringas con niveles de silicona más elevados y (2) el 13vPnC formulado sin AIPO<sub>4</sub> mantenían pérdidas de

antigenicidad superiores a 13vPnC con  $AlPO_4$  en todas las jeringas sometidas a ensayo.

### Ejemplo 5

#### LAS FORMULACIONES QUE COMPRENEN TENSIOACTIVO OPTIMIZAN LA UNIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE MENINGOCOCOS A ADYUVANTES DE SAL DE ALUMINIO

5 La proteína 2086 lipídada recombinante de *N. meningitidis* (rLP2086) usada en este ejemplo se expresó y se purificó como sigue a continuación. La rLP2086 se expresó de forma recombinante en *E. coli* usando una secuencia directora nativa. A continuación siguieron protocolos de fermentación convencionales para *E. coli* usando y la posterior lisis celular. La proteína 2086 lipídada recombinante de *N. meningitidis* se purificó a partir de sedimento de la membrana con Tris-HCl 50 mM/EDTA 5 mM/sarcosilo al 1 % a pH 8. Este extracto de sarcosilo se ajustó a  
10 Zwittergent 3-14 al 1 % (Z3-14) y se dializó dos veces con respecto a un exceso de 30 veces de Tris-HCl 50 mM/EDTA 5 mM/Z3-14 al 1 %. El extracto de rLP2086 dializado se precipitó con etanol al 90 % para retirar el sarcosilo restante, y se solubilizó con Tris-HCl 50 mM/EDTA 5 mM/Z3-14 al 1 % a pH 8. El material insoluble se retiró por centrifugación, el sobrenadante se pasó sobre una columna de cromatografía de intercambio aniónico, y el rLP2086 se recogió en la fracción sin unir. El material sin unir se dializó a continuación dos veces frente al exceso de  
15 30 veces de NaAc 25 mM/Z3-14 al 1 % a pH 4,5, y se pasó sobre una columna de cromatografía de intercambio catiónico. El rLP2086 se eluyó con un gradiente de NaCl 0-0,3 M y se almacenó congelado (-25 °C).

A continuación el rLP2086 purificado se formuló con NaCl 150 mM, Tween™80 al 0,020 %, 0,25 mg de Al/ml de  $AlPO_4$ , y en los siguientes tampones: tampón fosfato 10 mM a pH 7,0 y tampón succinato 5 mM a pH 6,0. La Tabla 8 compara el porcentaje de unión de proteína al adyuvante de  $AlPO_4$ .

20

TABLA 8

UNIÓN DE RLP2086 A ADYUVANTE		
Tampón	Conc. Total de Proteína (µg/ ml)	Proteína Sin Unir a $AlPO_4$ (%)
Tampón de fosfato 10 mM a pH 7,0 que contiene NaCl 150 mM, polisorbato 80 al 0,02 % y 0,25 mg de Al/ml de $AlPO_4$	400	68
	120	82
Tampón de succinato 5 mM a pH 6,0 que contiene NaCl 150 mM, polisorbato 80 al 0,02 % y 0,25 mg de Al/ml de $AlPO_4$	400	81
	120	100

### REFERENCIAS

- Baldwin, "Contamination of insulin by silicone oil: A potential hazard of plastic insulin syringes", *Diabet. Med.*, 5: 789-790, 1988.
- 25 Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Interactions at Liquid-Liquid Interfaces. En K.L. Mittal y P. Kumar (eds.), *Emulsions, Foams and Thin Films*, Dekker, New York, pp. 371-380, 2000.
- Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Films: Establishing the Strength of the Protein-Silicone Interaction" *Langmuir* 14: 1892-1898, 1998<sup>b</sup>.
- 30 Bartzoka, Brook y McDormott, "Protein-Silicone Interactions: How Compatible Are the Two Species?" *Langmuir* 14: 1887-1891, 1998<sup>a</sup>.
- Bartzoka, Chan y Brook, "Protein-Silicone Synergism at Liquid/Liquid Interfaces" *Langmuir* 16: 4589-4593, 2000.
- Bernstein, "Clouding and Deactivation of Clear (Regular) Human Insulin: Association with Silicone Oil from Disposable Syringes", *Diabetes Care* 10: 786-787, 1987.
- 35 Bernstein, "Clouding and deactivation of clear (regular) human insulin: Association with silicone oil from disposable syringes?", *Diabetes Care*, 10: 786-787, 1987.
- Bolgiano y col., "Effect of Physico-Chemical Modification on the Immunogenicity of Haemophilus influenzae Type b Oligosaccharide-CRM197 Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 19: 3189-3200, 2001.
- Chantelau y Berger, "Pollution of insulin with silicone oil, a hazard of disposable plastic syringes" *Lancet*, 1: 1459, 1985.
- 40 Chantelau y col., "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 y Bohlken, "Silicone Oil Released from Disposable Insulin Syringes", *Diabetes Care* 9: 672-673, 1986.
- Collier y Dawson, "Insulin syringes and silicone oil" *Lancet*, 5: 789-790, 1985.
- 45 Ho y col., "Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines", *Vaccine*, 20: 3509-3522, 2002.
- Ho y col., "Solution Stability of the Subunit Components of Meningococcal C Oligosaccharide-CRM197 Conjugate

Vaccines", *Biotech. Appl. Biochem.*, 33: 91-98, 2001.

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

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

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

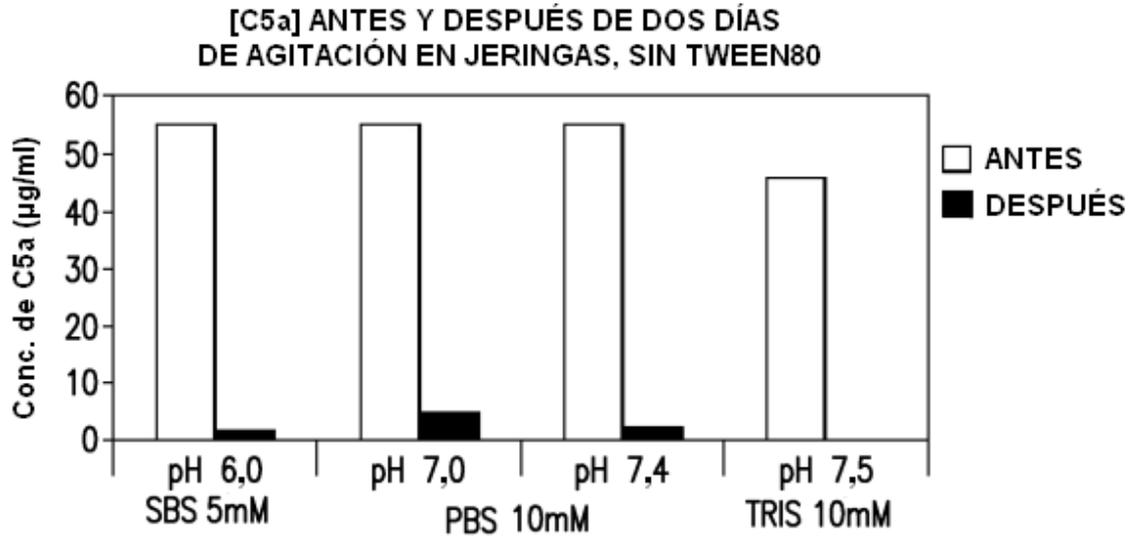
Sun y col., "Protein Denaturation Induced by Cyclic Silicone", *Biomaterials* 18: 1593-1597, 1998.

## REIVINDICACIONES

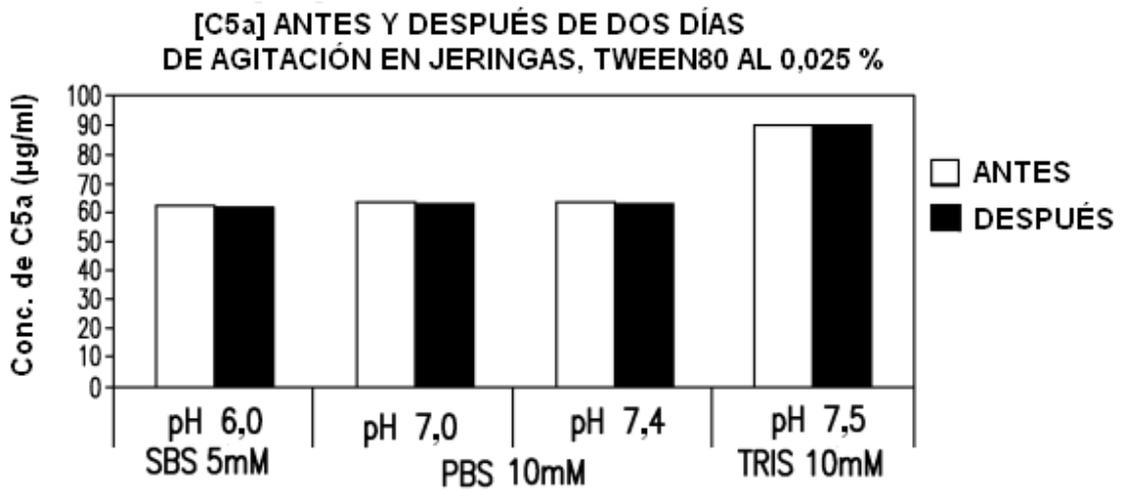
1. Una formulación que estabiliza un conjugado de polisacárido-proteína, formulación que comprende (i) una solución salina con pH tamponado, en la que el tampón tiene un pKa de 3,5 a 7,5, (ii) polisorbato 80 a una concentración final de un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación y (iii) uno o más conjugados de polisacárido-proteína en la que el conjugado de polisacárido-proteína comprende uno o más polisacáridos de neumococos.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicha solución salina con pH tamponado tiene un pH de 5,5 a 7,5.
3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicho tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0.
5. La formulación de la reivindicación 4, en la que la concentración final del tampón succinato es 5 mM.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sal en la solución salina con pH tamponado comprende cloruro de magnesio, cloruro potásico, cloruro sódico o una combinación de los mismos.
7. La formulación de la reivindicación 6, en la que la sal en la solución salina con pH tamponado es cloruro sódico.
8. La formulación de la reivindicación 3, en la que dicha solución salina con pH tamponado tiene un pH de 5,5 a 7,5, en la que dicho tampón es histidina en la que la sal en la solución salina con pH tamponado es cloruro sódico.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es un 0,01 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación.
10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación.
11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de meningococos, una o más proteínas antigénicas de meningococos, o una combinación de los mismos.
12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos de estreptococos, una o más proteínas antigénicas de estreptococos, o una combinación de los mismos.
13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho uno o más polisacáridos de neumococos comprenden un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae*, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae*.
14. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 7-valente (7vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.
15. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la formulación de conjugado de polisacárido-proteína es una formulación de conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 7F de *S.*

*pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.

16. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la formulación comprende adicionalmente uno o más adyuvantes.
- 5 17. La formulación de la reivindicación 16, en la que dicho adyuvante es una sal de aluminio.
18. La formulación de la reivindicación 17, en la que dicha sal de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.
19. La formulación de la reivindicación 16, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
20. La formulación de la reivindicación 1, que comprende
- 10 (i) una solución salina con pH tamponado, en la que el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM y pH de 5,8 a 6,0,
- (ii) polisorbato 80 a una concentración final de un 0,01 % a un 0,05 % de polisorbato 80 en peso/volumen de la formulación y
- 15 (iii) una formulación de conjugado de neumococos 13-valente (13vPnC) que comprende un polisacárido del serotipo 4 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6B de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 9V de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 18C de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 23F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 1 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 3 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 5 de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 6A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>, un polisacárido del serotipo 7F de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub> y un polisacárido del serotipo 19A de *S. pneumoniae* conjugado con un polipéptido CRM<sub>197</sub>.
- 20 25 21. La formulación de la reivindicación 20, en la que el tampón es succinato a una concentración final de 5 mM.
22. La formulación de la reivindicación 21, en la que la sal en la solución salina con pH tamponado comprende cloruro sódico.
23. La formulación de la reivindicación 22, en la que la formulación comprende adicionalmente un adyuvante, y en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
- 30 24. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que la formulación de conjugado de polisacárido-proteína está contenida en un recipiente seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en un vial, un tapón de vial, un cierre de vial, un cierre de vidrio, un cierre de goma, un cierre de plástico, una jeringa, un tapón de jeringa, un émbolo de jeringa, una matraz, un vaso de precipitados, un cilindro graduado, un fermentador, un biorreactor, tubo, una tubería, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y un lápiz desechable.
- 35 25. La formulación de la reivindicación 24, en la que el medio de recipiente está siliconado.
26. Un medio de recipiente cargado con la formulación una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.
27. El medio de recipiente de la reivindicación 26 seleccionado entre el grupo que consiste en matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, frascos, viales, ampollas, jeringas.
- 40 28. El medio de recipiente de la reivindicación 27 en el que dicho recipiente está fabricado con vidrio, metales o polímeros.
29. El medio de recipiente de la reivindicación 27 en el que dicho recipiente es una jeringa.
30. El medio de recipiente de la reivindicación 27 en el que dicho recipiente es una jeringa de vidrio.
- 45 31. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en el que dicho medio de recipiente está siliconado.



**FIG.1A**



**FIG.1B**

- ▨ 2 HRS DE AGITACIÓN
- 8 HRS DE AGITACIÓN
- 24 HRS DE AGITACION

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD DE 13vPnC CON AIOP4  
EN JERINGA DE VIDRIO DE TIPO 1/TAPONES 4432

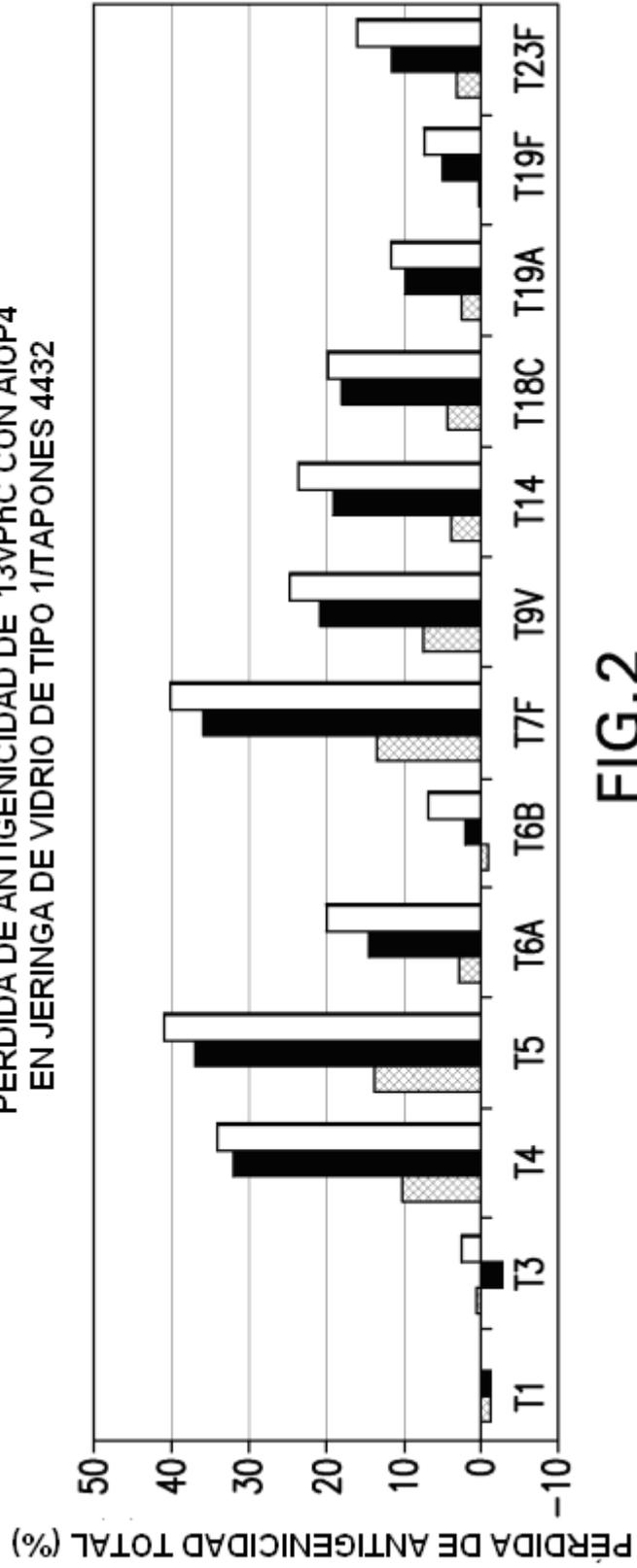
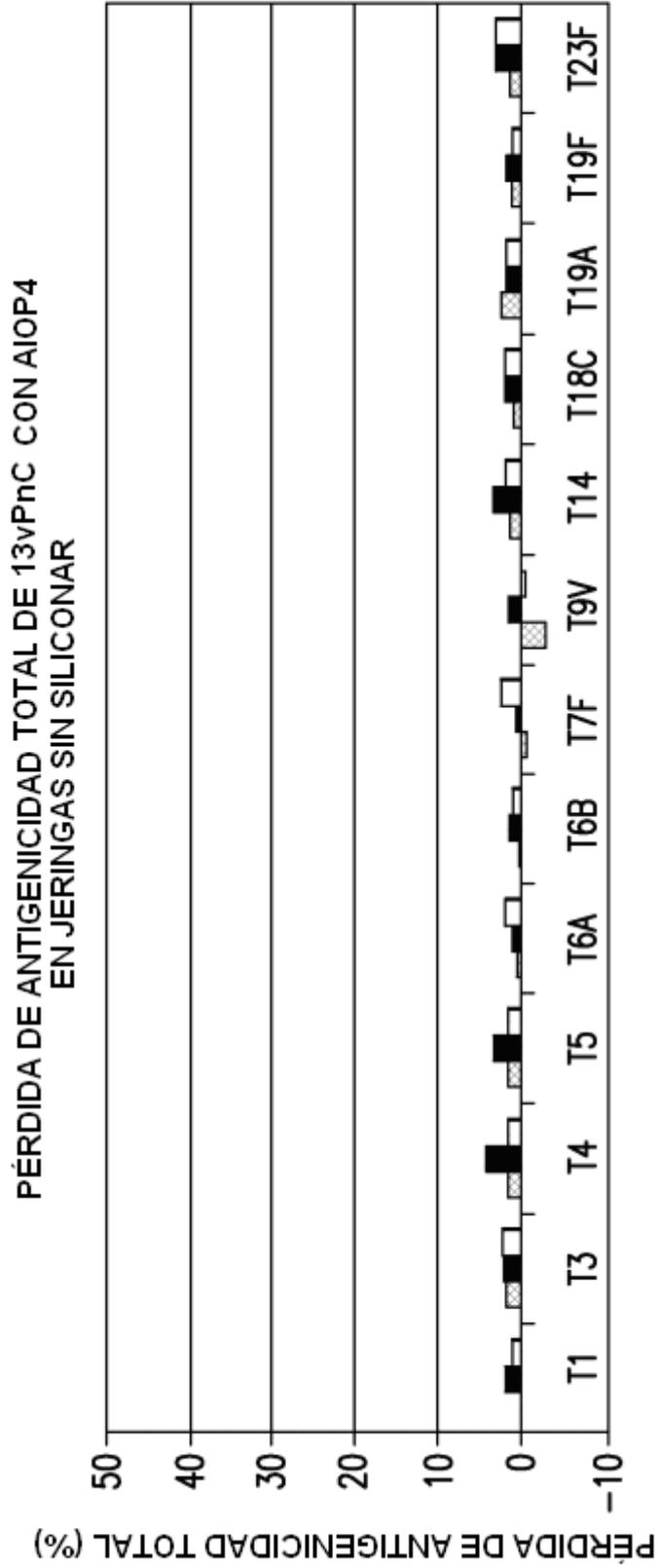


FIG.2

- ▨ 2 HRS DE AGITACIÓN
- 8 HRS DE AGITACIÓN
- 24 HRS DE AGITACION



**FIG.3**

▨ 2 HRS DE AGITACIÓN  
■ 8 HRS DE AGITACIÓN  
□ 24 HRS DE AGITACIÓN

PÉRDIDA DE ANTIGENICIDAD TOTAL DE 13vPnC CON  
AIOP4 EN JERINGAS VETTER

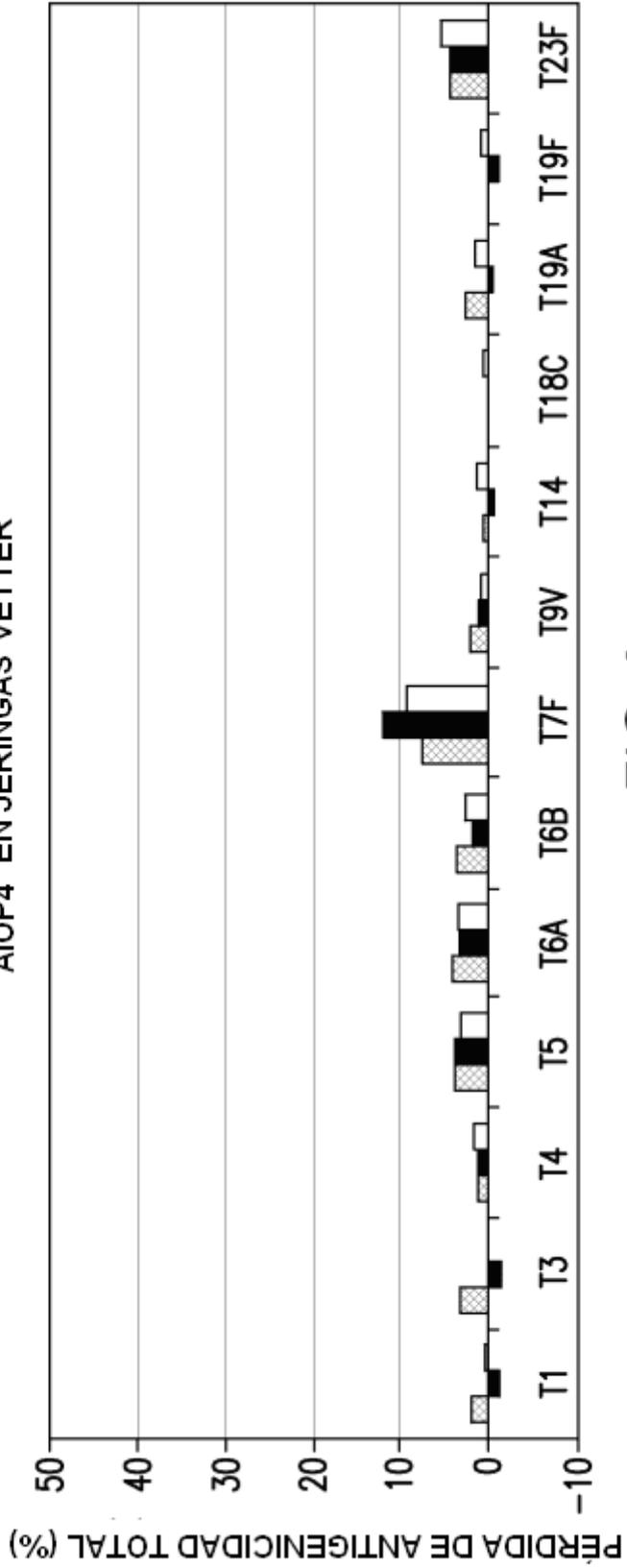
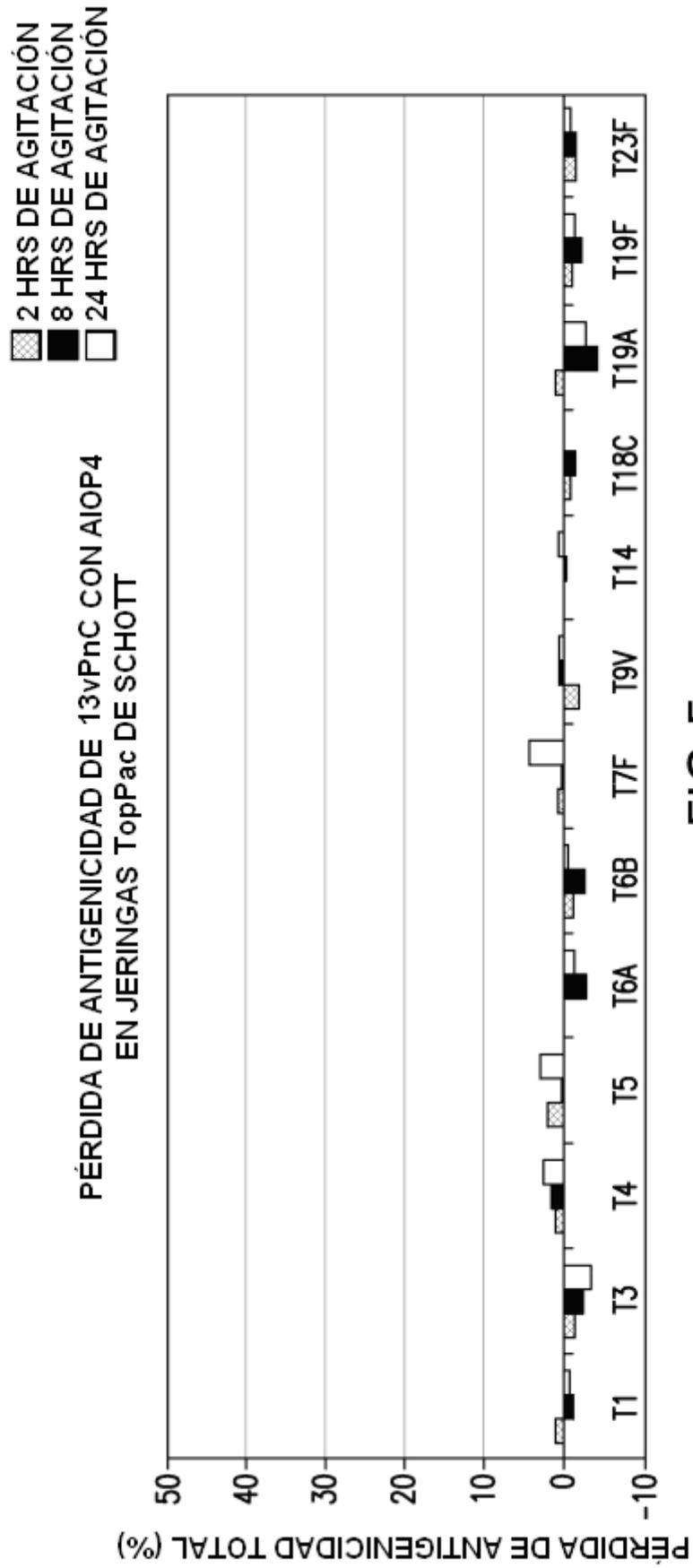


FIG.4



**FIG.5**

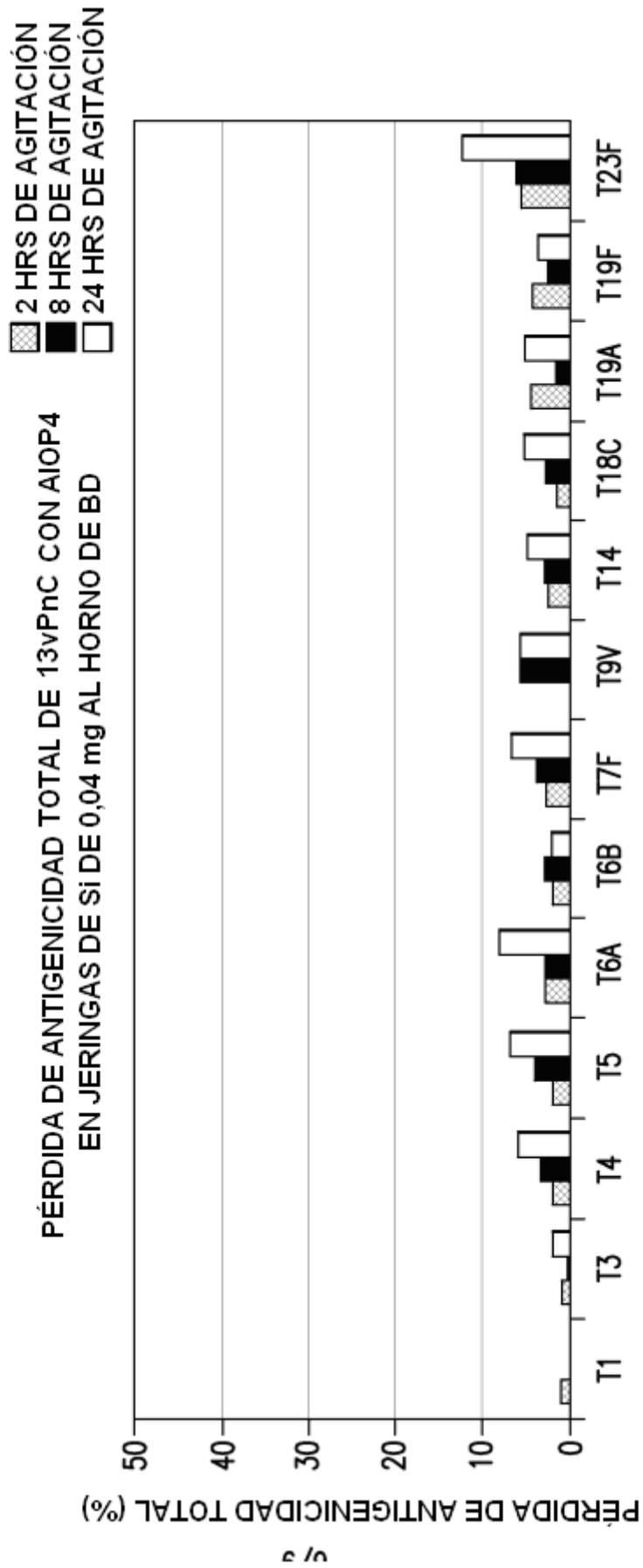


FIG.6A

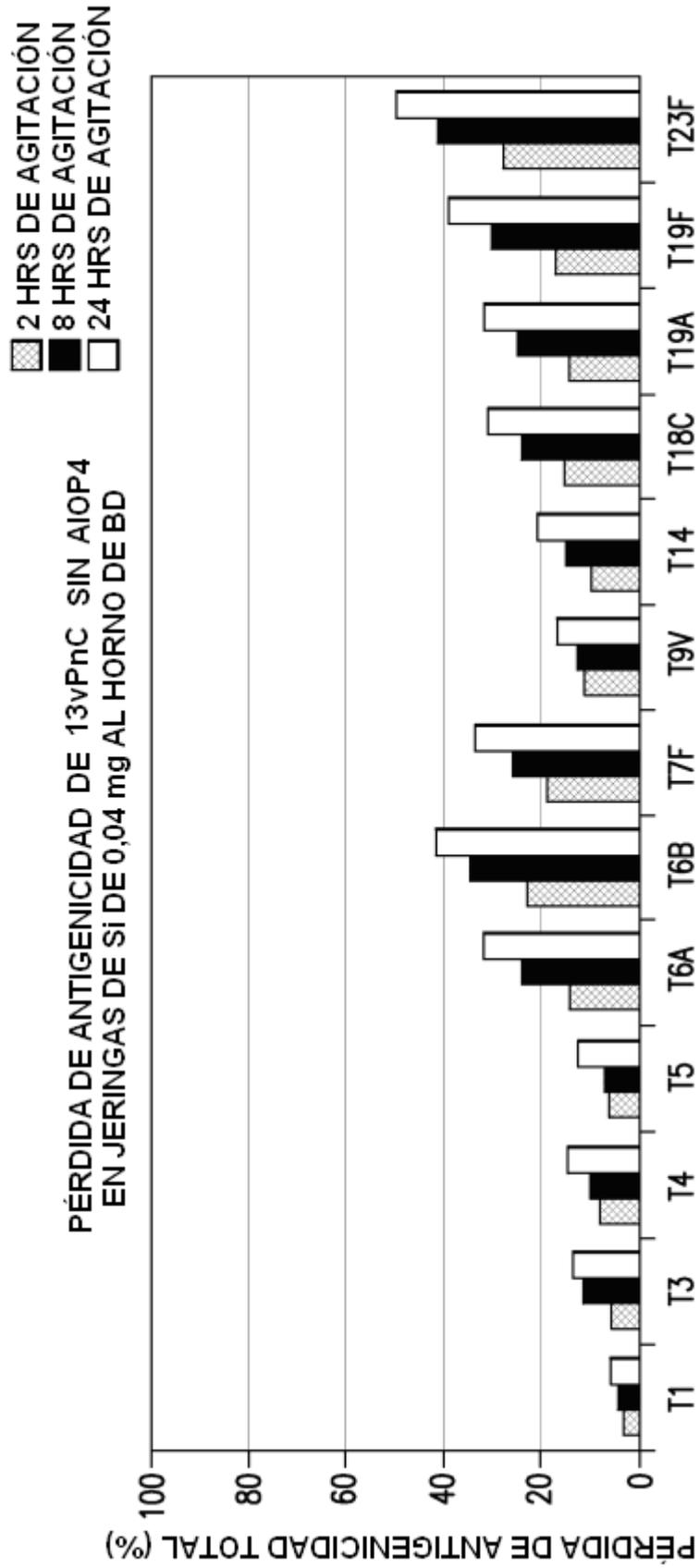
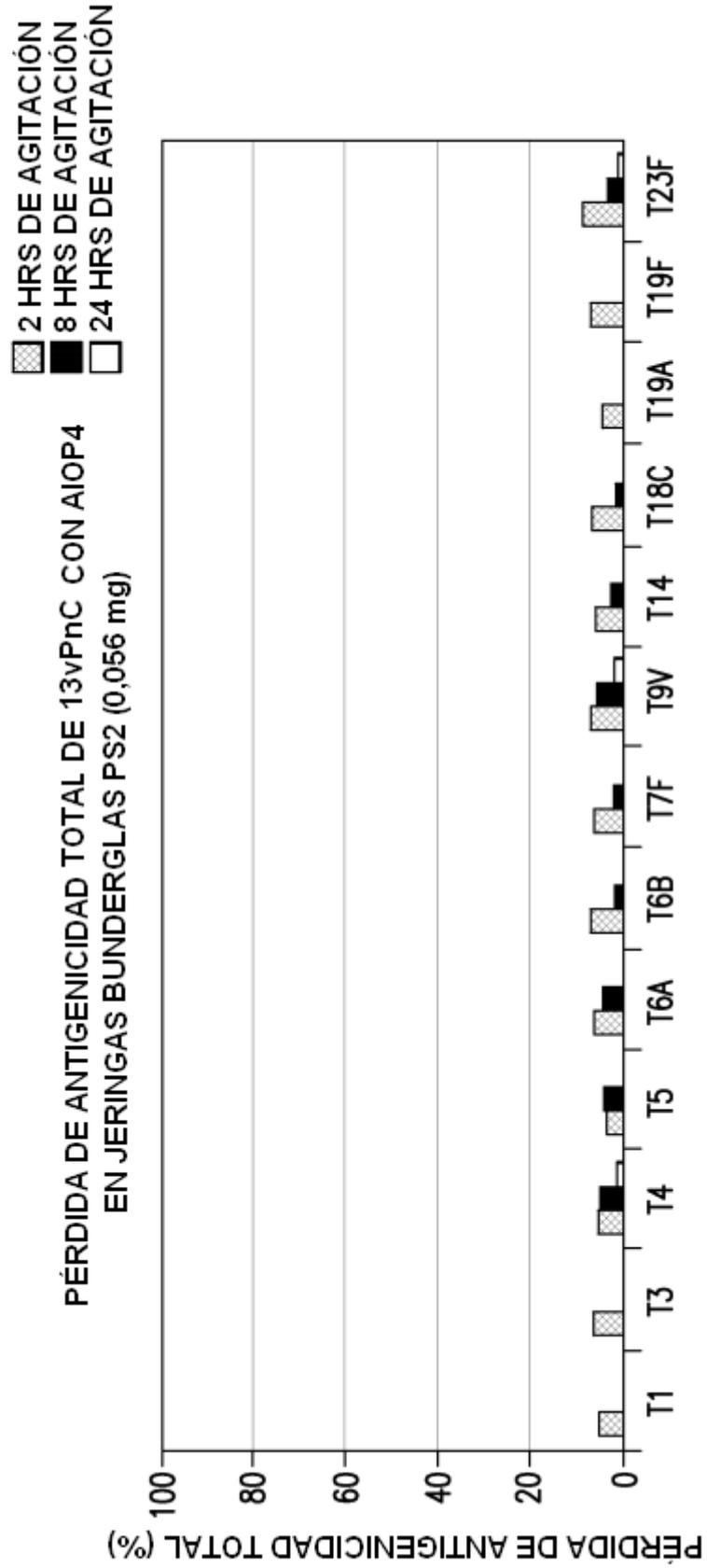


FIG.6B



**FIG.7A**

