

TÍTULO DE LA INVENCION
COMPOSICIÓN ADYUVANTE DE NANOEMULSIONES PARA VACUNAS
NEUMOCÓCICAS CONJUGADAS

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad neumocócica es una infección causada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Se sabe que diferentes serotipos neumocócicos causan diferentes manifestaciones de la enfermedad y las infecciones pueden causar una serie de síntomas, desde infecciones del oído y de los senos paranasales hasta neumonía e infecciones del torrente sanguíneo. La enfermedad neumocócica tiene una alta morbilidad y mortalidad asociadas en todo el mundo, particularmente entre los ancianos y los niños pequeños. Actualmente se han identificado 100 polisacáridos capsulares (Ganaie, F. *et al.* (2020) Clinical Science and Epidemiology, vol. 11, número 3, páginas 1-15). Estos serotipos se distinguen por su estructura química, respuesta serológica y otras mutaciones genéticas relacionadas.

En 1983, PNEUMOVAX® (Merck Sharp & Dohme Corp., una filial de Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, Estados Unidos), en los Estados Unidos, se aprobó una vacuna neumocócica de 23 serotipos. Esta vacuna demostró una inmunogenicidad reducida en los bebés debido a las respuestas independientes de linfocitos T. Para abordar este problema, particularmente en bebés, se desarrollaron vacunas neumocócicas conjugadas (PCV) acoplando covalentemente el polisacárido a una proteína transportadora, en donde la respuesta inmunogénica se volvió dependiente de linfocitos T. En 2000, PREVNAR® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Collegeville, PA), en los Estados Unidos, se aprobó una vacuna neumocócica conjugada de 7 serotipos. En 2010, PREVNAR13® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Collegeville, PA), en los Estados Unidos, se aprobó una vacuna neumocócica conjugada de 13 serotipos. En 2021, VAXNEUVANCE® (Merck Sharp & Dohme Corp., una filial de Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, Estados Unidos), una vacuna neumocócica conjugada de 15 serotipos y PREVNAR20® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Collegeville, PA), en los Estados Unidos, también se aprobó una vacuna neumocócica conjugada de 20 serotipos. Otras PCV multivalentes son conocidos y están licenciados en todo el mundo.

Las PCV autorizadas actualmente utilizan derivados que contienen aluminio como adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad. Aunque los adyuvantes de aluminio aumentan las respuestas inmunogénicas desde el inicio, se desconoce si la respuesta inmunogénica es suficiente para PCV de más serotipos, particularmente en bebés. Por lo tanto,

existe la necesidad de identificar otros adyuvantes que puedan proporcionar una mayor inmunogenicidad para las PCV multivalentes sobre el patrón o patrones de adyuvante de aluminio actual.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a la prevención de la enfermedad neumocócica. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones administradas como vacuna que incluyen conjugados neumocócicos y una formulación adyuvante de nanoemulsiones estables (SNE). La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición

10 neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende emulsionantes y/o solubilizantes y/o tensioactivos y/o lípidos. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende tensioactivos y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende

15 ésteres de sorbitán y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende ésteres de sorbitán, en particular polisorbato-20 o polisorbato-80 o un poloxámero y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que

20 incluye una SNE que comprende ésteres de sorbitán, en particular polisorbato-20 o polisorbato-80 o un poloxámero y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 o polisorbato-80, un terpeno y un lípido catiónico opcional. La presente divulgación proporciona, entre otras

25 cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 o polisorbato-80, escualeno y un lípido catiónico opcional. La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una SNE que comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 o polisorbato-80, escualeno y un lípido catiónico. La presente divulgación proporciona además,

30 entre otras cosas, una composición neumocócica conjugada que incluye una formulación adyuvante de SNE que comprende 1) trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); 3) escualeno; y un 4) lípido catiónico opcional. Una composición neumocócica conjugada particular incluye una formulación adyuvante de SNE que comprende 1)

trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); 3) escualeno; y 4) el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina ("CLA" o, cuando el lípido catiónico está incluido en la SNE, "CLA-SNE"). Una composición neumocócica conjugada particular incluye una formulación adyuvante de SNE que comprende 1) 5 trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); 3) escualeno; y 4) el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina ("CLA" o, cuando el lípido catiónico está incluido en la SNE, "CLA-SNE"). Una composición neumocócica conjugada particular incluye una formulación adyuvante de SNE que comprende 1) 10 trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); 3) escualeno; y 4) el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina ("CLA" o, cuando el lípido catiónico está incluido en la SNE, "CLA-SNE"). Una composición neumocócica conjugada particular incluye una formulación adyuvante de SNE que comprende 1) 15 trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20); 3) escualeno; y 4) el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina ("CLA" o, cuando el lípido catiónico está incluido en la SNE, "CLA-SNE"). En comparación con el rendimiento de 1) una composición neumocócica conjugada sin adyuvante; 2) una composición neumocócica conjugada con adyuvante de fosfato de aluminio (APA); o 3) una composición neumocócica conjugada con adyuvante de LNP; la composición neumocócica conjugada adyuvante de SNE descrita proporcionó una respuesta inmunogénica equivalente o aumentada para la mayoría de 20 los serotipos neumocócicos probados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Estructuras seleccionadas de lípidos catiónicos: (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (CLA); (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-dimetilpentatriacont- 25 6,9,26,29-tetraen-18-amina (CLX); y N,N-dimetil-1-((1S,2R)-2-octilciclopropil)heptadecan-8-amina (CLY).

Figura 2: Componentes de CLA-SNE: (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (CLA), SPAN-85, PS-20 y escualeno.

Figura 3: Caracterización de la preparación a granel de adyuvante CLA-SNE 30 utilizando dispersión de luz estática (SLS). Véase el ejemplo 3.

Figura 4: Influencia del proceso de formulación en la incorporación de CLA a una SNE. Véase el ejemplo 4.

Figura 5A: Títulos de IgG anti-6B preinmunitarios (agrupados) y posteriores a la

dosis 3 (día 35) después de la inmunización de ratones con formulaciones descritas en la tabla 4. Las barras de error son medias geométricas con intervalos de confianza del 95 %. Datos transformados analizados por ANOVA unidireccional con Dunnett

después de la prueba * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$, NS es no significativo.

5 Véase el ejemplo 6.

Figura 5B: Títulos de destrucción opsonofagocítica de serotipo 6B preinmunitarios (combinados) y posteriores a la dosis 3 (día 35) (combinados) de ratones inmunizados con formulaciones descritas en la tabla 4. Véase el ejemplo 6.

Figura 6A: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India adultos después de la inmunización con PCV24 formulada con CLA-SNE en comparación con PCV24 formulada con APA después de la dosis 1 (PD1: círculos) y después de la dosis 2 (PD2: cuadrados). La PCV24 formulada con CLA-SNE (1200 $\mu\text{g/ml}$ de CLA-SNE) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA. Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 7.

Figura 6B: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India adultos después de la inmunización con formulaciones descritas en la tabla 5 en comparación con PCV24 formulada con APA después de la dosis 2 (PD2). PCV24 formulada con CLA-SNE (círculos y triángulos), CLA-LNP (cuadrados) o SNE (rombos) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA. Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 7.

Figura 7A: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 μg) y PCV24/CLA-SNE (120 μg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 1 y 3. Véase el ejemplo 7.

Figura 7B: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (individuales/agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis

suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 4 y 5. Véase el ejemplo 7.

5 Figura 7C: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg),
10 respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 6A y 6B. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7D: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos
15 después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg),
 respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los
20 serotipos 6C y 7F. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7E: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5.
El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada
25 de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 8 y 9V. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7F: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados),
30 después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o

0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 10A y 11A. Véase el ejemplo 7.

5 Figura 7G: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg),
10 respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos múltiples (MOPA) para los serotipos 12F y 14. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7H: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos
15 después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg),
 respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los
20 serotipos 15A y 15C. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7I: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos
 después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o
25 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg),
 respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 18C y 19A. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7J: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados),
30 después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o

0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 19F y 22F. Véase el ejemplo 7.

5 Figura 7K: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados/individuales), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y
10 PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los serotipos 23B y 23F. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7L: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos
15 después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5. El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para los
20 serotipos 24F y 33F. Véase el ejemplo 7.

 Figura 7M: Títulos de destrucción opsonofagocítica preinmunitarios (agrupados), después de la dosis 1 (día 14) y después de la dosis 2 (día 42) de macacos de la India adultos después de la inmunización con las formulaciones descritas en la tabla 5.
El volumen de la dosis administrada es de 0,1 ml por animal y da lugar a una dosis suministrada
25 de CLA de 0,08 mg o 0,12 mg para los grupos PCV24/CLA-SNE (80 µg) y PCV24/CLA-SNE (120 µg), respectivamente. Se evaluaron los sueros de macacos de la India para detectar anticuerpos funcionales determinados mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para el serotipo 35B. Véase el ejemplo 7.

 Figura 8A: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la
30 India lactantes después de la inmunización con PCV13, PCV24 con CLA-LNP (dosis de 120 µg), PCV24 con CLA-SNE (295 µg de CLA y 2,5 mg de escualeno), PCV24 con CLA-SNE (295 µg de CLA y 0,5 mg de escualeno) en comparación con una inmunización de PCV24

formulada con APA después de la dosis 2 (día 42). Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 8.

Figura 8B: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India lactantes después de la inmunización con formulaciones seleccionadas descritas en la tabla 6 en comparación con PCV24 formulada con APA después de la dosis 1 (día 14). Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 8.

Figura 8C: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India lactantes después de la inmunización con formulaciones seleccionadas descritas en la tabla 6 en comparación con PCV24 formulada con APA después de la dosis 2 (día 42). Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 8.

Figura 8D: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India lactantes después de la inmunización con formulaciones seleccionadas descritas en la tabla 6 en comparación con PCV24 formulada con APA después de la dosis 3 (día 70). Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 8.

Figura 9: Los ratones inmunizados con PCV24 con composiciones de formulación (CLA-SNE; CLA-LNP; y SNE) están protegidos de la exposición intratraqueal al serotipo 24F de *Streptococcus pneumoniae*. Véase el ejemplo 9.

Figura 10A-10D: Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) de formulaciones de CLA-SNE y SNE almacenadas a 4 °C y 37 °C durante 1 mes (figura 10A: CLA-SNE [6 mg/ml de CLA y 30 mg/ml de escualeno]; figura 10B: SNE [40 mg/ml de escualeno]; figura 10C: CLA-SNE [4 mg/ml de CLA y 4 mg/ml de escualeno]; y figura 10D: SNE [8 mg/ml de escualeno]). Véase el ejemplo 10.

Figura 11A-11D: Dispersión de luz dinámica (DLS) de formulaciones CLA-SNE y SNE almacenadas a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante 1 mes (figura 11A: CLA-SNE [6 mg/ml de CLA y 30 mg/ml de escualeno]; figura 11B: CLA-SNE [4 mg/ml de CLA y 4 mg/ml de escualeno]; figura 11C: SNE [40 mg/ml de escualeno]; y figura 11D: SNE [8 mg/ml de escualeno]). Véase el ejemplo 10.

Figura 12A: Concentración de CLA (mg/ml) medida por UPLC-CAD para formulaciones de CLA-SNE y SNE almacenadas a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante 1 mes. Véase el ejemplo 11.

Figura 12B: Concentración de escualeno (mg/ml) medida por UPLC-CAD para

formulaciones de CLA-SNE y SNE almacenadas a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante 1 mes. Véase el ejemplo 11.

Figura 13A: Estabilidad específica de serotipo de coformulaciones de conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora preparadas con CLA-SNE (CLA

5 1,2 mg/ml escualeno 6,5 mg/ml) y almacenadas a 4 °C durante 1 mes. Véase el ejemplo 12.

Figura 13B: Estabilidad específica de serotipo de coformulaciones de conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora preparadas con CLA-SNE (CLA

1,2 mg/ml escualeno 1,2 mg/ml) y almacenadas a 4 °C durante hasta 1 mes. Véase el ejemplo 12.

Figura 13C: Estabilidad específica de serotipo de coformulaciones de conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora preparadas con SNE (escualeno

10 6,5 mg/ml) y almacenadas a 4 °C durante 1 mes. Véase el ejemplo 12.

Figura 13D: Estabilidad específica de serotipo de coformulaciones de conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora preparadas con SNE (escualeno 0,4 mg/ml) y almacenadas a 4 °C durante 1 mes. Véase el ejemplo 12.

15 Figura 14A: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India adultos después de la inmunización con PCV21 formulada con CLA-SNE en comparación con PCV21 (sin adyuvante) después de la dosis 1 (día 14) [denominada D14PD1: cuadrados]. Una dosis de 0,25 ml de PCV21 (4 µg/ml por ST) formulada con CLA-SNE (CLA-SNE 1200 µg/ml) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con una dosis de 0,25 ml

20 de PCV21 (4 µg/ml por ST) en D14PD1. Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 13.

Figura 14B: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India adultos después de la inmunización con PCV21 formulada con CLA-SNE en comparación con PCV21 (sin adyuvante) después de la dosis 1 (día 28) [denominada D28PD1: cuadrados].

25 Una dosis de 0,25 ml de PCV21 (4 µg/ml por ST) formulada con CLA-SNE (CLA-SNE 1200 µg/ml) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con una dosis de 0,25 ml de PCV21 (4 µg/ml por ST) en D28PD1. Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 13.

Figura 14C: Relación de títulos de IgG específicos de serotipo en macacos de la India adultos después de la inmunización con PCV21 formulada con CLA-SNE en comparación con PCV21 (sin adyuvante) después de la dosis 2 (día 42) [denominada D42PD2: cuadrados].

Una dosis de 0,25 ml de PCV21 (4 µg/ml por ST) formulada con CLA-SNE (CLA-SNE 1200 µg/ml) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con una dosis de 0,25 ml de PCV21 (4 µg/ml por ST) en D42PD2. Se incluyen datos de los serotipos 6C y 15B para evaluar la reactividad cruzada. Véase el ejemplo 13.

5 Figura 15A: El % de CLA/escualeno (p/p) después de la diálisis se representa frente al % "diana" (p/p) antes del autoensamblaje. Las relaciones de % p/p de CLA/escualeno (X) se midieron mediante UPLC-CAD de fase inversa antes y después del autoensamblaje y la diálisis con nanoemulsión. Véase el ejemplo 14.

10 Figura 15B: Los diámetros medidos de DLS Z promedio ponderados por intensidad de las nanopartículas de CLA-SNE después de la diálisis (X) se representan frente al % de CLA/escualeno medido (p/p) después de la diálisis para cada una de las formulaciones de MNS. Véase el ejemplo 14.

15 Figura 15C: El potencial Zeta medido de las nanopartículas de escualeno CLA-SNE (X) después de la diálisis a pH 5,5 se representa frente al % de CLA/escualeno medido (p/p) después de la diálisis para cada una de las formulaciones preparadas de MNS. Véase el ejemplo 14.

Figura 16. Diámetros de DLS Z-promedios de las muestras de CLA-SNE formadas y procesadas con fase acuosa (L-histidina 20 mM) de valores de pH crecientes. Véase el ejemplo 15.

20 Figura 17. [CLA] final (mg/ml) de muestras de CLA-SNE formadas y procesadas con fase acuosa (L-histidina 20 mM) de valores de pH crecientes. Véase el ejemplo 15.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Sorprendentemente, se descubrió que una composición neumocócica conjugada que comprende una formulación adyuvante de nanoemulsión estable (SNE) (con o sin un lípido catiónico) proporcionó una respuesta inmunogénica comparable o mejorada en relación con una composición neumocócica conjugada que comprende un adyuvante de aluminio y/o una composición neumocócica conjugada que comprende un adyuvante LNP.

30 La presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una nanoemulsión estable (SNE).

La presente invención proporciona además una composición neumocócica

conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende un emulsionante y/o un solubilizante y/o un tensioactivo y opcionalmente un lípido catiónico, o mezclas de los mismos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende tensioactivos y/o terpenos o mezclas de los mismos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende tensioactivos y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende uno o más tensioactivos y uno o más terpenos y opcionalmente uno o más lípidos catiónicos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende entre uno y tres tensioactivos y entre uno y tres terpenos y opcionalmente entre uno y tres lípidos catiónicos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende entre uno y dos tensioactivos y entre uno y dos terpenos y opcionalmente entre uno y dos lípidos catiónicos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80), escualeno y un lípido catiónico opcional.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20), escualeno y un lípido catiónico opcional.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80), escualeno y un lípido catiónico.

5 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20), escualeno y un lípido catiónico.

10 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80), escualeno y el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina.

15 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, en donde la SNE comprende trioleato de sorbitán (SPAN-85), polisorbato-20 (PS-20), escualeno y el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina.

20 La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional. En algunas realizaciones, la vacuna neumocócica conjugada no contiene un lípido catiónico.

25 La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional. En algunas realizaciones, la vacuna neumocócica conjugada no contiene un lípido catiónico.

30 La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y iv) un lípido catiónico.

La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada

que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y iv) un lípido catiónico.

La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y iv) (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina.

La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y iv) (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina.

La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y iv) un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico no está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

La presente invención proporciona además una vacuna neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y iv) un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico no está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada, como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición comprende el lípido catiónico CLA, CLX o CLY.

En una realización, la composición comprende el lípido catiónico CLA.

En una realización, la composición comprende un lípido catiónico seleccionado de DLinDMA, DLinKC2DMA, DLin-MC3-DMA, CLinDMA y S-Octil CLinDMA.

En una realización, cada uno de los conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* en la composición comprende un polisacárido de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* particular, en donde los polisacáridos en los conjugados comprenden uno o más serotipos seleccionados de cualquier serotipo conocido,

incluyendo, pero sin limitación, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F y 38. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B,

24F, 31, 33F y 35B.

En una realización, los conjugados de polisacárido-proteína transportadora comprenden polisacáridos que se seleccionan de un grupo de serotipos neumocócicos que consisten en los serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A y 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F o 38. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos consiste en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína

transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y cualquiera de las nanoemulsiones estables (SNE) descritas en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

5 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

10 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

15 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

20 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

25 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

30 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente

documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

En una realización, la presente invención proporciona una composición
 5 neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B.

10 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B,
 15 24F, 31, 33F y 35B.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE como se describe en el presente documento, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos
 20 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
 25 *pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
 30 *pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la

proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*

pneumoniae consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

5 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además
10 comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
15 *pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición
20 neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85);
25 polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y un lípido catiónico.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
30 *pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de

sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*

pneumoniae consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y el lípido catiónico CLA.

En una realización de las composiciones anteriores, la SNE comprende PS-20. En otra realización de las composiciones anteriores, la SNE comprende PS-80

En una realización de las composiciones anteriores, las composiciones no comprenden conjugados de polisacárido-proteína transportadora que contengan polisacáridos de cualquier otro serotipo de *Streptococcus pneumoniae*.

En una realización de las composiciones de la invención, la proteína transportadora se selecciona de OMPC, PhtD, pLys, TD (toxoides diftérico), TT (toxoides tetánico), fragmento C de TT, toxoide tosferínico, toxoide del cólera y CRM197. En otra realización, la proteína transportadora es CRM197.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además histidina 5 mM - 40 mM a pH 5,1 - 7,0 y NaCl 25 mM - 300 mM.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además aproximadamente histidina 20 mM a aproximadamente pH 5,8 y NaCl aproximadamente 75 mM.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además histidina 20 mM a pH 5,8 y NaCl 75 mM.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además histidina 5 mM - 40 mM a pH 5,1 - 7,0, PS-20 o PS-80 0,0125 % - 0,2 % y NaCl 25 mM - 300 mM.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además aproximadamente histidina 20 mM a aproximadamente pH 5,8, PS-20 o PS-80 0,05 % y NaCl aproximadamente 75 mM.

La presente invención proporciona las composiciones anteriores que comprenden además histidina 20 mM a pH 5,8, PS-20 o PS-80 0,05 % y NaCl 75 mM.

La presente invención también proporciona un método para preparar una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional.

La presente invención también proporciona un método para preparar una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico

opcional.

La presente invención también proporciona un método de preparación de una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE.

5 La presente invención también proporciona métodos de tratamiento o prevención de enfermedades neumocócicas con una composición neumocócica conjugada de la presente invención.

La presente invención también proporciona un uso de la composición neumocócica conjugada de la presente invención para el tratamiento o prevención de
10 enfermedades neumocócicas.

DEFINICIONES

Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos
15 que el contexto dicte claramente lo contrario.

Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, se aplicarán las siguientes abreviaturas y definiciones:

APA	adyuvante de fosfato de aluminio
CLA	((13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina)
20 DMSO	dimetilsulfóxido
ECL	electroquimioluminiscencia
GMT	título medio geométrico
HPSEC	cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento
ID	intradérmico
25 IM	intramuscular
LNP	nanopartícula lipídica
LOS	lipooligosacárido
LPS	lipopolisacárido
ME	microemulsión
30 MNS	autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos
Pm	peso molecular
NE	nanoemulsión
PCPMN	punto de corte de peso molecular nominal

	OPA	ensayo opsonofagocítico
	PCV	vacuna conjugada neumocócica
	PD1	después de la dosis 1
	PD2	después de la dosis 2
5	PD3	después de la dosis 3
	PHE	emulsión prehomogeneizada
	PnPs	polisacárido neumocócico
	Ps	polisacárido
	PS-20	polisorbato-20
10	PS-80	polisorbato-80
	SNE	nanoemulsión estable
	SPAN-85	trioleato de sorbitán
	ST6B o ST-6B	serotipo 6B
	p/v	peso por volumen

15

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en el presente documento en referencia a un valor, se refiere a un valor que es el mismo que o, en el contexto, es similar al valor indicado. En general, los expertos en la materia, familiarizados con el contexto, apreciarán la cantidad absoluta y/o el grado relativo de diferencia abarcado por "aproximadamente" en ese contexto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término "aproximadamente" puede abarcar una serie de valores que están en un intervalo del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos del valor indicado.

Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a una cadena lineal, hidrocarburo alifático insaturado cíclico o ramificado que tiene el número especificado de átomos de carbono. En una realización, un grupo alquenilo contiene de 8 a 24 átomos de carbono (alquenilo C₈-C₂₄). En una realización, un grupo alquenilo es lineal. En otra realización, un grupo alquenilo es ramificado. En otra realización, el grupo alquenilo no está sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena lineal, hidrocarburo alifático saturado cíclico o ramificado que tiene el número especificado de átomos de carbono. En una realización, un grupo alquilo tiene de 8 a 24 átomos de carbono (alquilo C₈-C₂₄). En una realización, un grupo alquilo es lineal. En otra realización,

un grupo alquilo es ramificado. En otra realización, el grupo alquilo no está sustituido.

Un "adyuvante", como se define en el presente documento, es una sustancia que sirve para mejorar (p. ej., aumentar, acelerar, prolongar o modular) la inmunogenicidad de una composición de la invención. Como se desvela en el presente documento, se va a usar una SNE como adyuvante de acuerdo con la presente invención. Un adyuvante puede mejorar una respuesta inmunitaria a un antígeno que es débilmente inmunogénico cuando se administra solo, p. ej., sin inducir títulos de anticuerpos o induciendo títulos de anticuerpos débiles o una respuesta inmunitaria mediada por células, aumentar los títulos de anticuerpos contra el antígeno y/o reduce la dosis del antígeno eficaz para lograr una respuesta inmunitaria en el individuo.

Como se usa en el presente documento, una "composición adyuvante" es una composición que comprende un adyuvante.

Como se usa en el presente documento, el término "administración" se refiere al acto de proporcionar un agente activo, composición o formulación a un sujeto. Pueden ser ejemplos de vías de administración al cuerpo humano a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalante), rectal, vaginal, mucosa oral (bucal), oído, por inyección (p. ej., por vía intravenosa (IV), subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, intramuscular (IM), intradérmica (ID), etc.) y similares.

El término "antígeno" se refiere a cualquier antígeno que pueda generar una o más respuestas inmunitarias. El antígeno puede ser una proteína (incluyendo proteínas recombinantes), polipéptido o péptido (incluyendo péptidos sintéticos). En determinadas realizaciones, el antígeno es un lípido o un carbohidrato (polisacárido). En determinadas realizaciones, el antígeno es un extracto de proteína, célula (incluyendo célula tumoral) o tejido. El antígeno puede ser uno que genere una respuesta inmunitaria humoral y/o CTL. Los antígenos de la presente invención son polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*.

La expresión "lípido catiónico" se refiere a una especie de lípido que porta una carga neta positiva a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Se puede utilizar un lípido catiónico como ingrediente en una formulación adyuvante de SNE de múltiples componentes. Los expertos en la materia apreciarán que los lípidos catiónicos pueden incluir, pero sin limitación, los desvelados en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US2008/0085870, US2008/0057080, US2009/0263407, US2009/0285881, US2010/0055168, US2010/0055169, US2010/0063135, US2010/0076055, US2010/0099738, US2010/0104629, US2013/0017239 y US2016/0361411, las publicaciones de solicitud internacional PCT n.º WO2011/022460, WO2012/040184, WO2011/076807, WO2010/021865, WO 2009/132131,

WO2010/042877, WO2010/146740 y WO2010/105209, y las patentes de los Estados Unidos n.º US5.208.036, US5.264.618, US5.279.833, US5.283.185, US6.890.557 y US9.669.097.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" se refiere a una formulación que contiene un principio activo farmacéutico o biológico (por ejemplo, un conjugado neumocócico de polisacárido-proteína transportadora y una SNE), junto con uno o más componentes adicionales. El término "composición" se usa indistintamente con "composición farmacéutica" y "formulación". Las composiciones pueden ser líquidas o sólidas (p. ej., liofilizadas). Los componentes adicionales que pueden incluirse según corresponda incluyen excipientes, aditivos, diluyentes, tampones, azúcares, aminoácidos, agentes quelantes, tensioactivos, polioles, agentes de carga, estabilizadores, lioprotectores, solubilizantes, emulsionantes, sales, adyuvantes, agentes potenciadores de la tonicidad, vehículos de suministro y conservantes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones no son tóxicas para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

El término "comprende" cuando se usa con la composición de la invención se refiere a la inclusión de cualquier otro componente, tales como adyuvantes y excipientes, o la adición de uno o más conjugados de polisacárido-proteína transportadora que no se enumeran específicamente.

La expresión "que consiste en" o "consiste en" cuando se usa con la formulación o las formulaciones conjugadas multivalentes de polisacárido-proteína transportadora se refiere a una formulación que tiene esos conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y ningún otro conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente.

Las expresiones "consiste esencialmente en", y variaciones tales como "consisten esencialmente en" o "que consiste esencialmente en", indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos enumerado y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos enumerados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificado.

Como se usa en el presente documento, el término "des-O-acetilado-15B" o "des-O-acetil-15B" o "des-O-Ac-15B" se refiere a un serotipo 15B des-O-acetilado en donde el contenido de O-acetilo es inferior al 5 % por unidad repetida. En otra realización, el contenido de O-acetilo es inferior al 1 % por unidad repetida. En otra realización, el contenido de O-acetilo es inferior al 0,5 % por unidad repetida. En otra realización, el contenido de O-acetilo es inferior al 0,1 % por unidad repetida. En la técnica se conocen procesos de des-O-acetilación, por ejemplo,

como se describe en Rajam *et al.*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14 (9): 1223–1227.

Como se usa en el presente documento, el término "dosis" significa una cantidad de un agente, IFA (ingrediente farmacéutico activo), formulación o composición tomada o recomendada para ser tomada en un momento particular.

5 Como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" o "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de un antígeno para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. La expresión "composición inmunogénica" se refiere a la capacidad de un agente, IFA, formulación o composición para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones de conjugado neumocócico de la presente invención son
10 composiciones inmunogénicas.

Los "que necesitan tratamiento" incluyen los previamente expuestos o infectados con *Streptococcus pneumoniae*, los que se vacunaron previamente contra *Streptococcus pneumoniae*, así como los propensos a tener una infección o cualquier persona en la que se desee una reducción de la probabilidad de infección, p. ej., las personas inmunodeprimidas, ancianos,
15 niños, adultos o personas sanas.

La expresión "indicada para la prevención de la enfermedad neumocócica" significa que una vacuna o composición está aprobada por una o más autoridades reguladoras, tales como la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos, para la profilaxis de una o más enfermedades causadas por cualquier serotipo de *Streptococcus pneumoniae*,
20 incluyendo, pero sin limitación: enfermedad neumocócica en general, neumonía neumocócica, meningitis neumocócica, bacteriemia neumocócica, enfermedad invasiva causada por *Streptococcus pneumoniae* y otitis media causada por *Streptococcus pneumoniae*.

Como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos que son ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser
25 insolubles en agua o tener baja solubilidad en agua pero pueden ser solubles en muchos disolventes orgánicos. Los lípidos se pueden dividir en al menos tres clases: (1) "lípidos simples", que incluyen, p. ej., grasas y aceites, así como ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen, p. ej., fosfolípidos y glucolípidos; y (3) "lípidos derivados", que incluyen, p. ej., esteroides.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "nanopartícula lipídica" (o "LNP") se refiere a una composición lipídica que forma una partícula que tiene una medida de longitud o anchura (p. ej., una medida de longitud o anchura máxima) entre 10 y 1000 nanómetros y comprende más de una clase y/o tipo de lípido. Por ejemplo, según la presente

invención, una nanopartícula lipídica no puede estar compuesta únicamente por lípidos catiónicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "lípidos neutros" se refiere a una especie de lípidos que existe en forma de ion bipolar neutro o sin carga a un pH

5 seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilglicerol.

Un "paciente" (denominado de otro modo en el presente documento "sujeto") se refiere a un mamífero capaz de infectarse con *Streptococcus pneumoniae*. En realizaciones preferidas, el paciente es un ser humano. Un paciente puede tratarse de forma profiláctica o terapéutica. El tratamiento profiláctico proporciona suficiente inmunidad protectora para reducir la probabilidad o gravedad de una infección neumocócica o los efectos de la misma, p. ej., neumonía neumocócica. Se puede realizar un tratamiento terapéutico para reducir la gravedad o prevenir la reaparición de una infección por *Streptococcus pneumoniae* o los efectos clínicos de la misma. El tratamiento profiláctico se puede realizar usando una composición neumocócica conjugada o vacuna de la invención, como se describe en el presente documento. Las composiciones de conjugados neumocócicos o las vacunas de la invención se pueden administrar a la población general o a las personas con un mayor riesgo de infección neumocócica, por ejemplo, los ancianos o las personas que viven con ancianos o cuidan de ellos.

20 "PCV1", como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna conjugada neumocócica monovalente o composición que comprende un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora. En realizaciones específicas, la proteína transportadora es CRM197.

25 "PCV13", como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada de 13 serotipos o composición que comprende trece conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo cada uno polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora, en donde los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* son: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En realizaciones específicas, la proteína transportadora de cada uno de los conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* es CRM197.

"PCV21", como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada de 21 serotipos o composición que comprende veinte conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo cada uno polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora, en donde los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* son: 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, y uno de los siguientes serotipos del serogrupo 15: 15B, 15C o des-O-acetilado-15B. En una realización particular, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo 15C o des-O-acetilado-15B. En otra realización, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo des-O-acetilado-15B. En realizaciones específicas, la proteína transportadora de uno o más de los conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* es CRM197. En realizaciones adicionales, la proteína transportadora de cada uno de conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* es CRM197.

"PCV24", como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada de 24 serotipos o composición que comprende veintitrés conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, comprendiendo cada uno polisacárido capsular de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora, en donde los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* son: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, y uno de los siguientes serotipos del serogrupo 15: 15B, 15C o des-O-acetilado-15B. En una realización particular, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo 15C o des-O-acetilado-15B. En otra realización, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo des-O-acetilado-15B. En realizaciones específicas, la proteína transportadora de uno o más de los conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* es CRM197. En realizaciones adicionales, la proteína transportadora de cada uno de conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* es CRM197.

Con respecto a un vehículo, diluyente o excipiente de una composición farmacéutica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que un vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial para el receptor de la misma.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "conjugado neumocócico" o "conjugado neumocócico de polisacárido-proteína transportadora" se refieren a un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vacuna neumocócica conjugada" (o "PCV") es una preparación o composición farmacéutica que comprende conjugado o conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora que proporcionan inmunidad activa a enfermedades o afecciones patológicas causadas por un serotipo o serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "nanoemulsión estable" o "SNE" se refieren a una formulación de emulsionantes y/o solubilizantes y/o tensioactivos y/o lípidos que tienen propiedades adyuvantes en una vacuna neumocócica conjugada.

Específicamente, la SNE se refiere a una formulación adyuvante de SNE que comprende 1) trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20); 3) escualeno; y un 4) lípido catiónico opcional.

Los "tensioactivos" son ingredientes estabilizadores en una formulación adyuvante de SNE de múltiples componentes e incluyen los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (habitualmente denominados Tweens, especialmente PS-20 y PS-80), copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), comercializado con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros lineales en bloque de OE/OP (poloxámeros); octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetidos, siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos habitualmente como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span-85, Tween-85 o [2-[(2R,3S,4R)-4-hidroxi-3-[(Z)-octadec-9-enoil]oxioxolan-2-il]-2-[(Z)-octadec-9-enoil]oxietil] (Z)-octadec-9-enoato) y monolaurato de sorbitán. En una realización, los tensioactivos son ésteres de sorbitán y poloxámeros. En una realización, los tensioactivos son polisorbato-20 (PS-20) y polisorbato-80 (PS-80).

Los "terpenos" son ingredientes estabilizadores en una formulación adyuvante de SNE de múltiples componentes e incluyen, pero sin limitación: monoterpenos, incluyendo geraniol, terpineol, limoneno, mirceno, linalool y pineno; sesquiterpenos, incluyendo humuleno, farnesenos y farnesol; diterpenos, incluyendo cafestol, kahweol, cembreno y taxadieno; triterpenos incluyendo escualeno y escualante; tetraterpenos, incluyendo licopeno acíclico, gamma-caroteno monocíclico, alfa y beta-carotenos bicíclicos; politerpinas y norisopredoides.

En una realización, un terpeno es el escualeno.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la composición o vacuna suficiente para producir el efecto terapéutico deseado en un ser humano o animal, por ejemplo, la cantidad necesaria para inducir una respuesta inmunitaria, tratar, curar, prevenir o inhibir la aparición y progresión de una enfermedad o los síntomas de la misma y/o la cantidad necesaria para aliviar los síntomas o causar la regresión de una enfermedad. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o vacuna determinada.

Como se usa en el presente documento, el término "valente" se refiere a la presencia de un número específico de conjugados de polisacárido-proteína transportadora en una composición.

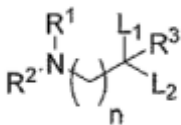
Como se usa en el presente documento, la expresión "vacuna" o "composición de vacuna" se refiere a una preparación biológica usada para estimular la producción de anticuerpos y proporcionar inmunidad contra una enfermedad infecciosa.

Lípidos catiónicos

Son bien conocidos en la técnica lípidos catiónicos y métodos para preparar lípidos catiónicos.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico incluye cualquier lípido catiónico mencionado en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US 2008/0085870, US 2008/0057080, US 2009/0263407, US 2009/0285881, US 2010/0055168, US 2010/0055169, US 2010/0063135, US 2010/0076055, US 2010/0099738, US 2010/0104629, US 2013/0017239 y US 2016/0361411, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2011/022460 A1; WO2012/040184, WO2011/076807, WO2010/021865, WO 2009/132131, WO2010/042877, WO2010/146740, WO2010/105209 y en la patente de los Estados Unidos n.º 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833, 5.283.185, 6.890.557 y 9.669.097.

En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos de la presente invención tienen la siguiente estructura, ilustrada por la fórmula 1:



Fórmula 1

en donde:

R¹ y R² son cada uno metilo;

R³ es H;

n es 1 o 2;

5 L₁ se selecciona de alquilo C₈-C₂₄ y alqueno C₈-C₂₄; y

L₂ se selecciona de alquilo C₄-C₉ y alqueno C₄-C₉;

o cualquier sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Un lípido catiónico puede ser un lípido aminoalquílico.

Un lípido catiónico puede ser un lípido aminoalquílico asimétrico.

10 En una realización de la presente invención, el lípido catiónico es (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (CLA); o (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-dimetilpentatriaconta-6,9,26,29-tetraen-18-amina (CLX); o N,N-dimetil-1-((1S,2R)-2-octilciclopropil)heptadecan-8-amina (CLY).

En otra realización de la presente invención, el lípido catiónico se selecciona de:

15 DLinDMA;

DLinKC2DMA;

DLin-MC3-DMA;

CLinDMA;

S-Octil CLinDMA;

20 (2S)-1-{7-[(3P)-colest-5-en-3-ilo]heptilo}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-ilo]-N,N-dimetilpropan-2-amina;

(2R)-1-{4-[(3P)-colest-5-en-3-ilo]buto}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-ilo]-N,N-dimetilpropan-2-amina;

1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]buto}-3-(octilo)propan-2-il]guanidina;

25 1-[(2R)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]heptilo}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]propan-2-amina;

1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]buto}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]propan-2-amina;

(2S)-1-({6-[(3P)-colest-5-en-3-ilo]hexil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-

30 iloxi]propan-2-amina;

(3β)-3-{6-[(2S)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-ilo]il]-2-(pirrolidin-1-il)propil}oxi}hexil}oxi]colest-5-eno;

(2R)-1-{4-[(3P)-colest-5-en-3-ilo]buto}-3-(octilo)propan-2-amina;

- (2R)-1-({8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil} oxi)-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina; (2R)-1-({8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil} oxi)-3-(heptiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina; (2R)-1-({8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil} oxi)-N,N-dimetil-3-[(2Z)-pent-2-en-1-iloxi]propan-2-amina; (2S)-1-butoxi-3-({8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil} oxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina;
- 5 (2S)-1-({8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil} oxi)-3-[2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexadecafluorononil]oxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina;
- 2-amino-2-{[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metil}propan-1,3-diol;
- 2-amino-3-({9-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-iloxi]nonil} oxi)-2-{[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metil}propan-1-ol;
- 10 2-amino-3-({6-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-iloxi]nonil} oxi)-2-{[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]metil}propan-1-ol;
- (20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-20,23-dien-10-amina;
- (17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa-17,20-dien-9-amina;
- (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-8-amina;
- 15 (13Z,16Z)-N,N-dimetildocosa-13,16-dien-5-amina;
- (12Z,15Z)-N,N-dimetilhenicosa-12,15-dien-4-amina;
- (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14,17-dien-6-amina;
- (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-7-amina;
- (18Z,21 Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-10-amina;
- 20 (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-5-amina;
- (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14,17-dien-4-amina;
- (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-9-amina;
- (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-8-amina;
- (17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa-17,20-dien-7-amina;
- 25 (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-6-amina;
- (22Z,25Z)-N,N-dimetilhentriaconta-22,25-dien-10-amina;
- (21 Z,24Z)-N,N-dimetiltriaconta-21,24-dien-9-amina;
- (18Z)-N,N-dimetilheptacos-18-en-10-amina;
- (17Z)-N,N-dimetilhexacos-17-en-9-amina;
- 30 (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-7-amina;
- N,N-dimetilheptacosan-10-amina;
- (20Z,23Z)-N-etil-N-metilnonacosa-20,23-dien-10-amina;
- 1-[(1 lZ,14Z)-l-nonilicosa-1 l,14-dien-1-il]pirrolidina;

- (20Z)-N,N-dimetilheptacos-20-en-10-amina;
 (15Z)-N,N-dimetilheptacos-15-en-10-amina;
 (14Z)-N,N-dimetilnonacos-14-en-10-amina;
 (17Z)-N,N-dimetilnonacos-17-en-10-amina;
 5 (24Z)-N,N-dimetiltritriacont-24-en-10-amina;
 (20Z)-N,N-dimetilnonacos-20-en-10-amina;
 (22Z)-N,N-dimetilhentriacont-22-en-10-amina;
 (16Z)-N,N-dimetilpentacos-16-en-8-amina;
 (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12,15-dien-1-amina;
 10 (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina;
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptadecan-8-amina;
 1-[(1S,2R)-2-hexilciclopropil]-N,N-dimetilnonadecan-10-amina;
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]nonadecan-10-amina;
 N,N-dimetil-21-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]henicosan-10-amina;
 15 N,N-dimetil-1-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-pentilciclopropil]metil]ciclopropil]nonadecan-10-amina;
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]hexadecan-8-amina;
 N,N-dimetil-1-[(1R,2S)-2-undecilciclopropil]tetradecan-5-amina;
 N,N-dimetil-3-{7-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptil}dodecan-1-amina;
 1-[(1R,2S)-2-heptilciclopropil]-N,N-dimetiloctadecan-9-amina;
 20 1-[(1S,2R)-2-decilciclopropil]-N,N-dimetilpentadecan-6-amina;
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]pentadecan-8-amina; y
 (11E,20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-11,20,23-trien-10-amina;
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un estereoisómero de cualquiera de los anteriores.

- 25 En otra realización de la presente invención, el lípido catiónico se selecciona de (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización de la presente invención, el lípido catiónico es (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (CLA).

- 30 La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición que comprende conjugados neumocócicos y 3 componentes de SNE 1) trioleato de sorbitán (SPAN-85); 2) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80) y 3) escualeno.

En algunas realizaciones, la SNE comprende 32-97 % molar de escualeno, 1-

34 % molar de SPAN-85 y 1-34 % molar de PS-20 o PS-80.

En algunas realizaciones, la SNE comprende 86-98 % molar de escualeno, 1-7 % molar de SPAN-85 y 1-7 % molar de PS-20 o PS-80.

En algunas realizaciones, la SNE comprende 92-94 % molar de escualeno, 3-4 % molar de SPAN-85 y 3-4 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización de la invención, la SNE comprende 92,91 % molar de escualeno, 3,98 % molar de SPAN-85 y 3,11 % molar de PS-20 o PS-80.

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una composición que comprende conjugados neumocócicos y 4 componentes de SNE 1) un lípido catiónico; 2) trioleato de sorbitán (SPAN-85); 3) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80) y 4) escualeno. Una composición de SNE particular comprende el lípido catiónico (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina ("CLA" o, cuando el lípido catiónico está incluido en la SNE, "CLA-SNE").

En algunas realizaciones, la SNE comprende 1-60 % molar de lípido catiónico, 32-97 % molar de escualeno, 1-4 % molar de SPAN-85 y 1-4 % molar de PS-20 o PS-80.

En algunas realizaciones, la SNE comprende 10-14 % molar de lípido catiónico, 78-84 % molar de escualeno, 1-6 % molar de SPAN-85 y 1-6 % molar de PS-20 o PS-80.

En algunas realizaciones, la SNE comprende 40-46 % molar de lípido catiónico, 44-52 % molar de escualeno, 1-8 % molar de SPAN-85 y 1-8 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización de la invención, la SNE comprende 13,82 % molar de lípido catiónico, 80,07 % molar de escualeno, 3,43 % molar de SPAN-85 y 2,68 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización de la invención, la SNE comprende 44,5 % molar de lípido catiónico, 51,56 % molar de escualeno, 2,21 % molar de SPAN-85 y 1,72 % molar de PS-20 o PS-80.

En algunas realizaciones de la invención, la SNE comprende además uno o más lípidos no catiónicos que pueden seleccionarse de un tensioactivo, una mezcla de tensioactivos, un fosfolípido, un terpeno, un terpenoide, un triterpeno o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el tensioactivo puede incluir, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (denominados habitualmente Tween), especialmente PS-20 y PS-80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), comercializado con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros lineales en bloque de OE/OP; octoxinóles, que pueden variar en el número de

grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetidos, siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos habitualmente como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span-85, Tween-85 o [2-[(2*R*,3*S*,4*R*)-4-hidroxi-3-[(*Z*)-octadec-9-enoil]oxioxolan-2-il]-2-[(*Z*)-octadec-9-enoil]oxietil] (*Z*)-octadec-9-enoato) y monolaurato de sorbitán.

En algunas realizaciones, se pueden usar mezclas de tensioactivos, p. ej., mezclas de PS-20/Span 85 o PS-80/Span 85. También son adecuadas una combinación de un éster de polioxietilensorbitán tal como monooleato de polioxietilensorbitán (PS-80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauromacrogol 9 más un éster de polioxietilensorbitán y/o un octoxinol.

En algunas realizaciones, las cantidades preferidas de tensioactivos o emulsionantes son: ésteres de polioxietilensorbitán (tales como PS-20 o PS-80) 0,01 a 10 % molar, en particular de aproximadamente 1 a 4 % molar; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) de 0,001 a 10 % molar, en particular de aproximadamente 1 a 4 % molar; p/v, en particular de 0,01 a 0,1 % p/v; éteres de polioxietileno (tales como lauromacrogol 9) de 0,1 a 20 % molar, preferentemente de 0,5 a 10 % molar y, en particular, de 1 a 4 % molar o aproximadamente 10 % en masa.

En algunas realizaciones, el fosfolípido puede incluir, pero sin limitación, fosfolípidos naturales, incluyendo fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (fosfatidato) (AP), dipalmitoilfosfatidilcolina, monoacilfosfatidilcolina (liso PC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), N-acil-PE, fosfoinosítidos y fosfoesfingolípidos. Los derivados de fosfolípidos incluyen ácido fosfatídico (DMPA, DPPA, DSPA), fosfatidilcolina (DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, DEPC), fosfatidilglicerol (DMPG, DPPG, DSPG, POPG), fosfatidiletanolamina (DMPE, DPPE, DSPE, DOPE), fosfatidilserina (DOPS). Los ácidos grasos incluyen C14:0, ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3) y ácido araquidónico (C20:4), C20:0, C22:0 y lecitina. En determinadas realizaciones de la invención, el fosfolípido puede ser fosfatidilserina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

(DMPC), dilauroilfosfatidilcolina (DLPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicerol-3-fosfolina o 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DOPC).

En algunas realizaciones, la terpena puede incluir, pero sin limitación, monoterpenos incluyendo geraniol, terpineol, limoneno, mirceno, linalool o pineno;

5 sesquiterpenos incluyendo humuleno, farnesenos, farnesol; diterpenos incluyendo cafestol, kahweol, cembreno y taxadieno, triterpenos incluyendo escualeno y escualante; tetraterpenos incluyendo licopeno acíclico, el gamma-caroteno monocíclico y los alfa y betacarotenos bicíclicos; politerpenos y norisoprenoides. En algunas realizaciones, la terpena es escualeno.

10 En una realización de la invención, la SNE comprende 50-85 % molar de escualeno y 1-10 % molar de tensioactivos no iónicos. En un aspecto de esta realización, el tensioactivo no iónico comprende una mezcla de PS-20 y SPAN-85 o una mezcla de PS-80 y SPAN-85.

En una realización de la invención, la SNE comprende 0-45 % molar de lípido catiónico, 50-85 % molar de escualeno y 1-10 % molar de tensioactivos no iónicos. En un
15 aspecto de esta realización, el tensioactivo no iónico comprende una mezcla de PS-20 y SPAN-85 o una mezcla de PS-80 y SPAN-85.

Métodos generales para fabricar SNE (con y sin un lípido catiónico)

20 En general, pueden formarse SNE, por ejemplo, combinando y mezclando inicialmente componentes lipídicos entre sí o utilizando inicialmente un solo lípido, tal como un lípido catiónico. Una vez mezclados e integrados (al combinar y mezclar componentes lipídicos entre sí), se añade un tampón acuoso y se mezcla con el lípido o los componentes lipídicos
25 combinados se someten primero a una homogeneización gruesa seguida de una homogeneización fina. A continuación, la formulación resultante se somete a una etapa de filtración final y se almacena a 4 °C. Una solución lipídica puede incluir uno o más lípidos catiónicos, uno o más terpenos (p. ej., escualeno), uno o más tensioactivos a base de sorbitán (p. ej., PS-20 o PS-80; SPAN-85) en relaciones molares específicas.

30

Métodos generales de fabricación de LNP

Las LNP y los métodos para fabricar LNP son bien conocidos en la técnica. Las LNP son conocidas

y se describen en las siguientes publicaciones: US 7.691.405, US2006/0083780, US2006/0240554, US2008/0020058, US2009/0263407, US2009/0285881, WO2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 y WO2010/054406.

5 Un proceso de preparación de una LNP consiste en 4 etapas principales: 1) preparación en solución de una mezcla de lípidos y un tampón acuoso; 2) formación de LNP mediante mezcla de corriente dividida; 3) ultrafiltración; y 4) filtración.

En general, los componentes lipídicos se disuelven en etanol antes de esterilizarlos por filtración para formar una mezcla lipídica. También se preparan varios
 10 tampones acuosos. Después, se combinan una mezcla de lípidos y corrientes de tampón usando un tubo en T o un mezclador en Y y, a continuación, inmediatamente después de la salida, se diluyen y se mezclan con un tampón acuoso para formar un intermedio de LNP. A continuación, se somete un intermedio de LNP a ultrafiltración tanto para concentrar el material como para diafiltrar el material contra un tampón adecuado para eliminar el etanol residual. Después de la
 15 diafiltración, se realiza una etapa de concentración final para lograr una concentración diana final. A continuación, la masa de LNP se filtra con un filtro esterilizador y se almacena congelada a -70 °C.

Composiciones de vacunas neumocócicas conjugadas

20 Se han desvelado previamente vacunas o composiciones neumocócicas conjugadas. Véanse los documentos WO2011/100151, WO2019/139692 y WO2020/131763.

Son polisacáridos capsulares bacterianos ilustrativos de *Streptococcus pneumoniae* los serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A y 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F o
 25 38.

Métodos generales para fabricar polisacáridos capsulares

Se han desvelado previamente métodos para fabricar composiciones de vacuna neumocócica conjugada. Véanse los documentos WO2011/100151, WO2019/139692 y
 30 WO2020/131763.

Los polisacáridos capsulares bacterianos, particularmente los que se han usado como antígenos, son adecuados para su uso en la invención y pueden identificarse fácilmente mediante métodos para identificar polisacáridos inmunógenos y/o antigénicos. Son polisacáridos

capsulares bacterianos ilustrativos de *Streptococcus pneumoniae* los serotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A y 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F o 38.

Los polisacáridos se pueden purificar mediante técnicas conocidas. Sin embargo, la invención no se limita a polisacáridos purificados de fuentes naturales y los polisacáridos pueden obtenerse por otros métodos, tales como síntesis total o parcial. Pueden prepararse polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los polisacáridos pueden aislarse de bacterias y pueden dimensionarse en cierta medida mediante métodos conocidos (véase, p. ej., patentes europeas n.º EP497524 y EP497525); y preferentemente por microfluidización realizada usando un homogeneizador o por hidrólisis química. Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* correspondientes a cada serotipo de polisacárido pueden cultivarse en un medio a base de soja. Los polisacáridos individuales pueden después purificarse mediante etapas convencionales incluyendo centrifugación, precipitación y ultrafiltración. Véanse, p. ej., publicación de solicitud de los Estados Unidos n.º 2008/0286838 y la patente de los Estados Unidos n.º 5.847.112. Los polisacáridos pueden dimensionarse para reducir la viscosidad y/o mejorar la capacidad de filtración y la uniformidad entre lotes de productos conjugados posteriores.

Los polisacáridos purificados se pueden activar químicamente para introducir funcionalidades capaces de reaccionar con una proteína transportadora usando técnicas convencionales. La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con una proteína transportadora se logran mediante los medios descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 4.365.170, 4.673.574 y 4.902.506. En resumen, el polisacárido neumocócico se hace reaccionar con un agente oxidante a base de peryodato, tal como peryodato de sodio, peryodato de potasio o ácido peryódico que da lugar a la escisión oxidativa de los grupos hidroxilo adyacentes para generar grupos aldehído reactivos. Los equivalentes molares adecuados de peryodato (p. ej., peryodato de sodio, metaperyodato de sodio y similares) incluyen de 0,05 a 0,5 equivalentes molares (relación molar de peryodato con respecto a unidad repetida de polisacárido) o de 0,1 a 0,5 equivalentes molares. La reacción de peryodato se puede variar de 30 minutos a 24 horas dependiendo de la conformación del diol (p. ej., dioles acíclicos, dioles *cis*, dioles *trans*), que controla la accesibilidad de los grupos hidroxilo reactivos al peryodato de sodio.

El término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato (IO^{4-}) como ortoperyodato (IO^{6-}) e incluye las diversas

sales de peryodato (p. ej., peryodato de sodio y peryodato de potasio). El polisacárido capsular puede oxidarse en presencia de metaperyodato o en presencia de peryodato de sodio (NaIO_4). Además, el polisacárido capsular se puede oxidar en presencia de ortoperyodato o en presencia de ácido peryódico.

5 Los polisacáridos purificados también se pueden conectar a un conector. Una vez activado o conectado a un conector, cada polisacárido capsular puede conjugarse por separado con una proteína transportadora para formar un glucoconjugado. Los conjugados de polisacáridos se pueden preparar mediante técnicas de acoplamiento conocidas.

10 El polisacárido se puede acoplar a un conector para formar un intermedio de polisacárido-conector en el que el extremo libre del conector es un grupo éster. Por lo tanto, el conector es uno en el que al menos un extremo es un grupo éster. El otro extremo se selecciona de modo que pueda reaccionar con el polisacárido para formar el intermedio de polisacárido-conector.

15 El polisacárido se puede acoplar a un conector usando un grupo de amina primaria en el polisacárido. En este caso, el conector normalmente tiene un grupo éster en ambos extremos. Esto permite que el acoplamiento tenga lugar haciendo reaccionar uno de los grupos éster con el grupo de amina primaria en el polisacárido mediante sustitución de acilo nucleófilo. La reacción da lugar a un intermedio de polisacárido-conector en el que el polisacárido se acopla al conector mediante un enlace amida. Por lo tanto, el conector es un conector bifuncional que
20 proporciona un primer grupo éster para reaccionar con el grupo de amina primaria en el polisacárido y un segundo grupo éster para reaccionar con el grupo de amina primaria en la molécula transportadora. Un conector típico es el diéster de N-hidroxisuccinimida del ácido adípico (SIDEA).

25 El acoplamiento también puede tener lugar de forma indirecta, es decir, con un conector adicional que se usa para derivatizar el polisacárido antes del acoplamiento al conector.

El polisacárido se puede acoplar al conector adicional usando un grupo carbonilo en el extremo reductor del polisacárido. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo carbonilo con el conector adicional; y (a2) hacer reaccionar el extremo libre del conector adicional con el conector. En estas realizaciones, el conector adicional normalmente
30 tiene un grupo de amina primaria en ambos extremos, lo que permite que tenga lugar la etapa (a1) haciendo reaccionar uno de los grupos de amina primaria con el grupo carbonilo en el polisacárido por aminación reductora. Se usa un grupo de amina primaria que es reactivo con el grupo carbonilo en el polisacárido. Son adecuados los grupos hidrazida o hidroxilamino. El

mismo grupo de amina primaria está normalmente presente en ambos extremos del conector adicional, lo que permite la posibilidad de acoplamiento del polisacárido (Ps)-Ps. La reacción da lugar a un intermedio de polisacárido-conector adicional en el que el polisacárido se acopla al conector adicional mediante un enlace de C—N.

- 5 El polisacárido se puede acoplar al conector adicional usando un grupo diferente en el polisacárido, particularmente un grupo carboxilo. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo con el conector adicional; y (a2) hacer reaccionar el extremo libre del conector adicional con el conector. En este caso, el conector adicional normalmente tiene un grupo de amina primaria en
- 10 ambos extremos, lo que permite que tenga lugar la etapa (a1) haciendo reaccionar uno de los grupos de amina primaria con el grupo carboxilo en el polisacárido por activación con EDAC. Se usa un grupo de amina primaria que es reactivo con el grupo carboxilo activado con EDAC en el polisacárido. Un grupo hidrazida es adecuado. El mismo grupo de amina primaria está presente normalmente en ambos extremos del conector adicional. La reacción da lugar a un intermedio de
- 15 polisacárido-conector adicional en el que el polisacárido se acopla al conector adicional mediante un enlace de amida.

Proteína transportadora

- En una realización particular de la presente invención, la CRM197 se usa como
- 20 proteína transportadora. La CRM197 es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica. La CRM197 puede aislarse de cultivos de *Corynebacterium diphtheria* cepa C7 (b197) cultivada en casaminoácidos y medio a base de extracto de levadura. Además, la CRM197 se puede preparar de forma recombinante de acuerdo con los métodos descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 5.614.382. Normalmente, la CRM197 se purifica mediante una combinación
- 25 de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la CRM197 se prepara en *Pseudomonas fluorescens* usando Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

- Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas adicionales tales como TD (toxoides diftérico), TT (toxoides tetánico) o fragmento C
- 30 de TT, toxoide tosferínico, toxoide del cólera (p. ej., como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas bacterianas de la membrana externa, tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión

a transferrina, proteína A de superficie neumocócica (PspA; véase la publicación de patente de solicitud internacional n.º WO 02/091998), proteína adhesina de superficie neumocócica (PsaA), peptidasa C5a del estreptococo del grupo A o del grupo B, o proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina neumocócica (Kuo *et al.*, 1995, Infect Immun 63; 2706-13) incluyendo ply destoxificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 04/081515) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (véanse las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 01/98334 y WO 03/54007). Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; véase, p. ej., patente europea n.º EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas, péptidos sintéticos (véanse las patentes europeas n.º EP0378881 y EP0427347), proteínas de choque térmico (véanse las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 93/17712 y WO 94/03208), proteínas tosferínicas (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 98/58668 y patente europea n.º EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4⁺ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (véase Falugi *et al.*, 2001, Eur J Immunol 31: 3816-3824) tales como la proteína N19 (véase Baraldoi *et al.*, 2004, Infect Immun 72: 4884-7), proteínas de absorción de hierro (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (véase la publicación de patente internacional n.º WO 00/61761) y flagelina (véase Ben-Yedidia *et al.*, 1998, Immunol Lett 64: 9) también se pueden usar como proteínas transportadoras.

Cuando se usan vacunas multivalentes, se puede usar un segundo vehículo para uno o más de los antígenos en una vacuna multivalente. La segunda proteína transportadora es preferentemente una proteína que no es tóxica ni reactogénica y que se puede obtener en cantidad y pureza suficientes. La segunda proteína transportadora también se conjuga o se une con un antígeno, p. ej., un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* para mejorar la inmunogenicidad del antígeno. Las proteínas transportadoras deben ser adecuadas para los procedimientos de conjugación convencionales. Cada polisacárido capsular no conjugado con una primera proteína transportadora se puede conjugar con la misma segunda proteína transportadora (p. ej., conjugándose cada molécula de polisacárido capsular con una única

proteína transportadora). Los polisacáridos capsulares no conjugados con una primera proteína transportadora se pueden conjugar con dos o más proteínas transportadoras (conjugándose cada molécula de polisacárido capsular con una única proteína transportadora). En dichas realizaciones, cada polisacárido capsular del mismo serotipo se conjuga normalmente con la misma proteína transportadora. Se pueden usar otros mutantes de TD como segunda proteína transportadora, tales como CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida *et al.*, 1973, J Biol Chem 218: 3838-3844); CRM9, CRM45 CRM102, CRM103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en la patente de los Estados Unidos n.º 4.709.017 o la patente de los Estados Unidos n.º 4.950.740; mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en la patente de los Estados Unidos n.º 5.917.017 o la patente de los Estados Unidos n.º 6.455.673; o fragmento desvelado en la patente de los Estados Unidos n.º 5.843.711.

15 *Conjugación por aminación reductora*

El acoplamiento covalente de polisacárido a la proteína transportadora se puede realizar mediante aminación reductora en la que un resto reactivo con amina en el polisacárido se acopla directamente a grupos de amina primaria (principalmente restos de lisina) de la proteína. Como es bien sabido, una reacción de aminación reductora se produce a través de un mecanismo de dos etapas. En primer lugar, un intermedio de base de Schiff, de fórmula $R-CH=N-R'$, se forma por reacción de un grupo aldehído en la molécula 1 ($R-CHO$) con un grupo de amina primaria ($R'-NH_2$) en la molécula 2. En la segunda etapa, la base de Schiff se reduce para formar un compuesto amino de fórmula $R-CH_2-NH-R'$. Aunque se pueden utilizar muchos agentes reductores, con más frecuencia se emplea un agente reductor muy selectivo tal como el cianoborohidruro de sodio ($NaCNBH_3$) ya que dichos reactivos reducirán específicamente solo la función imina de la base de Schiff.

Ya que todos los polisacáridos tienen una función aldehído al final de la cadena (función aldehído terminal), los métodos de conjugación que comprenden una aminación reductora del polisacárido se pueden aplicar de manera muy general y, cuando no hay otra función aldehído en la unidad de repetición (función aldehído intracatenaria), tales métodos permiten obtener conjugados en los que una molécula de polisacárido se acopla a una única molécula de proteína transportadora.

Un agente reductor habitual es la sal de cianoborohidruro, tal como

cianoborohidruro de sodio. El agente reductor selectivo de imina que se emplea normalmente es cianoborohidruro de sodio, aunque se pueden usar otras sales de cianoborohidruro, incluyendo cianoborohidruro de potasio. Las diferencias en los niveles iniciales de cianuro en los lotes de reactivos de cianoborohidruro de sodio y el cianuro residual en la reacción de conjugación
 5 pueden conducir a un rendimiento de conjugación inconsistente, lo que da lugar a atributos de producto variables, tales como el tamaño del conjugado y la relación del conjugado Ps con respecto a CRM197. Controlando y/o reduciendo los niveles de cianuro libre en el producto de reacción final, se puede reducir la variabilidad de la conjugación.

Los aldehídos residuales sin reaccionar en el polisacárido se reducen
 10 opcionalmente con la adición de un agente reductor fuerte, tal como borohidruro de sodio. En general, se prefiere el uso de un agente reductor fuerte. Sin embargo, para algunos polisacáridos, se prefiere evitar esta etapa. Por ejemplo, el serotipo 5 de *Streptococcus pneumoniae* contiene un grupo cetona que puede reaccionar fácilmente con un reductor fuerte. En este caso, es preferible evitar la etapa de reducción para proteger la estructura antigénica del polisacárido.

15 Después de la conjugación, los conjugados de polisacárido-proteína transportadora se purifican para eliminar el exceso de reactivos de conjugación, así como la proteína transportadora libre residual y el polisacárido libre mediante una o más de cualquier técnica bien conocida por el experto en la materia, incluyendo las operaciones de concentración/diafiltración, ultrafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y
 20 filtración profunda. Véanse, p. ej., la patente de los Estados Unidos n.º 6.146.902. En una realización, la etapa de purificación es por ultrafiltración.

Composiciones neumocócicas conjugadas

La presente invención proporciona composiciones neumocócicas conjugadas que
 25 comprenden, consisten esencialmente o, como alternativa, consisten en conjugados de polisacárido-proteína transportadora junto con una SNE, con o sin un lípido catiónico. La presente invención proporciona además composiciones neumocócicas conjugadas que comprenden, consisten esencialmente o, como alternativa, consisten en conjugados de polisacárido-proteína transportadora junto con una SNE, con o sin un lípido catiónico y un
 30 vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona además composiciones neumocócicas conjugadas que comprenden, consisten esencialmente o, como alternativa, consiste en cualquiera de las combinaciones de conjugados de polisacárido-proteína transportadora descritas en el presente documento junto con una SNE, con o sin un lípido

cati6nico y, opcionalmente, un veh6culo farmac6uticamente aceptable. Las composiciones de la presente invenci6n pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en 2 a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 conjugados distintos de polisac6rido-prote6na transportadora, en donde cada uno de los

5 conjugados contiene un polisac6rido capsular diferente conjugado con una prote6na transportadora. En una realizaci6n, los polisac6ridos que forman parte de los conjugados de polisac6rido-prote6na transportadora, incluyen, pero sin limitaci6n, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A o 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F y 38 de *Streptococcus pneumoniae*. En

10 otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos

15 comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V,

20 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B,

25 24F, 31, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de

30 serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realizaci6n, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra

realización, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, el grupo de serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En otra realización, los serotipos se conjugan con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, todos los serotipos se conjugan con una proteína transportadora. En otra realización, la proteína transportadora preferida es CRM197.

Métodos de uso/posología

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible a infección, p. ej., una infección neumocócica, por medio de la administración de la vacuna mediante vía sistémica o mucosa. En una realización, la presente invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria a un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un método para vacunar a un ser humano contra una infección neumocócica, que comprende la etapa de administrar al ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición de la presente invención.

Las cantidades óptimas de los componentes de una vacuna particular pueden determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Por ejemplo, en otra realización, la dosis para la vacunación humana se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otra realización, la dosis se determina empíricamente.

Los métodos de la invención se pueden usar para la prevención y/o reducción de síndromes clínicos primarios causados por *Streptococcus pneumonia*, incluyendo tanto infecciones invasivas (meningitis, neumonía y bacteriemia) como infecciones no invasivas (otitis media aguda y sinusitis).

La administración de las composiciones de la invención puede incluir uno o más de: inyección por las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante

administración mucosa en el tubo digestivo, las vías respiratorias o el aparato genitourinario. En una realización, para el tratamiento de la neumonía u otitis media, se usa la administración intranasal (ya que puede evitarse de manera más eficaz el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana).

5 La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna puede seleccionarse como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. En general, para conjugados a base de polisacáridos, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 mg de cada polisacárido, en particular, de 0,1 a 10 mg y más particularmente de 1 a 5 mg. Por ejemplo, cada dosis puede
10 comprender 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o 750 ng o 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg.

Según cualquiera de los métodos de la presente invención y en una realización, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el paciente humano es un bebé (menor de 1 año de edad), niño pequeño (de aproximadamente 12 a 24 meses) o niño de corta edad
15 (aproximadamente de 2 a 5 años). En otras realizaciones, el paciente humano es un paciente anciano (>65 años). Las composiciones de la presente invención también son adecuadas para su uso con niños mayores, adolescentes y adultos (p. ej., de 18 a 45 años o de 18 a 65 años).

En consecuencia, una realización de la invención incluye un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno causado por *Streptococcus pneumonia* en un paciente o
20 sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones de la invención. En realizaciones adicionales, la invención incluye las composiciones de la invención (es decir, las composiciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva) (i) para su uso en, (ii) para su uso como un medicamento para, o (iii) para su uso en la preparación (o fabricación) de un medicamento para: (a) terapia (p. ej., del cuerpo humano);
25 (b) medicina; (c) tratamiento o profilaxis de la infección por *Streptococcus pneumonia*; (e) prevención de la reaparición de infección por *Streptococcus pneumonia*; (f) reducción de la progresión, inicio o gravedad de los síntomas patológicos asociados con infección por *Streptococcus pneumonia* y/o reducción de la probabilidad de infección por *Streptococcus pneumonia* o, (g) tratamiento, profilaxis de o retardo en el inicio, gravedad o progresión de
30 enfermedad o enfermedades asociadas con *Streptococcus pneumonia*, incluyendo, pero sin limitación: meningitis, neumonía, bacteriemia, otitis media aguda y sinusitis, y tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos causados por *Streptococcus pneumonia*.

En una realización de los métodos de la presente invención, una composición de

la presente invención se administra como una única inoculación. En otra realización, la vacuna se administra dos veces, tres veces o cuatro veces o más, separadas de forma adecuada. Por ejemplo, la composición se puede administrar a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o cualquier combinación de los mismos. Se puede seguir el calendario de inmunización designado para vacunas neumocócicas. Por ejemplo, el programa rutinario para bebés y niños pequeños contra la enfermedad invasiva causada por *Streptococcus pneumoniae* es de 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Por tanto, en una realización preferida, la composición se administra como una serie de 4 dosis a 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad.

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Los ejemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adecuadas para la inclusión incluyen las identificadas en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 02/083855 y WO 02/053761.

Formulaciones inventivas

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen al menos 1 o al menos 3, o al menos 7, o al menos 10, o al menos 13, o al menos 15, o al menos 20, o al menos 24, o al menos 27 o al menos 30 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y

conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de

5 *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F,

10 14, 15A, des-O-acetil-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una

15 composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F,

20 14, 15A, des-O-acetil-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C,

25 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F,

30 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetil-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En

algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se

5 proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus*

10 *pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A,

15 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus*

20 *pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A,

25 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B,

30 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31,

33F y 35B. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye una SNE y conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* que contienen serotipos de *Streptococcus pneumoniae* que consisten en 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B.

5 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una nanoemulsión estable (SNE).

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende un emulsionante y/o un solubilizante y/o un tensioactivo y opcionalmente un lípido catiónico, o mezclas de los mismos.

15 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende tensioactivos y/o terpenos y/o lípidos catiónicos o mezclas de los mismos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende uno o más tensioactivos y uno o más terpenos y opcionalmente uno o más lípidos catiónicos.

20 La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende entre uno y tres tensioactivos y entre uno y tres terpenos y opcionalmente entre uno y tres lípidos catiónicos.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y una SNE que comprende entre uno y dos tensioactivos y entre uno y dos terpenos y opcionalmente entre uno y dos lípidos catiónicos.

30 La presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o

polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional.

La presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional.

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional, en donde el lípido catiónico no está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada que comprende 1) conjugados de polisacárido-proteína transportadora y 2) una SNE que comprende i) trioleato de sorbitán (SPAN-85); (ii) polisorbato-20 (PS-20); iii) escualeno; y un iv) lípido catiónico opcional, en donde el lípido catiónico no está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

La presente invención proporciona además una composición neumocócica conjugada, como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas anteriormente comprenden conjugados de polisacárido-proteína transportadora en donde la proteína transportadora es CRM197.

En una realización de las composiciones anteriores, la SNE comprende PS-20. En otra realización, la SNE comprende PS-80.

En una realización, la composición comprende el lípido catiónico CLA, CLX o CLY.

En una realización, la composición comprende el lípido catiónico CLA.

En una realización, la composición comprende un lípido catiónico seleccionado de DLinDMA, DLinKC2DMA, DLin-MC3-DMA, CLinDMA y S-Octil CLinDMA.

En una realización, los conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae* contienen un polisacárido de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* particular que incluye, pero sin limitación, cualquiera de los serotipos seleccionados de 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A y 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F y 38 conjugados con una proteína transportadora que es CRM197. En otra realización, los conjugados de polisacárido-proteína

transportadora de *Streptococcus pneumoniae* comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos conjugados con la

5 proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos conjugados con la

10 proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-

15 acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en

20 los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra

25 realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la

30 proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten

esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197. En otra realización, los serotipos comprenden, consisten esencialmente o consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos conjugados con la proteína transportadora CRM197.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*

pneumoniae consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

5 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la
10 proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
15 *pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición
20 neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85);
25 polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
30 *pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición

neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85);
 5 polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F,
 10 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); y escualeno.

En una realización, la presente invención proporciona una composición
 15 neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido
 20 catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos
 25 los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y
 30 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80);

escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*

pneumoniae consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

5 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con
10 la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y un lípido catiónico.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus*
15 *pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y un lípido catiónico.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición
20 neumocócica conjugada que comprende 7 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido
25 catiónico CLA.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, todos
30 los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

 En una realización, la presente invención proporciona una composición

neumocócica conjugada que comprende 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 20 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-acetilado-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 24 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la

proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, des-O-acetilado-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno; y el lípido catiónico CLA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición neumocócica conjugada que comprende 21 conjugados distintos de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde los polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* consisten en los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, todos los serotipos conjugados con la proteína transportadora CRM197 y que además comprenden trioleato de sorbitán (SPAN-85); polisorbato-20 (PS-20) o polisorbato-80 (PS-80); escualeno y el lípido catiónico CLA.

En una realización de las composiciones anteriores, la SNE comprende PS-20. En otra realización, la SNE comprende PS-80.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de lípido catiónico y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 0,04 µg/ml a aproximadamente 80 mg/ml de lípido catiónico y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada

uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 4,2 mg/ml de lípido catiónico y al menos un
5 conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de lípido catiónico y al menos un
10 conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de lípido catiónico y al menos un
15 conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml preparados como una formulación liofilizada conjuntamente.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de lípido catiónico, de 2 µg/ml a
20 aproximadamente 2 mg/ml de aluminio en forma de APA y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml preparados como una formulación liofilizada conjuntamente.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico y al menos un
25 conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 60 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico y al menos un
30 conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, que incluye de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de lípido catiónico, y además incluye SPAN-85, PS-20 o PS-80 y escualeno. En otra realización, el lípido catiónico es CLA. En otra realización, el lípido catiónico es CLX. En otra
5 realización, el lípido catiónico es CLY.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, que incluye de aproximadamente 60 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico e incluye además 6 µg/ml - 240 µg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 240 µg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 2,4 mg/ml de escualeno. En otra realización, el lípido
10 catiónico es CLA. En otra realización, el lípido catiónico es CLX. En otra realización, el lípido catiónico es CLY.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye aproximadamente 6 µg/ml - 24 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 24 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 240 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína
15 transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye aproximadamente 6 µg/ml - 24 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 24 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 240 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína
20 transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye aproximadamente 6 µg/ml - 24 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 24 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 240 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína
25 transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye aproximadamente 2 µg/ml - 24 mg/ml de SPAN-85, 2 µg/ml - 2,4 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 20 µg/ml - 24 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína
30 transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,004 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye

aproximadamente 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 24 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml preparados como una formulación liofilizada conjuntamente.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de SPAN-85, 6 µg - 2,4 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 24 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 24 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

En algunas realizaciones, una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores e incluye 6 µg/ml - 24 mg/ml de SPAN-85, 6 µg - 24 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 240 mg/ml de escualeno.

En algunas realizaciones, una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores e incluye 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 2,4 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 24 mg/ml de escualeno.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, que incluye de aproximadamente 30 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico e incluye además 6 µg/ml - 14 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 14 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 34 mg/ml de escualeno. En otra realización, el lípido catiónico es CLA. En otra realización, el lípido catiónico es CLX. En otra realización, el lípido catiónico es CLY.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, que incluye de aproximadamente 60 µg/ml a aproximadamente 2,4 mg/ml de lípido catiónico e incluye además 6 µg/ml - 14 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 14 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 34 mg/ml de escualeno. En otra realización, el lípido catiónico es CLA. En otra realización, el lípido catiónico es CLX. En otra realización, el lípido catiónico es CLY.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que incluye 6 µg/ml - 14 mg/ml de SPAN-85, 6 µg/ml - 14 mg/ml de PS-20 o PS-80 y 60 µg/ml - 34 mg/ml de escualeno y al menos un conjugado de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*, en donde cada uno de los conjugados está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 24 µg/ml.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, en la mucosa, por vía intravenosa o por vía intramuscular. Las composiciones se administran en una cantidad suficiente para inducir una respuesta protectora. Las composiciones pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral, por vía subcutánea, en la mucosa o por vía intramuscular. La dosis administrada puede variar según el estado general, el sexo, el peso y la edad del paciente y la vía de administración.

Las composiciones de la presente invención, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, pueden denominarse composiciones inmunógenas.

Las composiciones de la presente invención, como se destaca en las diversas realizaciones anteriores, pueden denominarse vacunas o composiciones de vacuna.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE comprende PS-20, trioleato de sorbitán, escualeno y (13Z, 16Z) – N, N-dimetil-3-nonildocosa 13, 16-dien-1-amina.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE comprende 5-15 % molar de trioleato de sorbitán, 25-35 % molar de PS-20 o PS-80, 1-2,5 % molar de escualeno y 55-65 % molar de (13Z, 16Z) – N, N-dimetil-3-nonildocosa 13, 16-dien-1-amina.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende hasta 75 % molar de lípido catiónico, hasta 30 % molar de trioleato de sorbitán, hasta 30 % molar de polisorbato-20 o polisorbato-80 y 25-85 %

molar de cantidad de escualeno.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende hasta 50 % molar de lípido catiónico, hasta 10 % molar de trioleato de sorbitán, hasta 10 % molar de polisorbato-20 o polisorbato-80 y 50-80 % molar de cantidad de escualeno.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende hasta 24 % molar de lípido catiónico, 1-8 % molar de trioleato de sorbitán, 1-8 % molar de polisorbato-20 o polisorbato-80 y 60-75 % molar de cantidad de escualeno.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende aproximadamente 10-14 % molar de lípido catiónico, 1-4 % molar de trioleato de sorbitán, 1-4 % molar de polisorbato-20 o polisorbato-80 y 50-80 % molar de cantidad de escualeno.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 30-65 % molar de lípido catiónico, 5-30 % molar de trioleato de sorbitán, 10-40 % molar de escualeno y 0,5-4 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 55-65 % molar de lípido catiónico, 5-15 % molar de trioleato de sorbitán, 25-35 % molar de escualeno y 1-2,5 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 13-45 % molar de lípido catiónico, 2-4 % molar de trioleato de sorbitán, 50-82 % molar de escualeno y 1,5-3 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 13-14 % molar de lípido catiónico, 1-2 % molar de trioleato de sorbitán, 79-81 % molar de escualeno y 1-2 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 0 % molar de lípido catiónico, 8-10 % molar de trioleato de sorbitán, 80-84 % molar de escualeno y 8-10 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 20 % molar de lípido catiónico, 30 % molar de trioleato de sorbitán, 20 % molar de escualeno y 30 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende aproximadamente 2 % molar de lípido catiónico,

aproximadamente 8 % molar de trioleato de sorbitán, aproximadamente 82 % molar de escualeno y aproximadamente 8 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 2 % molar de lípido catiónico, 8 % molar de trioleato de sorbitán, 82 % molar de escualeno y 8 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende aproximadamente 13,82 % molar de lípido catiónico, aproximadamente 3,43 % molar de trioleato de sorbitán, aproximadamente 80,07 % molar de escualeno y aproximadamente 2,68 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 13,82 % molar de lípido catiónico, 3,43 % molar de trioleato de sorbitán, 80,07 % molar de escualeno y 2,68 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende aproximadamente 44,5 % molar de lípido catiónico, aproximadamente 2,21 % molar de trioleato de sorbitán, aproximadamente 51,56 % molar de escualeno y aproximadamente 1,72 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, incluyendo el lípido catiónico, comprende 44,5 % molar de lípido catiónico, 2,21 % molar de trioleato de sorbitán, 51,56 % molar de escualeno y 1,72 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 32 % molar de escualeno, 34 % molar de SPAN-85 y 34 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 98 % molar de escualeno, 1 % molar de SPAN-85 y 1 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 86 % molar de escualeno, 7 % molar de SPAN-85 y 7 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 92 % molar de escualeno, 4 % molar de SPAN-85 y 4 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 94 % molar de escualeno, 3 % molar de SPAN-85 y 3 % molar de PS-20 o PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 92,91 % molar de escualeno, 3,98 % molar de SPAN-85 y 3,11 % molar de PS-20 o

PS-80.

En una realización, se proporciona una composición, en donde la SNE, comprende 62 % molar de escualeno, 17 % molar de SPAN-85 y 17 % molar de PS-20 o PS-80.

En cada una de las realizaciones descritas anteriormente, la composición
5 comprende además conjugados de polisacárido-proteína transportadora de *Streptococcus pneumoniae*.

La presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir enfermedades neumocócicas mediante la administración de las composiciones descritas anteriormente.

La presente invención proporciona el uso de las composiciones descritas
10 anteriormente para tratar o prevenir enfermedades neumocócicas.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia con el fin de describir y desvelar metodologías y materiales que podrían usarse en relación con la presente invención. Nada de lo expuesto en el presente documento se ha de interpretar como un reconocimiento de que la invención no tenga derecho a preceder tal
15 divulgación en virtud de la invención anterior.

Habiendo descrito realizaciones preferidas de la invención con referencia a los dibujos adjuntos, debe entenderse que la invención no se limita a esas realizaciones precisas y que un experto en la materia puede usar diversos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora mediante conjugación de DMSO

25 Se disolvió polisacárido o polisacáridos (como se destaca a continuación y en las tablas y ejemplos), se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió el tampón por ultrafiltración. El polisacárido activado y la CRM197 purificada se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. A continuación, se combinaron y conjugaron las soluciones disueltas de nuevo de polisacárido y CRM197 como se describe a
30 continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso dentro de cada etapa, tales como pH, temperatura, concentración y tiempo se controlaron para producir conjugados con los atributos deseados.

Reducción del tamaño del polisacárido

El polvo de polisacárido capsular neumocócico purificado (también denominado "Ps") se disolvió en agua. Con la excepción de ST-19A (el serotipo se denomina de otro modo "ST") que no se redujo de tamaño, el polisacárido disuelto se filtró a 0,45 micrómetros y se
 5 homogeneizó o hidrolizó con ácido para reducir la masa molecular de Ps. El tamaño de Ps diana se logró para la homogeneización controlando la presión y el número de pases. El tamaño de Ps diana se logró para la hidrólisis ácida controlando la temperatura y el tiempo. A continuación, el polisacárido se filtró a 0,2 micrómetros y se concentró y diafiltró frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 5 o 10 kDa.

10 *Des-O-acetilación*

La solución de ST-15B Ps de tamaño reducido se calentó a 60 °C y se añadió tampón de bicarbonato de sodio a pH 9,4 hasta una concentración final de 50 mM. El lote se incubó a 60 °C para liberar grupos O-acetilo. Se añadió tampón de fosfato de potasio a pH 6 para neutralizar el pH y la solución se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, la solución se
 15 concentró y se diafiltró frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial PCPMN de 5 o 10 kDa.

Descetalización (solo ST-4)

La solución de ST-4 Ps de tamaño reducido se ajustó a 50 °C y pH 4,1 con un tampón de acetato de sodio para descetalizar parcialmente el polisacárido. A continuación, la
 20 solución de polisacárido se enfrió a 22 °C antes de la activación.

Oxidación de polisacáridos

La solución de polisacárido se ajustó a 22 °C para todos los serotipos, excepto ST-5, 7F y 19F, que se ajustaron a 4 °C. La solución también se ajustó a pH 4-5 con un tampón de acetato de sodio para minimizar la reducción del tamaño del polisacárido debido a la
 25 activación. La activación del polisacárido se inició con la adición de una solución de metaperyodato de sodio. La cantidad de metaperyodato de sodio añadido se controló para lograr un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de unidad de repetición de polisacárido).

El producto activado para todos los serotipos excepto ST-5 se diafiltró frente a
 30 fosfato de potasio 10 mM, pH 6,4 seguido de diafiltración frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 5 o 10 kDa. Para ST-5, el producto activado se diafiltró frente a acetato de sodio 10 mM, pH 4,1 seguido de diafiltración frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 5 kDa. La ultrafiltración se

realizó a 2-8 °C para todos los serotipos.

Conjugación de polisacárido con CRM197

La CRM197 purificada, obtenida a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se ha descrito anteriormente (documento WO 2012/173876 A1), se diafiltró
 5 frente a tampón de fosfato 2 mM, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 5 kDa y se filtró a 0,2 micrómetros. Se formularon polisacáridos activados para liofilización con agua y sacarosa. La CRM197 se formuló para liofilización a 6 mg de Pr/ml (la proteína transportadora CRM197 se denomina también "Pr") con una concentración de sacarosa del 1 % p/v. Las soluciones formuladas de Ps y CRM197 se
 10 liofilizaron individualmente. Los materiales liofilizados de Ps y CRM197 se redisolviéron individualmente en volúmenes iguales de DMSO. Se agregaron aditivos tales como sal al Ps-DMSO para algunos serotipos. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se combinaron para lograr una concentración de polisacárido diana y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido
 15 con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se añadió un agente reductor tal como cianoborohidruro de sodio para la mayoría de los serotipos y se realizó conjugación a 22 °C.

Reducción final

Se añadió un agente reductor tal como borohidruro de sodio después de la reacción de conjugación y se incubó a 22 °C para todos los serotipos. El lote se diluyó en cloruro
 20 de sodio 150 mM, con polisorbato-20 a aproximadamente 0,025 % (p/v), a aproximadamente 4 °C. A continuación, se añadió tampón de fosfato de potasio para neutralizar el pH. Algunos lotes se concentraron y diafiltraron a aproximadamente 4 °C frente a cloruro de sodio 150 mM, fosfato de potasio 25 mM pH 7, usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 30 kDa.

Filtración final y almacenamiento de producto

A continuación, los lotes individuales se concentraron y diafiltraron frente a histidina 10 mM en cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0, con polisorbato 20 al 0,015 % (p/v), a
 4 °C usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de PCPMN de 300 kDa. Específicamente, para ST-5, a la mitad de la etapa de diafiltración, el conjugado de ST-5 se
 30 recogió y se incubó con bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,3 durante 3 horas. La solución de ST-5 se neutralizó con fosfato de potasio 1,5 M, pH 6,0 antes de completar la diafiltración.

Los lotes individuales de retenido se filtraron a 0,2 micrómetros (con prefiltro de 0,5 micrómetros) y después se diluyeron con histidina 10 mM adicional en cloruro de sodio

150 mM, pH 7,0 con polisorbato 20 al 0,015 % (p/v), se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a ≤ -60 °C. Los detalles del conjugado específico de serotipo se pueden encontrar como se ha descrito anteriormente (documentos WO2011/100151, WO2019/139692 y WO2020/131763).

5

Ejemplo 2: Formulación de composiciones neumocócicas conjugadas

Se usaron conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína transportadora individuales preparados utilizando diferentes químicas como se describe en el ejemplo 1 para la formulación de una composición de conjugado neumocócico de 1, 21 o 24 serotipos denominada PCV1, PCV21 o PCV24, respectivamente.

10

La formulación de PCV1, para añadir al CLA-SNE o SNE o usarse tal cual, contenía el serotipo 6B conjugado usando aminación reductora en un disolvente aprótico (DMSO), como se ha descrito en el ejemplo 1, y se formuló en L-Histidina 20 mM pH 5,8, NaCl 150 mM y PS-20 al 0,1 % (p/v) para una concentración final de 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) en la vacuna. La formulación de la vacuna PCV1, preparada con APA y serotipo 6B conjugado usando aminación reductora en un disolvente aprótico (DMSO), como se ha descrito en el ejemplo 1, se formuló en L-Histidina 20 mM pH 5,8, NaCl 150 mM y PS-20 al 0,2 % (p/v) y 250 mg de $[Al^{+3}]$ /ml en forma de APA para una concentración final de 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) en la vacuna.

15

20

La formulación de PCV21, para añadir al CLA-SNE o SNE o usarse tal cual, contenía los serotipos 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B des-O-acetilado (deOAc15B), 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B conjugados con la proteína transportadora CRM197 usando aminación reductora en un disolvente aprótico (p. ej., DMSO) y formulados en L-histidina 20 mM pH 5,8, NaCl 50 - 150 mM y PS-20 al 0,02 - 0,1 %. Cada conjugado de polisacárido-proteína transportadora se formuló a 4-8 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final de 84-168 µg/ml de PnPs en la vacuna.

25

30

La formulación de PCV24, para añadir al CLA-SNE o SNE o usarse tal cual, contenía los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B conjugados con la proteína transportadora CRM197 usando aminación reductora en un disolvente aprótico (p. ej., DMSO) y formulados en L-histidina 20 mM pH 5,8, NaCl 50 - 150 mM y PS-20 al 0,02 - 0,1 %. Cada conjugado de polisacárido-proteína transportadora se formuló a 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final de 96 µg/ml de PnPs en la vacuna.

Para preparar las formulaciones de PCV, los volúmenes requeridos de conjugados monovalentes a granel necesarios para obtener la concentración final indicada de polisacárido neumocócico (p/v) (también denominado PnPs) se calcularon basándose en el volumen del lote y la concentración de polisacárido a granel.

5 El proceso de formulación consistió en una preparación de mezcla a granel conjugada a 2 veces la concentración final de mezclas de PnPs en histidina 20 mM, PS-20 de 0,05 a 0,15 % (p/v) y cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8.

Se prepararon soluciones de histidina pH 5,8, PS-20 y cloruro de sodio y se añadieron al recipiente de formulación. Los conjugados neumocócicos individuales de polisacárido-proteína transportadora, almacenados congelados, se descongelaron a 2-8 °C y después se añadieron al recipiente de formulación. Durante la adición del conjugado de polisacárido-proteína transportadora al tampón de formulación (mezcla de conjugados), el recipiente se mezcló para garantizar la homogeneidad usando una barra de agitación magnética o un impulsor magnético. Después de realizarse todas las adiciones y agitarse la solución, la mezcla de conjugado se pasó a través de filtros esterilizantes y se recogió en un recipiente con o sin APA. En algunos casos, los filtros esterilizantes se revisaron con cloruro de sodio 150 mM para ajustar el lote a la concentración diana.

Las formulaciones se cargaron en jeringas de plástico, jeringas de vidrio o viales.

La formulación de PCV13, una vacuna antineumocócica conjugada de 13 serotipos usada en el presente documento, se obtuvo de PREVNAR13® disponible en el mercado.

Ejemplo 3: Preparación de un sistema adyuvante de nanoemulsión estable (SNE) con y sin el lípido catiónico, (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina)

25 El adyuvante de SNE se puede preparar con y sin lípidos catiónicos, (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina) también denominada CLA o (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-dimetilpentatriaconta-6,9,26,29-tetraen-18-amina, también denominada CLX; o N,N-dimetil-1-((1S,2R)-2-octilciclopropil)heptadecan-8-amina, también conocida como CLY (figura 1) La SNE es una formulación de emulsión multicomponente que consta de 3 ingredientes estabilizantes; escualeno, trioleato de sorbitán (SPAN-85) y polisorbato-20 (PS-20) con un lípido catiónico, por ejemplo, CLA (denominada CLA-SNE, véase la tabla 1) y sin un lípido catiónico (denominado SNE, véase la tabla 2). Esta formulación se preparó combinando y mezclando el lípido catiónico (si se usa), escualeno, SPAN-85 y PS-20 o componentes similares (p. ej.,

tensioactivos, aceites y solubilizantes) entre sí (tabla 1 y figura 2). Una vez mezclados y combinados, se añadió un tampón de histidina y se mezcló con los componentes de emulsión iniciales. Los componentes de emulsión combinados se sometieron primero a una homogeneización gruesa seguida de una homogeneización fina, como se describe a continuación.

- 5 La formulación resultante se sometió a una etapa de filtración final de 0,2 μm . Varios parámetros de proceso dentro de cada etapa, tales como el orden de adición, el tiempo de mezcla, el pH, la temperatura, la concentración de componentes, la homogeneización, la microfluidización se controlaron para producir un sistema de emulsión con los atributos deseados.

Tabla 1: Composición de un adyuvante de CLA-SNE representativo

Componente	Descripción	Contenido de cada lípido (% molar)	Peso molecular (g/mol)	Contenido de cada lípido (% en masa)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina	13,82-44,5	475,9	14,29-45,45
Escualeno	escualeno	51,56-80,07	410,72	45,45-71,43
SPAN-85	trioleato de sorbitán	2,21-3,43	957,5	4,55-7,14
PS-20	polisorbato-20	1,72-2,68	1228	4,55-7,14
Matriz de tampón	histidina 20 mM, pH 5,8	N/D		

10

Tabla 2: Composición de un adyuvante de SNE representativo

Componente	Descripción	Contenido de cada lípido (% molar)	Peso molecular (g/mol)	Contenido de cada lípido (% en masa)
Escualeno	escualeno	92,25-93,57	410,72	81,97-84,75
SPAN-85	trioleato de sorbitán	3,61-4,35	957,5	7,63-9,02
PS-20	polisorbato-20	2,82-3,39	1228	7,63-9,02

Matriz de tampón	histidina 20 mM, pH 5,8	N/D
------------------	-------------------------	-----

Preparación de la formulación

La formulación de escualeno y solubilizante (denominada fase oleosa) de la emulsión estable se preparó mediante la adición de escualeno, SPAN-85, PS-20 y CLA a un recipiente. Después, la fase oleosa se mezcló usando agitación magnética a 100-1000 RPM durante 10 a 120 minutos. Después de mezclar estos componentes, una fase acuosa que comprende histidina 20 mM pH 5,8, se añadió lentamente a la fase oleosa mientras se mezclaba usando una barra de agitación magnética. A continuación, esta formulación se volvió a mezclar durante 1 hora.

10 *Homogeneización gruesa*

A continuación, esta mezcla de aceite y fase acuosa (denominada emulsión prehomogeneizada o PHE) se homogeneizó y se redujo su tamaño para formar una emulsión gruesa usando un homogeneizador de rotor estátor a temperatura ambiente. La punta del brazo del homogeneizador se sumergió en la PHE y se mantuvo en el sitio cerca del fondo del recipiente de formulación y se hizo funcionar de 6 a 10 kRPM durante 5-15 minutos. Este proceso dio lugar a una suspensión homogénea de microemulsión (ME) de partículas de emulsión de escualeno en el intervalo de diámetros de 4 a 20 μm que fueron adecuadas para una reducción de tamaño adicional mediante microfluidización en un homogeneizador de alta presión para crear una nanoemulsión estable (SNE).

20 *Homogeneización fina para producir la nanoemulsión estable (SNE)*

Después de una homogeneización gruesa, la emulsión se procesó adicionalmente usando un homogeneizador/microfluidizador de alta presión para producir partículas de emulsión estables de tamaño nanométrico. La ME se introdujo en el homogeneizador de alta presión tal como el Microfluidizer® de bajo volumen de Microfluidics, el PandaPlus 2000 del GEA Group o NanoDeBEE de Bee International, y se establece un bucle de recirculación. Un intercambiador de calor a contracorriente, alimentado por una unidad de temperatura controlada con un punto de ajuste de 5 °C, se incluye en el circuito de recirculación para neutralizar el calor generado por la homogeneización a alta presión. Para la producción de partículas de emulsión del tamaño y procesabilidad deseados, se seleccionó 20 kPSI como punto de ajuste operativo para esta etapa del proceso. El homogeneizador de alta presión opera a un caudal constante e inalterable a través del circuito de recirculación establecido. Usando este caudal medido y el volumen de ME para

procesar, se calculó el tiempo teórico necesario para que la totalidad de la formulación pase una vez por el circuito de recirculación. Dado este tiempo de pase único calculado, el homogeneizador de alta presión generalmente se hizo funcionar hasta que se alcanzó el recuento de pases deseado de al menos 10, produciendo la SNE o CLA-SNE.

5

Filtración

Después de la formulación, la SNE o CLA-SNE se pasó a través de un filtro de PES de 0,8/0,2 μm . Se seleccionó un flujo de 42 LMH a través del filtro dado su rendimiento de masa óptimo y la estabilidad de las partículas a través de la filtración.

10 Se utilizó una técnica de difracción láser o dispersión de luz estática (SLS) que usa un instrumento MS3000 de Malvern Panalytical Ltd. para medir la distribución de tamaños ponderada en volumen de una nanoemulsión durante la preparación. A continuación, estos datos se analizaron para calcular el tamaño de las partículas que crearon el patrón de dispersión. Se obtuvieron fracciones de muestras de emulsión prehomogeneizada (PHE), microemulsión (ME)

15 y nanoemulsión estable (SNE). Estas formulaciones de emulsión se diluyeron para dirigirse a un oscurecimiento del 3 % en histidina 5 mM pH 5,8 y tampón de NaCl 2,5 mM y se realizó SLS y se recogió con recirculación de 1200 RPM. Los conjuntos de datos de muestra se recopilaron con una exploración de 30 segundos por conjunto de datos. En la figura 3 se resumen tres conjuntos de datos de cada etapa del proceso de formulación de CLA-SNE. Aunque el tampón de histidina

20 20 mM, pH 5,8, era una formulación perfectamente adecuada para la estabilidad del volumen durante el proceso y cuando se almacenaba en recipientes poliméricos (p. ej., de plástico), tras el almacenamiento en vidrio, se observó una absorción inespecífica de CLA-SNE o SNE en la superficie del vidrio. Se evaluó un cribado que evalúa los tensioactivos/solubilizantes, tampones y sales, y múltiples formulaciones muestran éxito en la eliminación de este problema de

25 estabilidad con la formulación seleccionada de histidina 20 mM PS-20 al 0,05 % y NaCl 75 mM como la formulación estabilizadora (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Preparación de un sistema adyuvante de nanoemulsión estable (SNE) y adición del lípido catiónico, (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina) o CLA como base

30 libre directamente después de la microfluidización de la SNE

Se evaluaron dos procesos de formulación para incorporar CLA en la partícula de nanoemulsión que incluye PS-20, trioleato de sorbitán (SPAN-85) y escualeno formulados en tampón de histidina pH 5,8. En el primer proceso (denominado Proceso 1), la SNE se preparó

usando el proceso descrito en el ejemplo 3. En el segundo proceso, (denominado proceso 2), solo PS-20, trioleato de sorbitán (SPAN-85) y escualeno se combinaron y se mezclaron entre sí. Una vez mezclados y combinados, se añadió un tampón de histidina y se mezcló con los componentes de emulsión iniciales (PS-20, trioleato de sorbitán y escualeno). Los componentes de la emulsión combinados se sometieron en primer lugar a una homogeneización gruesa para producir la microemulsión ME seguida de microfluidización para producir la nanoemulsión (NE), como se ha descrito en el ejemplo 3. En un recipiente de vidrio separado, se disolvieron 0,25 mg/ml de CLA en etanol al 100 % a temperatura ambiente. Un volumen suficiente de esta solución de etanol de CLA, para producir la concentración final deseada de CLA, se añadió a continuación a la SNE que contenía PS-20, trioleato de sorbitán y escualeno en tampón de histidina pH 5,8 y después se mezcló durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la formulación se dializó entonces frente a histidina 5 mM NaCl 2,5 mM pH 5,8 a 10 ml de muestra a 500 ml de tampón durante una noche a 4 °C, con dos cambios de tampón. Las dos emulsiones procesadas (proceso 1 y 2) se examinaron después para la incorporación de CLA en la SNE usando UPLC-CAD. Los resultados indican que no se incorporó una cantidad significativa de CLA en comparación con el % (p/p) de incorporación de la formulación individual diana usando el proceso 2, lo que indica que el proceso 1 se prefiere para la incorporación exitosa y la estabilidad de CLA en la nanoemulsión (figura 4).

Ejemplo 5: Preparación del adyuvante de la LNP que contiene lípidos catiónicos

CLA-LNP es una formulación de LNP de múltiples componentes que consiste en 4 componentes; un lípido catiónico (denominado CLA; figura 1, mostrada con lípido catiónico preferido, CLA, (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina), colesterol, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y ePEG-DMG.

Los valores de % molar diana relativo de la formulación de CLA-LNP final para los componentes lipídicos son 58 % de CLA, 30 % de colesterol, 2 % de ePEG2000-DMG y 10 % de DSPC (tabla 3).

30

Tabla 3: Composición del adyuvante CLA-LNP

Componente	Descripción	Contenido	Peso	Contenido
------------	-------------	-----------	------	-----------

		de cada lípidos (%) molar)	molecular (g/mol)	de cada lípidos (%) en masa)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina)	58	475,9	52
Colesterol	Colest-5-en-3 β -ol	30	386,7	22
Distearoil fosfitidil colina (DSPC)	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	10	790,2	15
ePEG2000- DMG	α -[8'-(1,2-Dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamida-3', 6'-Dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilenglicol)-2000	2	2837	11
Matriz de tampón	Tris 20 mM al 10 % (p/v) de sacarosa pH 7,5)	N/D		

El proceso de elaboración de la CLA-LNP consiste en 5 etapas: 1) preparación en solución de mezcla de lípidos y citrato A diluido; 2) formación de LNP mediante mezcla en T; 3) ultrafiltración; 4) filtración reducida de carga biológica; y 5) esterilización por filtración y

5 llenado de viales.

Preparación en solución de mezcla de lípidos y citrato A diluido

Los componentes lipídicos se pesaron y combinaron antes de disolverse en etanol antes de esterilizarse por filtración para formar la mezcla lipídica. Se diluyó citrato A (citrato 20 mM pH 5,0) en una relación de uno con agua estéril para formar citrato A diluido (DCA).

10 *Formación de LNP mediante mezcla en T*

A continuación, la mezcla de lípidos y el DCA se mezclaron en los extremos adyacentes de un mezclador de tubo en T. La corriente que sale del aparato de mezcla en T se diluyó inmediatamente 1:1 con citrato 20 mM, NaCl 300 mM pH 6,0, a continuación, esta mezcla de productos se diluyó de nuevo 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de
15 Dulbecco 1x y después se recogió como LNP formada. A continuación, el intermedio de LNP se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de mantenerlo durante una noche a 4 °C.

Ultrafiltración

El intermedio de LNP se sometió después a ultrafiltración con un PCPMN de 500 kDa para concentrar el material aproximadamente 10 veces así como diafiltrar el material
5 frente a Tris 20 mM, sacarosa al 10 % (p/v), pH 7,5. Después de la diafiltración, se realizó una etapa de concentración final para lograr una concentración diana final.

Filtración reducida de carga biológica

A continuación, se prefiltró la masa del adyuvante con un filtro de acetato de celulosa (CA) de 0,45 µm seguido de un filtro reductor de carga biológica de CA de 0,2 µm y se
10 almacenó congelada a -70 °C.

Esterilización por filtración y llenado de viales

La masa del adyuvante congelado se descongeló en un baño de agua controlado a 25 + 3 °C. La masa de adyuvante descongelada se pasó a través de un filtro reductor de carga biológica de fluoruro de polivinilideno de 0,45 µm (PVDF) y un filtro graduado esterilizante de
15 PVDF de 0,22 µm y se recibió. La masa del adyuvante filtrado se diluyó después con Tris 20 mM, sacarosa al 10 % (p/v), pH 7,5 a la concentración de adyuvante LNP diana. Este adyuvante a granel final diluido se cargó después en viales de vidrio y se almacenó a -70 °C.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de PCV1 en ratones: Evaluación de sistemas adyuvantes

Se inmunizaron por vía intramuscular (IM) ratonas BALB/c jóvenes (6-8 semanas de edad, n = 10/grupo) 0.1 ml de PCV1 formulado con diferentes adyuvantes (tabla 4) los días 0, día 14 y día 28. Se dosificó PCV1 a 0,08 µg de PnPs (6B conjugado con CRM197) por
20 inmunización. Los ratones fueron observados al menos a diario por personal capacitado en el cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que
25 las formulaciones de vacunas en ratones eran seguras y bien toleradas, ya que no se observaron acontecimientos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo experimental de ratón
fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Merck & Co., Inc.
30 (Kenilworth, NJ, EE. UU.).

Tabla 4: Composiciones de formulación evaluadas en el estudio de inmunogenicidad de PCV1 en ratones

Formulación
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml; L-Histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % p/v de PS-20 [Sin adyuvante]
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml de L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 0,2 % p/v de PS-20; [50 µg/ml de APA]
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml; L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [8 µg/ml de CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml; L-Histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [80 µg/ml de CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml; L-Histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [800 µg/ml de CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 µg de PnPs/ml; L-Histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [SNE (10 mg/ml de escualeno; 1,0 mg/ml de PS-20; 1,0 mg/ml de SPAN-85)]
L-Histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [SNE (10 mg/ml de escualeno; 1,0 mg/ml de PS-20; 1,0 mg/ml de SPAN-85)]

- Se evaluó la inmunogenicidad de IgG en sueros de ratón usando ELISA para evaluar los títulos de IgG anti-6B. El anticuerpo funcional se determinó a través de ensayos opsonofagocíticos (OPA) basados en protocolos descritos anteriormente disponibles en el
- 5 Laboratorio de Referencia de Neumococos de la UAB (Laboratorio de Referencia de la Universidad de Alabama en la Biblioteca de Referencia de Patógenos Respiratorios Bacterianos de Birmingham) y el software Opsotiter® 3 propiedad de y con licencia de la Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) (véase, Caro-Aguilar I. *et al.*, Vaccine (2017) 35 (6): 865-72 y Burton R.L. y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-
- 10 9). Como se muestra en la figura 5A, La inmunización con PCV1 generó títulos de anticuerpos en ratones BALB/c para el serotipo 6B (ST-6B) en la vacuna cuando se formula con y sin APA. ST-6B, formulado con CLA-SNE (a 0,08, 8 u 80 mg de CLA por dosis) o adyuvantes SNE, resultó ser inmunogénico en ratones y dio lugar a una mayor inmunogenicidad después de la dosis 3 en comparación con ST-6B formulado solo o con APA. Se generaron títulos de
- 15 anticuerpos funcionales anti-6B en ratones BALB/c que se inmunizaron con ST-6B formulado con y sin APA (figura 5B).

Ejemplo 7: Inmunogenicidad de PCV24 en macacos de la India adultos

PCV24 (serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, cada uno conjugado individualmente con CRM197) se evaluó en un modelo de inmunogenicidad de macaco de la India adulto. Los macacos de la India se inmunizaron por vía intramuscular con PCV24 formulado con APA o PCV24 formulado con SNE o CLA formulada como SNE (CLA-SNE) o LNP (CLA-LNP) (tabla 5) los días 0 y 28. Se dosificó PCV24 a 0,4 µg de PnPs en un volumen de 0,1 ml por inmunización. Los sueros se recogieron antes del inicio del estudio (preinmunitario, día 0) y los días 14 (PD1) y 42 (PD2).

10 Tabla 5: Formulaciones de PCV24 evaluadas en un modelo de inmunogenicidad de macacos de la India adultos

Formulación
PCV24 en L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 0,2 % p/v de PS-20 [250 µg/ml de APA]
PCV24 en L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, sacarosa al 5 % (p/v), NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [1200 µg/ml de CLA-LNP]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [800 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 5,0 mg/ml de PS-20; 5,0 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [1200 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 5,0 mg/ml de PS-20; 5,0 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [SNE (25 mg/ml de escualeno; 5,0 mg/ml de PS-20; 5,0 mg/ml de SPAN-85)]

Para evaluar las respuestas de inmunogenicidad de IgG específicas de serotipo en una vacuna de 24 serotipos, se desarrolló un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) múltiple. Este ensayo se desarrolló para su uso con suero de macaco de la India en función de ensayos previos descritos por Marchese *et al.* y Skinner *et al.* (Marchese R.D. *et al.*, Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16 (3): 387-96 y Skinner, J.M. *et al.*, Vaccine (2011) 29 (48): 8870-8876). La tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (un departamento de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) utiliza polisacáridos de serotipos neumocócicos (1, 3, 4, 5,

6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, des-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B) aplicados sobre manchas en una placa de 96 pocillos y un anticuerpo marcado con SULFO-TAG™ que emite luz tras la estimulación electroquímica. Se usó IgG anti-humana marcada con SULFO-TAG™ como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de macaco de la India. El título de dilución de punto final se calculó como el recíproco de la dilución interpolada linealmente correspondiente al valor de corte (señal de ECL de control) usando escala logarítmica para el ECL y la dilución. Los títulos se extrapolaron para muestras más allá de la dilución máxima estudiada, en función de la extrapolación lineal (en la escala logarítmica-logarítmica) usando la intersección y la pendiente de los últimos 2 o 3 puntos de datos del ensayo ECL para la curva de la muestra completamente por encima de la línea de corte. Todos los títulos se obtuvieron mediante retrotransformación de la dilución extrapolada linealmente. Si la curva de la muestra estaba completamente por debajo de la línea de corte, se usó 100 como título en todos los análisis de datos y en las figuras 6A y 6B. El anticuerpo funcional se determinó a través de ensayos opsonofagocíticos múltiples (MOPA) basados en protocolos descritos anteriormente disponibles en el Laboratorio de Referencia de Neumococos de la UAB (Laboratorio de Referencia de la Universidad de Alabama en la Biblioteca de Referencia de Patógenos Respiratorios Bacterianos de Birmingham) y el software Opsotiter® 3 propiedad de y con licencia de la Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) (véase, Caro-Aguilar I. *et al.*, Vaccine (2017) 35 (6): 865-72 y Burton R.L. y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

La PCV24 formulada con la CLA-SNE formulada a 1200 µg/ml de CLA-SNE con (25 mg/ml de escualeno; 5,0 mg/ml de PS-20; 5,0 mg/ml de SPAN-85) resultó ser inmunogénica en macacos de la India adultos y dio lugar a mayor inmunogenicidad después de la dosis 1 y después de la dosis 2 en comparación con PCV24 formulada con APA (figura 6A). La PCV24 formulada con CLA-SNE a un nivel de dosis de 120 µg da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA (línea continua) para después de la dosis 1 (PD1) y después de la dosis 2 (PD2). En PD2, la PCV24 formulada con CLA-SNE a dos niveles de dosis de CLA (120 µg mostrado como círculos u 80 µg mostrado como triángulos) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA (línea continua) o PCV24 formulada con CLA-LNP (120 µg como cuadrados) (figura 6B).

Estas mismas formulaciones generaron anticuerpos funcionales (figuras 7A-7M)

que destruyeron cepas bacterianas de tipo vacuna en todos los puntos temporales probados y de nuevo la CLA-SNE, SNE sola y CLA-LNP reforzaron la respuesta de PCV24 en comparación con PCV24 formulada con APA. Una excepción fue el 23B, cuya preinmunización neumocócica alta interfirió con una respuesta de refuerzo después de la vacunación. Todos los puntos temporales del estudio se probaron en MOPA como muestras agrupadas o individuales (figuras 7A-7M). No se observó mucha diferencia en los títulos de OPA entre PD1 y PD2.

Se evaluaron sueros de macacos de la India adultos inmunizados con PCV24 para determinar la reactividad cruzada con otras bacterias *Streptococcus pneumoniae*. Los sueros de macacos inmunizados con PCV24 tenían reactividad cruzada con los serotipos 6C (figuras 6A, 6B y 7D) y 15B (figuras 6A y 6B). La reactividad cruzada con 6C probablemente se deba a la inmunización con conjugado de polisacárido 6A-CRM197 como parte de una PCV24 multivalente (Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU). La vacuna antineumocócica conjugada de 13 serotipos (PCV13) induce respuestas de muerte opsonofagocítica de función cruzada en seres humanos para serotipos 6C y 7A de *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. 2011; 29:7207-11). De forma similar, la inmunización con conjugados de polisacáridos des-O-Ac-15B-CRM197 como parte de una PCV multivalente dio lugar a reactividad cruzada con el serotipo 15C (Rajam *et al.*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14 (9): 1223–1227).

Ejemplo 8: Estudio de inmunogenicidad de PCV24 en macaco de la India lactante (IRM)

PCV24 (serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B cada uno conjugado individualmente con CRM197) y formulaciones de adyuvantes se prepararon como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente. Los IRM (macacos de la India lactantes, n = 5/grupo) se inmunizaron por vía intramuscular con 0,1 ml de vacuna, como se describe en la tabla 6, a continuación, los días 0, 28 y 56. Los sueros se recogieron antes del inicio del estudio (pre) y los días 14 (PD1), 42 (PD2) y 70 (PD3). Los IRM fueron observados dos veces al día por personal capacitado en el cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que las formulaciones de vacunas en los IRM eran seguras y bien toleradas, ya que no se observaron acontecimientos adversos relacionados con la vacuna.

Tabla 6: Formulaciones de PCV24 evaluadas en un modelo de inmunogenicidad de macacos de la India lactantes

Formulación
PCV24 en L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 0,2 % p/v de PS-20, [250 µg/ml de APA]
PCV24 en L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, sacarosa al 5 % (p/v), NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [1200 µg/ml de CLA-LNP]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [600 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [1200 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, sacarosa al 5 %, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [2950 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [600 µg/ml de CLA-SNE (5 mg/ml de escualeno; 0,5 mg/ml de PS-20; 0,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [1200 µg/ml de CLA-SNE (5 mg/ml de escualeno; 0,5 mg/ml de PS-20; 0,5 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [2950 µg/ml de CLA-SNE (5 mg/ml de escualeno; 0,5 mg/ml de PS-20; 0,5 mg/ml de SPAN-85)]
[PCV24 en L-histidina 20 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20, [1200 µg/ml de CLA-SNE (0,8 mg/ml de escualeno; 0,08 mg/ml de PS-20; 0,08 mg/ml de SPAN-85)]]

Para evaluar las respuestas de IgG específicas de serotipo en una vacuna de 24 serotipos, se desarrolló un ensayo de electroquimioluminiscencia múltiple (ECL) para su uso como se ha descrito anteriormente. El título de punto final se calculó como el recíproco de la dilución interpolada linealmente correspondiente al valor de corte (señal de ECL de control)

5 usando escala logarítmica para el ECL y la dilución. Los títulos se extrapolaron para muestras más allá de la dilución máxima estudiada, en función de la extrapolación lineal (en la escala logarítmica-logarítmica) usando la intersección y la pendiente de los últimos 2 o 3 puntos de datos del ensayo ECL para la curva de la muestra completamente por encima de la línea de corte.

10 A continuación, se obtuvieron los títulos mediante retrotransformación de la dilución extrapolada

linealmente. Si la curva de la muestra estaba completamente por debajo de la línea de corte, se usó 100 como título en todos los análisis de datos y en las figuras.

Como se muestra en la figura 8A, después de la dosis 2 (día 42), la PCV24 formulada con CLA-LNP da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA (círculos). La PCV24 formulada con CLA-SNE (295 µg de CLA con 2,5 mg de escualeno; 0,25 mg de PS-20; 0,25 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, mostrado como triángulos) o CLA-SNE (295 µg de CLA con 0,5 mg de escualeno; 0,05 mg de PS-20; 0,05 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, mostrado como rombos) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA. Las PCV13 y PCV24/APA tienen una inmunogenicidad comparable para los serotipos (ST) en común, excepto para ST5 que demuestra una mayor inmunogenicidad para PCV24/APA (cuadrados).

La PCV24 formulada con CLA-SNE (60 µg de CLA con 2,5 mg de escualeno; 0,25 mg de PS-20; 0,25 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, mostrado como círculos), CLA-SNE (120 µg de CLA con 2,5 mg de escualeno; 0,25 mg de PS-20; 0,25 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, mostrado como triángulos) o CLA-SNE (295 µg de CLA con 2,5 ml de escualeno; 0,25 mg de PS-20; 0,25 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, mostrado como rombos) da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV24 formulada con APA en PD1 (figura 8B), PD2 (figura 8C) y PD3 (figura 8D). Cabe señalar que la PCV24 formulada con CLA-SNE a 120 µg de CLA usando 0,08 mg de escualeno; 0,008 mg de PS-20; 0,008 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml, da lugar a una inmunogenicidad comparable en comparación con PCV24 formulada con CLA-SNE a 120 µg (CLA) y formulada con 0,5 mg de escualeno; 0,05 mg de PS-20; 0,05 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml o PCV formulada con CLA-SNE a 295 µg de CLA con 2,5 mg de escualeno; 0,25 mg de PS-20; 0,24 mg de SPAN-85 por dosis de 0,1 ml (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Protección por PCV24 contra la exposición en ratones

Se inmunizaron por vía intramuscular (IM) ratonas Swiss Webster jóvenes (6-8 semanas de edad, n = 10/grupo) con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada de 24 serotipos (PCV24) los días 0, 14 y 28. Se dosificó PCV24 a 0,4 µg de PnPs (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, des-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B) cada uno conjugado con CRM197 por inmunización. La PCV24 se formuló con varios sistemas adyuvantes, como se describe en la tabla 7. Los ratones fueron observados a diario por

personal capacitado en el cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que las formulaciones de vacunas en ratones eran seguras y bien toleradas, ya que no se observaron acontecimientos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo experimental de ratón fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ, EE. UU.).

El día 53, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se expusieron por vía intratraqueal con serotipo 24F de *Streptococcus pneumoniae*. En resumen, los cultivos de fase exponencial de *Streptococcus pneumoniae* se centrifugaron, se lavaron y se suspendieron en PBS estéril. Se colocaron 4,6 x 10⁶ ufc de *Streptococcus pneumoniae* en 0,1 ml de PBS en la garganta de ratones colgados en posición vertical por sus incisivos. La aspiración de las bacterias se indujo tirando suavemente de la lengua hacia afuera y tapando las fosas nasales. Los ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron si la pérdida de peso superaba el 20 % del peso inicial. Se extrajo sangre a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la exposición para evaluar la bacteriemia. Los ratones fueron observados al menos dos veces al día por personal capacitado en el cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia.

Los ratones inmunizados con vacunas con adyuvante (CLA-LNP, CLA-SNE o SNE sola) que contenían PCV24 estaban protegidas de la provocación intratraqueal con el serotipo 24F (figura 9). Todos los ratones inmunizados con la formulación de PCV24 que contenía adyuvantes tenían una tasa de supervivencia del 100 % en comparación con la tasa de supervivencia del 10 % de los ratones sin tratamiento previo a los 7 días después de la exposición. Estos datos demuestran que PCV24 con formulaciones de adyuvantes fueron capaces de proteger a los ratones de la exposición IT al serotipo 24F.

Tabla 7: PCV24 formulada con adyuvantes usados para inmunizar ratones en el modelo de exposición intratraqueal a *Streptococcus pneumoniae* 24F

Formulaciones
PCV24 en L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, sacarosa al 5 % (p/v), NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [1200 µg/ml de CLA-LNP]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20

[1200 µg/ml de CLA-SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]

PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20

[SNE (25 mg/ml de escualeno; 2,5 mg/ml de PS-20; 2,5 mg/ml de SPAN-85)]

Ejemplo 10: Influencia del tiempo y la temperatura en la estabilidad física de la formulación de nanoemulsión usando NTA y DLS

Como se muestra en la figura 10, para evaluar la estabilidad de los sistemas de nanoemulsión (CLA-SNE o SNE), preparados como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente, se utilizó el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). La técnica recopila videos de poblaciones de nanopartículas rastreadas directamente a medida que se mueven por movimiento browniano para extrapolar el tamaño y la concentración de partículas. Un láser de clase 1 de 635 nm enfoca un rayo láser rojo de 80 mm a través de la muestra líquida, iluminando las partículas como puntos de luz que se difunden rápidamente. Una cámara CCD graba un vídeo a 30 fotogramas por segundo para rastrear el movimiento de cada partícula iluminada individual a lo largo del tiempo. El programa informático del sistema identifica el centro de cada partícula individual del vídeo y rastrea la distancia recorrida independientemente para determinar el desplazamiento cuadrático medio. Este rastreo se realizó simultáneamente para cada partícula dentro de la población de muestras en cada fotograma hasta que se analizan los datos sin procesar recopilados del vídeo completo. Al medir simultáneamente el desplazamiento cuadrático medio de cada partícula individual rastreada, su coeficiente de difusión (Dt) y el radio hidrodinámico equivalente esférico (r_h) se determinaron aplicando la ecuación de Stokes-Einstein. A continuación, el programa informático representa estos datos acumulados como una distribución de tamaño de partícula y concentración. Se recopiló información de datos sin procesar no solo sobre el tamaño y la concentración de las partículas, sino también la intensidad o el brillo de la partícula individual. Tomados en conjunto, los datos se ajustaron y se representaron gráficamente de forma individual como intensidad de partícula en relación con el tamaño de partícula y concentración de partícula en relación con el tamaño de partícula, y después en gráficos de contorno tridimensionales que comparan el tamaño de partícula, la concentración y la intensidad de todas las poblaciones de partículas.

Tras la exposición de las formulaciones de nanoemulsión (CLA-SNE o SNE) a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante hasta 1 mes, no se observó ningún cambio significativo en la

concentración de partículas o la distribución del tamaño de las nanoemulsiones según se evaluó usando NTA (figura 10).

Una nanoemulsión puede ser susceptible de agregación dentro del intervalo de tamaño de partícula de 10-1000 nm, lo que hace que DLS sea una técnica indicadora de estabilidad adecuada para evaluar y cuantificar fenómenos de agregación. Para evaluar la estabilidad de los sistemas de nanoemulsión, preparados como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente, se utilizó dispersión dinámica de la luz (DLS) para medir la distribución del tamaño de partícula promedio. Los instrumentos de DLS usan un láser para iluminar partículas en una solución y después examinan los cambios en la intensidad de la luz dispersa a lo largo del tiempo como resultado del movimiento browniano. La correlación de la intensidad de la luz dispersa a lo largo del tiempo con la intensidad en el tiempo cero da lugar a una curva de degradación exponencial o función de correlación. La tasa de degradación en la función de correlación con respecto al tiempo es mucho más rápida para partículas menores que para partículas mayores y esto forma la base del cálculo de los tamaños de partículas. Tras la exposición de la nanoemulsión a 4 °C, 25 °C o 37 °C durante hasta 1 mes, no se observó ningún cambio en la distribución de tamaños de las nanoemulsiones por DLS (figura 11). El promedio Z permaneció a aproximadamente 110 nm a 180 nm para la CLA-SNE o SNE.

Ejemplo 11: Influencia del tiempo y la temperatura en la estabilidad química de la formulación de nanoemulsión usando UPLC-CAD

Para evaluar la estabilidad química de los sistemas de nanoemulsión, preparados como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente, se utilizó cromatografía líquida de ultrarrendimiento junto con un detector de aerosol de carga (UPLC-CAD) para medir la estabilidad de la CLA (solo CLA-SNE) y la concentración de escualeno tras el almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante 1 mes. Tras la exposición de la nanoemulsión a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante hasta 1 mes, la concentración de CLA (figura 12A) o escualeno (figura 12B) en la SNE no se vio afectada. Por otra parte, UPLC-CAD puede cuantificar la producción de productos de degradación como resultado de la degradación química de escualeno o CLA. Tras la exposición de los sistemas adyuvantes SNE o CLA-SNE a temperatura elevada, no se observaron picos de degradación detectables, lo que indica que los componentes de escualeno y CLA de los sistemas adyuvantes CLA-SNE y SNE tienen una excelente estabilidad térmica (datos no mostrados).

Ejemplo 12: Influencia del sistema de emulsión estable (+/- CLA) en la estabilidad de una

vacuna neumocócica conjugada

Se usaron conjugados neumocócicos individuales de polisacárido-proteína transportadora preparados utilizando disolventes de aminación reductora (DMSO aprótico) para la formulación de PCV24 a 192 µg/ml, como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente.

La composición de PCV24 se combinó con diferentes sistemas adyuvantes, descritos en la tabla 8, en un recipiente de vidrio y se colocaron a 4 °C hasta 30 días. La formulación demostró buena estabilidad y coformulación con CLA-SNE (1,2 mg/ml de CLA-SNE [6,5 mg/ml de escualeno; 0,65 mg/ml de PS-20; 0,65 mg/ml de SPAN-85] o 1,2 mg/ml de CLA-SNE [1,2 mg/ml de escualeno; 0,12 mg/ml de PS-20; 0,12 mg/ml de SPAN-85] o SNE ([6,5 mg de escualeno; 0,65 mg de PS-20; 0,65 mg de SPAN-85] o [0,4 mg de escualeno; 0,04 mg de PS-20; 0,04 mg de SPAN-85] no afectó a la estabilidad de la dosis de conjugado neumocócico de polisacárido-proteína transportadora (figura 13A-13D) usando un ensayo ELISA basado en fluorescencia.

Tabla 8: Sumario de formulaciones de PCV24 preparadas con adyuvantes CLA-SNE o SNE

Formulaciones
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [1,2 mg/ml de CLA-SNE (6,5 mg/ml de escualeno; 0,65 mg/ml de PS-20; 0,65 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [1,2 mg/ml de CLA-SNE (1,2 mg/ml de escualeno; 0,12 mg/ml de PS-20; 0,12 mg/ml de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [SNE (6,5 mg de escualeno; 0,65 mg de PS-20; 0,65 mg de SPAN-85)]
PCV24 en L-histidina 10 mM, NaCl 75 mM, 0,05 % p/v de PS-20 [SNE (0,4 mg de escualeno; 0,04 mg de PS-20; 0,04 mg de SPAN-85)]

Ejemplo 13: Inmunogenicidad de PCV21 en macacos de la India adultos

PCV21 (Serotipos- 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B des-O-acetilado (deOAc15B), 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, cada uno conjugado individualmente con CRM197) también se evaluó en un modelo de inmunogenicidad de macaco de la India adulto, como se ha descrito en los ejemplos, mencionados anteriormente. Los

macacos de la India se inmunizaron por vía intramuscular con PCV21 solo o PCV21 formulado con CLA formulado como SNE (CLA-SNE) (tabla 9) los días 0 y 28. Se dosificó PCV21 a 1,0 µg de PnPs en un volumen de 0,25 ml por inmunización. Los sueros se recogieron antes del inicio del estudio (preinmunitario, día 0) y los días 14 (PD1), 28 (PD1) y 42 (PD2).

- 5 Tabla 9: Formulaciones de PCV21 evaluadas en un modelo de inmunogenicidad de macacos de la India adultos

Formulación
PCV21 en L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % p/v de PS-20 [sin adyuvante]
PCV21 en L-histidina 20 mM, NaCl 112,5 mM, 0,75 % p/v de PS-20 [1,2 mg/ml de CLA-SNE (1,2 mg/ml de escualeno; 0,12 mg/ml de PS-20; 0,12 mg/ml de SPAN-85)]

- Para evaluar las respuestas de inmunogenicidad de IgG específicas de serotipo en una vacuna de 21 serotipos, se desarrolló un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) múltiple. Este ensayo se desarrolló para su uso con suero de macaco de la India en función de ensayos previos descritos por Marchese *et al.* y Skinner *et al.* (Marchese R.D. *et al.*, Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16 (3): 387-96 y Skinner, J.M. *et al.*, Vaccine (2011) 29 (48): 8870-8876). La tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (un departamento de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) utiliza polisacáridos de serotipos neumocócicos (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, deOAc15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B) aplicados sobre manchas en una placa de 96 pocillos y un anticuerpo marcado con SULFO-TAG™ que emite luz tras la estimulación electroquímica. Se usó IgG anti-humana marcada con SULFO-TAG™ como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de macaco de la India. La concentración de IgG se interpoló a partir del patrón de suero de referencia 007sp para las figuras 14A, 14B y 14C. El anticuerpo funcional se determinó a través de ensayos opsonofagocíticos múltiples (MOPA) basados en protocolos descritos anteriormente disponibles en el Laboratorio de Referencia de Neumococos de la UAB (Laboratorio de Referencia de la Universidad de Alabama en la Biblioteca de Referencia de Patógenos Respiratorios Bacterianos de Birmingham) y el software Opsotiter® 3 propiedad de y con licencia de la Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) (véase, Carro-Aguilar I. *et al.*, Vaccine (2017) 35 (6): 865-72 y Burton R.L. y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Se encontró que la PCV21 formulada con la CLA-SNE preparada a 1,2 mg/ml de CLA-SNE con (1,2 mg/ml de escualeno; 0,12 mg/ml de PS-20; 0,12 mg/ml de SPAN-85) era inmunogénica en macacos de la India adultos y dio lugar a una mayor inmunogenicidad después de la dosis 1 (día 14 - figura 14A; día 28-figura 14B) y después de la dosis 2 (día 42 figura 14C) en comparación con PCV21 formulada sin adyuvante. La PCV21 formulada con CLA-SNE a un nivel de dosis de 300 µg da lugar a una inmunogenicidad igual o mejor en comparación con PCV21 formulada sin adyuvante para después de la dosis 1 (PD1) y después de la dosis 2 (PD2).

Estas mismas formulaciones generaron anticuerpos funcionales que destruyeron las cepas bacterianas de tipo vacuna en todos los puntos temporales probados y, de nuevo, la CLA-SNE potenció la respuesta de PCV21 en comparación con PCV21 formulada sola. Todos los puntos temporales del estudio se probaron en MOPA como muestras agrupadas o individuales. No se observó mucha diferencia en los títulos de OPA entre PD1 y PD2 (datos no mostrados).

Se evaluaron sueros de macacos de la India adultos inmunizados con PCV21 para determinar la reactividad cruzada con otras bacterias *Streptococcus pneumoniae*. Los sueros de macacos inmunizados con PCV21 tenían reactividad cruzada con los serotipos 6C (figuras 14A, 14B y 14C) y 15B (figuras 14A, 14B y 14C). La reactividad cruzada con 6C probablemente se deba a la inmunización con conjugado de polisacárido 6A-CRM197 como parte de una PCV24 multivalente (Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU). La vacuna antineumocócica conjugada de 13 serotipos (PCV13) induce respuestas de muerte opsonofagocítica de función cruzada en seres humanos para serotipos 6C y 7A de *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. 2011; 29:7207-11). De forma similar, la inmunización con conjugados de polisacáridos des-O-Ac-15B-CRM197 (desOA15B-CRM197) como parte de una PCV multivalente dio lugar a reactividad cruzada con el serotipo 15C (Rajam *et al.*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14 (9): 1223–1227).

Ejemplo 14: Preparación de un sistema adyuvante de nanoemulsión estable (SNE) con y sin el lípido catiónico, (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13, 16-dien-1-amina) mediante autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos (MNS)

El adyuvante de nanoemulsión estable se prepara con y sin el lípido catiónico ionizable (13Z,16Z)-N, N-dimetil-3-nonildocosa-13, 16-dien-1-amina), también denominado CLA (figura 1). El proceso de autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos (MNS) usado para preparar una SNE. La SNE es una formulación de emulsión de múltiples componentes que

consiste en 3 ingredientes estabilizadores; escualeno, trioleato de sorbitán (SPAN-85) y polisorbato-20 (PS-20) con CLA (denominada CLA-SNE, tabla 10) o sin CLA (denominada SNE, tabla 11). Las características biofísicas (por ejemplo, tamaño de partícula, composiciones químicas) y la estabilidad de las formulaciones de SNE/CLA-SNE preparadas con MNS es muy similar al proceso de homogeneización fina de alta presión para la preparación de formulaciones de SNE/CLA-SNE descritas en el ejemplo 3. Esencialmente, el proceso de autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos (MNS) descrito en este ejemplo es un proceso alternativo para preparar un sistema adyuvante de nanoemulsión estable (SNE). El proceso de autoensamblaje de nanopartículas descrito en este ejemplo se realizó usando un instrumento de mezcla de etanol/acuoso de "microfluidos". Sin embargo, el proceso de autoensamblaje de nanopartículas de etanol/corriente acuosa descrito en la presente invención no está limitado por la mezcla de "microfluidos". La mezcla de corrientes de mayor volumen de disolventes hidrófobos con soluciones acuosas se puede lograr usando un proceso de mezcla en T perfilado en el ejemplo 4.

En general, las formulaciones de SNE MNS se pueden preparar disolviendo el lípido catiónico, escualeno, SPAN-85 y PS-20 en las concentraciones diana en un disolvente no acuoso apropiado tal como el etanol. El procedimiento de autoensamblaje implica combinar una corriente de los componentes de la emulsión hidrófoba disueltos en etanol con una corriente de la solución de emulsión acuosa. A medida que se combinan las dos corrientes de disolvente, las moléculas hidrófobas (es decir, el lípido catiónico, escualeno, SPAN-85 y PS-20) interactúan con el disolvente acuoso. A continuación, las moléculas se ensamblan en una emulsión de partículas nanométricas, como se describe a continuación. Tras la formación de la emulsión autoensamblada de nanopartículas, el etanol residual puede eliminarse de la emulsión de escualeno estable por varios medios adecuados. En este ejemplo, el etanol se redujo a menos del 0,1 % (p/v) mediante diálisis durante una noche con el tampón acuoso. La formulación de SNE resultante se esterilizó por filtración a través de un filtro de esterilización con un tamaño de poro de 0,2 μm . Varios parámetros de proceso dentro de cada etapa, tales como el orden o la adición, los tiempos de mezcla, la temperatura, la concentración de componentes no acuosos, concentraciones de componentes de tampón acuoso, el pH acuoso, la relación de mezcla de solución no acuosa con respecto a solución acuosa, el caudal total y los volúmenes de desecho de residuos se controlaron para producir sistemas adyuvantes de SNE con los atributos deseados.

Tabla 10 Composición del adyuvante CLA-SNE preparado por MNS

Componente	Descripción	Contenido de cada lípido (% molar)	Peso molecular (g/mol)	Contenido de cada lípido (% en masa)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina	4 - 45 %	475,9	4 - 46 %
Escualeno	escualeno	52 - 89 %	410,72	45 - 80 %
SPAN-85	trioleato de sorbitán	2 - 4 %	957,5	4 - 8%
PS-20	polisorbato-20	2 - 3 %	1228	4 - 8%
Matriz de tampón	histidina 20 mM, pH 5,8	N/D		

Tabla 11: Composición del adyuvante SNE preparado por MNS

Componente	Descripción	Contenido de cada lípido (% molar)	Peso molecular (g/mol)	Contenido de cada lípido (% en masa)
Escualeno	escualeno	92,9 %	410,72	83,3%
SPAN-85	trioleato de sorbitán	4,0%	957,5	8,3%
PS-20	polisorbato-20	3,1%	1228	8,3%
Matriz de tampón	histidina 20 mM, pH 5,8	N/D		

Preparación de la formulación mediante el autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos

5 En este ejemplo, se prepararon una formulación de SNE y cuatro formulaciones de CLA-SNE mediante el procedimiento de autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos en histidina 20 mM pH 5,8 para la caracterización biofísica. El proceso de nanoemulsión autoensamblada comienza con 15 mg/ml de escualeno, 1,5 mg/ml de SPAN-85 y 1,5 mg/ml de PS-20 completamente disueltos en etanol. Además, cada una de las soluciones de etanol descritas anteriormente también contenía CLA a 0,75, 1,5, 5,0 o 15,0 mg de CLA/ml. Por tanto, el % (p/p) inicial "diana" de CLA/escualeno para las cinco formulaciones sería 0,0, 5,0, 10,0, 33,3 y 100 % (p/p) de CLA/escualeno. El tampón acuoso para todas las formulaciones fue histidina 20 mM a pH 5,8. Un instrumento NanoAssemblr™ de sobremesa de Precision NanoSystems, Inc. 15 (Vancouver, BC, Canadá) se usó para autoensamblar la SNE y cuatro nanoemulsiones adyuvantes CLA-SNE

Las formulaciones de nanopartículas de escualeno autoensambladas se prepararon de la siguiente manera. Se llenó una jeringa de 1 ml con un poco más de 0,7 ml de la mezcla de compuestos hidrófobos disuelta en etanol, mientras que una jeringa de 3 ml se llenó con un poco más de 1,4 ml del tampón acuoso de histidina 20 mM pH 5,8. Después de cargar ambas jeringas 20

con la cantidad adecuada de solución, las jeringas se unieron al instrumento NanoAssemblr™. Los siguientes parámetros de mezcla de microfluidos se programaron en el NanoAssemblr™: a) Volumen total = 2 ml, b) Relación de caudal = 2:1 (acuoso con respecto a etanol), c) Caudal total = 12 ml/min, d) Volumen de residuo inicial = 0,25 ml y e) Volumen de residuo final = 0,05 ml. El instrumento se activó para iniciar el proceso de mezcla de etanol y solución acuosa en tan solo unos segundos. Se recogieron aproximadamente 2,0 ml de emulsión de nanopartículas después de la mezcla en aproximadamente 30 % de etanol en un tubo Falcon de 15 ml para cada una de las 5 formulaciones. Se usó un nuevo cartucho de mezcla NanoAssemblr™ para cada una de las 5 formulaciones diferentes de SNE y CLA-SNE descritas anteriormente. La concentración de etanol se reduce en cada formulación mediante diálisis durante una noche. Después de la diálisis, todas las muestras se almacenaron a 4 °C antes de la caracterización analítica.

Caracterización analítica

El lípido catiónico, CLA y escualeno se incorporaron igualmente en las nanopartículas de CLA-SNE de escualeno preparadas por MNS como se muestra en la figura 15A. La relación en % (p/p) de CLA/escualeno después de la diálisis (es decir, el eje y) para eliminar el etanol del proceso se comparó con el % de CLA/escualeno (p/p) antes del autoensamblaje (es decir, el eje x) en la solución de etanol para todas las muestras de formulación descritas en este ejemplo. El % (p/p) de CLA/escualeno "medido" después de MNS y la diálisis era igual al % (p/p) "diana" hasta al menos 35 % (p/p). Incluso a un % (p/p) de CLA/escualeno "diana" del 100 % antes del autoensamblaje, más del 70 % del CLA disponible se incorpora a las nanopartículas de CLA-SNE en relación con el contenido de escualeno en la emulsión de nanopartículas preparada con MNS. Las relaciones en % (p/p) de CLA/escualeno se midieron mediante UPLC-CAD de fase inversa. El CLA se incorpora claramente a CLA-SNE mediante la preparación mediante el proceso de autoensamblaje de nanoemulsión de microfluidos (MNS).

Los diámetros DLS Z promedio ponderados por intensidad de las formulaciones de CLA-SNE preparadas con el proceso MNS se midieron usando un Malvern ZetaSizer Ultra. Se diluyeron alícuotas de muestras de CLA-SNE después de la diálisis de cada formulación a 50 o 100 veces en 2,0 ml de tampón de histidina 20 mM, pH 5,8. El diámetro promedio de DLS y la desviación típica se representaron gráficamente frente al % (p/p) de CLA/escualeno medido después de la diálisis para cada formulación y se muestra en la figura 15B. Se realizaron tres

mediciones de DLS a temperatura ambiente para cada formulación. Las barras de desviación típica se muestran a menos que la desviación típica sea menor que la imagen del punto de datos. Los diámetros de DLS Z promedio ponderados por intensidad de CLA-SNE preparada con MNS oscilaron entre aproximadamente 150 y 280 nm, que es similar a las nanopartículas de CLA-SNE preparadas mediante homogeneización a alta presión. Se controlaron diversos parámetros del proceso MNS, tales como los descritos anteriormente en este ejemplo, para producir sistemas adyuvantes CLA-SNE con los diámetros deseados.

El potencial Zeta medido de las formulaciones de nanopartículas de escualeno CLA-SNE a pH 5,5 preparadas con el proceso MNS se muestra en la figura 15C. El potencial Zeta se midió usando un Malvern ZetaSizer Ultra. Se diluyeron alícuotas de muestras de CLA-SNE después de la diálisis de cada formulación a 50 o 100 X en 2,0 ml de tampón de propano de citrato BIS TRIS 20 mM a pH 5,5. Se realizaron tres mediciones de potencial Zeta a temperatura ambiente para cada formulación. Las barras de desviación típica se muestran a menos que la desviación típica sea menor que la imagen del punto de datos. El potencial Zeta de la formulación CLA-SNE con 0 % (p/p) de CLA, es decir, sin CLA, fue de aproximadamente 5 mV. Como se ilustra en la figura 15C, la adición de CLA aumentó significativamente el potencial Zeta de las nanopartículas a aproximadamente +10 mV.

Ejemplo 15: Optimización de la preparación de CLA-SNE por alteración del pH de la fase acuosa.

El proceso de CLA-SNE implica el uso de una molécula de CLA catiónica reversible con una pKa observada de 6,4. La adición de CLA al proceso de preparación de SNE y la matriz final con un pH de 5,8 da lugar a la protonación de CLA, que actúa para dar una carga neta positiva general a las partículas de CLA-SNE, así como a cualquier producto intermedio del proceso de preparación. La preparación de CLA-SNE culmina en un acontecimiento de filtración de 0,8/0,2 μm , una etapa del proceso que había resultado difícil de realizar, observándose uniformemente una obstrucción significativa del filtro y un bajo rendimiento del producto. Sin embargo, la filtración de SNE no demostró la misma magnitud de estos problemas de filtración y fue una etapa de filtración de nanoemulsión más eficiente. Cabe destacar que, sin CLA presente, la SNE no porta la fuerte carga positiva observada con CLA-SNE. En un intento de preparar una CLA-SNE sin carga para una etapa de filtración de CLA-SNE de mayor eficiencia, se realizó una serie de experimentos en los que se ajustó el pH de la fase acuosa (L-histidina 20 mM) antes de su uso en la preparación de CLA-SNE. Se preparó L-

histidina 20 mM con dianas de pH de 5,0, 5,7, 5,8, 6,0, 6,2, 7,0 y 7,7. A continuación, cada tampón se usó como fase acuosa durante el proceso de preparación de CLA-SNE con una diana de formulación diana de CLA 15 mg/ml, La preparación de CLA-SNE se realizó exactamente como se ha descrito en el ejemplo 3. Al finalizar la etapa del proceso de homogeneización, el tamaño de partícula del intermedio de CLA-SNE se midió mediante DLS usando un Malvern Panalytical Nano ZS. A continuación se realizó filtración con filtro PES de 0,8/0,2 μm . La distribución del tamaño de las partículas se midió después de la filtración mediante DLS y se cuantificó [CLA] mediante UPLC-CAD. Para muestras de CLA-SNE preparadas con L-histidina 20 mM con pH 7,0 o 7,7, se observó una obstrucción completa del filtro inmediatamente después de la aplicación del material al filtro y no fue posible la recogida del material filtrado, lo que imposibilitó la cuantificación mediante DLS o UPLC-CAD, los valores de 0 se presentan con fines ilustrativos. En muestras prefiltradas, se observó una tendencia de aumento del tamaño de partícula por DLS a medida que aumentaba el pH del tampón de fase acuosa (figura 16). Esta relación se mantuvo en las muestras posteriores al filtrado y cada muestra de CLA-SNE demostró una modesta reducción en el tamaño de partícula posterior a la filtración, con la obvia excepción de las muestras de pH 7,0 y 7,7 que demostraron de nuevo una obstrucción completa del filtro inmediatamente y no fue posible la recuperación del material. Para muestras después de la filtración, se observó que [CLA] disminuye en el material CLA-SNE final a medida que aumenta el pH de la fase acuosa (figura 17). Esta relación demuestra que la preparación de CLA-SNE usando una fase acuosa a un pH menor da lugar a un aumento del rendimiento del proceso en la filtración terminal y un proceso de fabricación de SLA-CAN más eficiente.