

**COMPOSICIONES INMUNÓGENAS QUE COMPRENDEN ANTÍGENOS DE
SACÁRIDO CAPSULAR CONJUGADOS, KITS QUE LAS COMPRENDEN Y SUS
USOS**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevas composiciones inmunógenas que comprenden antígenos de sacárido capsular conjugados (glucoconjugados), kits que comprenden tales composiciones inmunógenas y sus usos. En general, las composiciones inmunógenas de la presente invención comprenden glucoconjugados, en donde los sacáridos se derivan de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. La invención también se refiere a la vacunación de sujetos humanos, en particular, niños y personas mayores, contra infecciones neumocócicas usando tales composiciones inmunógenas y kits novedosos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las infecciones causadas por neumococos son una causa importante de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Neumonía, bacteriemia febril y meningitis son las manifestaciones más comunes de la enfermedad neumocócica invasiva, mientras que la propagación bacteriana dentro de las vías respiratorias puede producir infección del oído medio, sinusitis o bronquitis recurrente. En comparación con la enfermedad invasiva, las manifestaciones no invasivas son generalmente menos graves, pero considerablemente más comunes.

En Europa y en los Estados Unidos de América, la neumonía neumocócica es la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad más común, que se estima que afecta a aproximadamente 100 de cada 100.000 adultos cada año. Las cifras correspondientes a bacteriemia febril y meningitis son 15–19 de cada 100 000 y 1–2 de cada 100.000, respectivamente. El riesgo de una o más de estas manifestaciones es mucho más alto en niños y personas mayores, así como en personas inmunodeprimidas de cualquier edad. Aun en regiones desarrolladas económicamente, la enfermedad neumocócica invasiva tiene una alta mortalidad; en adultos con neumonía neumocócica, la tasa de mortalidad promedio es de 10 %–20 % aunque puede exceder el 50 % en los grupos de alto riesgo. La neumonía es sin duda la causa más común de muerte neumocócica en el mundo.

El agente etiológico de las enfermedades neumocócicas, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), es un coco encapsulado gram positivo, rodeado por una

cápsula de polisacárido. Las diferencias en la composición de esta cápsula permiten la diferenciación serológica entre alrededor de 91 tipos capsulares, algunos de los cuales están frecuentemente asociados a la enfermedad neumocócica, otros raramente. Las infecciones neumocócicas invasivas incluyen neumonía, meningitis y bacteriemia febril; entre las manifestaciones no invasivas comunes se encuentran otitis media, sinusitis y bronquitis.

Las vacunas neumocócicas conjugadas (PCV) son vacunas neumocócicas usadas para brindar protección contra la enfermedad causada por *S. pneumoniae* (neumococo). Actualmente existen tres vacunas PCV disponibles en el mercado global: PREVNAR® (PREVENAR® en algunos países) (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® (una vacuna decavalente) y PREVNAR 13® (PREVENAR 13® en algunos países) (vacuna tridecavalente).

El reciente desarrollo de la resistencia microbiana generalizada a antibióticos esenciales y la cantidad en aumento de personas inmunodeprimidas enfatizan la necesidad de vacunas neumocócicas con una protección aun más amplia.

En particular, es necesario abordar la necesidad médica insatisfecha restante de cobertura de la enfermedad neumocócica debido a los serotipos que no están en PREVNAR 13® y la posibilidad de surgimiento de serotipos no PREVNAR 13®. Los serotipos específicos que causan la enfermedad más allá del 13 en PREVNAR 13® varían según la región, población, y pueden cambiar con el tiempo debido a la adquisición de resistencia antibiótica, la introducción de vacunas neumocócicas y tendencias seculares de origen desconocido. Existe una necesidad de composiciones inmunógenas que se pueden usar para inducir una respuesta inmunitaria contra serotipos de *Streptococcus pneumoniae* adicionales en seres humanos y, en particular, en niños menores de 2 años.

Un objeto de las nuevas composiciones inmunógenas de la presente invención es brindar protección adecuada contra los serotipos de *S. pneumoniae* que no están en PREVNAR 13®. En un aspecto, un objeto de las composiciones inmunógenas de la presente invención es brindar protección adecuada contra los serotipos de *S. pneumoniae* que no están PREVNAR® (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® y/o PREVNAR 13® mientras se mantiene una respuesta inmunitaria contra serotipos actualmente cubiertos por tales vacunas.

El fenómeno de la competencia antigénica (o interferencia) dificulta el desarrollo de vacunas multivalentes. La interferencia antigénica se refiere a la observación de que la administración de múltiples antígenos puede producir una

menor respuesta a determinados antígenos con respecto a la respuesta inmunitaria observada cuando dichos antígenos se administran individualmente. No se puede predecir su aparición cuando se hacen nuevas combinaciones de antígenos.

Un objeto de las composiciones inmunógenas, los kits y los programas de administración de la presente invención es brindar protección adecuada contra serotipos de *S. pneumoniae* que no se encuentran en PREVNAR 13[®] mientras se mantiene una respuesta inmunitaria contra serotipos actualmente cubiertos por esa vacuna, y minimizar el riesgo de interferencia inmunitaria.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Para satisfacer estas y otras necesidades, la presente invención se refiere a composiciones inmunógenas novedosas, kits que las comprenden y sus usos. Las siguientes cláusulas describen algunos aspectos y formas de realización de la invención.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado seleccionado del grupo que consiste en un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, en donde tal composición es una composición neumocócica conjugada de valencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena que comprende tal composición inmunógena; y (b) una segunda composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

En otro aspecto, la invención proporciona tal composición inmunógena para administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial.

Un aspecto de la invención proporciona tal composición inmunógena para usar en un programa de vacunación. En una forma de realización, el programa de vacunación es un programa de dosis única. En otra forma de realización, el programa de vacunación es un programa de dosis múltiple.

En un aspecto, el kit es para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

Otro aspecto de la invención proporciona tal composición inmunógena o kit es

para usar como un medicamento.

En un aspecto de la invención, tal composición inmunógena o kit es para usar como una vacuna.

Otro aspecto de la invención proporciona tal composición inmunógena o kit para usar en un método para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto.

En otro aspecto de la invención, tal composición inmunógena o kit es para usar en un método para prevenir una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto.

Un aspecto de la invención proporciona tal composición inmunógena o kit para usar en un método para proteger o tratar un ser humano susceptible a infección neumocócica, mediante la administración de tales composiciones inmunógenas a través de una vía sistémica o mucosa.

FIGURAS

La **Figura 1** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 8 (Pn-8).

La **Figura 2** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 10A (Pn-10A).

La **Figura 3** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 11A (Pn-11A).

La **Figura 4** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 12F (Pn-12F).

La **Figura 5** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B (Pn-15B).

La **Figura 6** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 22F (Pn-22F).

La **Figura 7** muestra una estructura de polisacárido de repetición de un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 33F (Pn-33F).

La **Figura 8** muestra un diagrama de flujo de un proceso representativo para los procesos de activación (A) y conjugación (B) que se pueden usar para la preparación del glucoconjugado de Pn-33F.

La **Figura 9** muestra el efecto en DO mediante la variación de la cantidad de NCS en la reacción de oxidación de TEMPO/NCS.

La **Figura 10** muestra la evaluación de la estabilidad de los glucoconjugados de Pn-12F.

Figura 11 Respuestas OPA multifuncionales. Un subconjunto de 59 sueros de adultos vacunados con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio estadounidense 6115A1-004; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00427895) se evaluó en OPA para determinar la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. El porcentaje de muestras con títulos OPA positivos (es decir, $\geq 1:8$) se indica arriba de cada grupo. Los títulos de la media geométrica (GMT) se enumeran en el eje x debajo de cada grupo.

Figura 12 Respuestas OPA multifuncionales de 66 sueros previos/posteriores coincidentes. Un subconjunto de un panel de 66 sueros antes y después de la vacunación coincidentes de adultos vacunados con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572) se evaluó en OPA para determinar la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. El porcentaje de muestras con títulos OPA positivos (es decir, $\geq 1:8$) se indica arriba de cada grupo. Los títulos de la media geométrica (GMT) se enumeran en el eje x debajo de cada grupo.

Figura 13 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de serotipo neumocócico 9V (Pn9V) antes y después de la inmunización.

Curvas de distribución acumulativa inversas de títulos OPA con respecto al serotipo 9V de un panel de suero coincidente antes y después de la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de suero con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 14 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de serotipo neumocócico 9A (Pn9A) antes y después de la inmunización.

Curvas de distribución acumulativa inversas de títulos OPA con respecto al serotipo 9A de un panel de suero coincidente antes y después de la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de suero con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 15 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de serotipo neumocócico 9L (Pn9L) antes y después de la inmunización.

Curvas de distribución acumulativa inversas de títulos OPA con respecto al serotipo 9L de un panel de suero coincidente antes y después de la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572). Los gráficos

representan el porcentaje de suero con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 16 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de serotipo neumocócico 9N (Pn9N) antes y después de la inmunización.

Curvas de distribución acumulativa inversas de títulos OPA con respecto al serotipo 9N de un panel de suero coincidente antes y después de la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de suero con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

1. Glucoconjugados de la invención

En general, las composiciones inmunógenas de la presente invención comprenderán antígenos de sacárido capsular conjugados (también denominados glucoconjugados), en donde los sacáridos se derivan de los serotipos de *S. pneumoniae*.

Si el portador de proteínas es el mismo para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos se pueden conjugar con una misma molécula del portador de proteínas (moléculas portadoras que tienen 2 o más sacáridos diferentes conjugados con ellas) [véase, por ejemplo, WO2004/083251].

En una forma de realización preferida, sin embargo, los sacáridos se conjugan individualmente con diferentes moléculas del portador de proteínas (cada molécula del portador de proteínas solo tiene un tipo de sacárido conjugado con ella). En dicha forma de realización, se considera que los sacáridos capsulares se conjugan individualmente con la proteína portadora.

A los fines de la invención, el término 'glucoconjugado' indica un sacárido capsular ligado de manera covalente a una proteína portadora. En una forma de realización, un sacárido capsular está ligado directamente a una proteína portadora. En una segunda forma de realización, un sacárido bacteriano está ligado a una proteína mediante un espaciador/ligador.

1.1 Proteína portadora de la invención

Un componente del glucoconjugado de la invención es una proteína portadora que se conjuga con el sacárido. En la presente, las expresiones "portador de proteínas" o "proteína portadora" o "portador" se pueden usar indistintamente. Las proteínas portadoras deben poder modificarse con procedimientos de conjugación estándares.

En una forma de realización preferida, la proteína portadora de los glucoconjugados se selecciona del grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT

(toxóide tetánico) o fragmento C de TT, CRM₁₉₇ (una variante no tóxica pero antigénicamente idéntica de la toxina diftérica), otros mutantes de DT (tales como CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al. (1973) J. Biol. Chem. 218:3838-3844), CRM9, CRM102, CRM103 o CRM107; y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en *Genetically Engineered Toxins*, ed.: Frankel, Maecel Dekker Inc. (1992); eliminación o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en las patentes estadounidenses N.ºs 4.709.017 y 4.950.740; mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534, y otras mutaciones descritas en las patentes estadounidenses N.ºs 5.917.017 y 6.455.673; o fragmento descrito en la patente estadounidense N.º 5.843.711, neumolisina neumocócica (ply) (Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-2713) que incluye ply desintoxicada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (WO 2004/081515, WO 2006/032499) o dPLY-formol, PhtX, que incluye PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se describen en WO 00/37105 y WO 00/39299) y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC (proteína de la membrana externa meningocócica), que se extrae generalmente de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; véase, por ejemplo, EP0594610 B), o sus equivalentes inmunológicamente funcionales, péptidos sintéticos (EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas pertúsicas (WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden epítomos de linfocitos T CD4+ humanos múltiples de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824), tales como proteína N19 (Baraldoi et al. (2004) *Infect Immun* 72:4884-4887), proteína superficial neumocócica PspA (WO 02/091998), proteínas de absorción de hierro (WO 01/72337), toxinas A o B de *Clostridium difficile* (WO 00/61761), proteínas de fijación a la transferrina, proteína de adhesión neumocócica (PsaA), exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (en particular, sus mutantes no tóxicos (tales como exotoxina A que tiene una sustitución en el ácido glutámico cid 553 (Douglas et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169(11):4967-4971)). Otras proteínas, tales como la ovalbúmina, la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (BSA) o el derivado de la proteína purificada de tuberculina (PPD), también se pueden usar como proteínas portadoras. Otras proteínas portadoras incluyen toxinas bacterianas inactivadas, tales como toxóide

colérico (por ejemplo, como se describe en WO 2004/083251), *Escherichia coli* LT, *E. coli* ST y exotoxina A de *P. aeruginosa*.

En una forma de realización preferida, la proteína portadora de los glucoconjugados se selecciona independientemente del grupo que consiste en mutantes de TT, DT, DT (tales como CRM₁₉₇), proteína D de *H. influenzae*, fusiones PhtX, PhtD, PhtDE (en particular, aquellos descritos en WO 01/98334 y WO 03/054007), neumolisina desintoxicada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.

En una forma de realización, la proteína portadora de los glucoconjugados de la invención es DT (toxide diftérico). En otra forma de realización, la proteína portadora de los glucoconjugados de la invención es TT (toxide tetánico).

En otra forma de realización, la proteína portadora de los glucoconjugados de la invención es PD (proteína D de *H. Influenzae*; véase, por ejemplo, EP0594610 B).

En una forma de realización preferida, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la proteína CRM₁₉₇. La proteína CRM₁₉₇ es una forma no tóxica de la toxina diftérica pero no se puede distinguir inmunológicamente de la toxina diftérica. CRM₁₉₇ es producido por *Corynebacterium diphtheriae* infectada por el fago no toxinógeno β 197^{tox-} creado por mutagénesis de nitrosoguanidina del corinfago beta toxinógeno (Uchida et al. (1971) Nature New Biology 233:8-11). La proteína CRM₁₉₇ tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica pero difiere de esta en un único cambio de base (guanina por adenina) en el gen estructural. Este único cambio de base produce una sustitución de aminoácidos (ácido glutámico por glicina) en la proteína madura y elimina las propiedades tóxicas de la toxina diftérica. La proteína CRM₁₉₇ es un portador dependiente de linfocitos T seguro y eficaz para los sacáridos. Se puede descubrir detalles adicionales sobre CRM₁₉₇ y su producción, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 5.614.382.

En una forma de realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la proteína CRM₁₉₇ o la cadena A de CRM₁₉₇ (véase CN103495161). En una forma de realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la cadena A de CRM₁₉₇ obtenida mediante expresión por *E. coli* genéticamente recombinante (véase CN103495161). En una forma de realización, todos los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización, todos los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la cadena A de CRM₁₉₇.

En consecuencia, en formas de realización frecuentes, los glucoconjugados de

la invención comprenden CRM₁₉₇ como la proteína portadora, en donde el polisacárido capsular está ligado de manera covalente a CRM₁₉₇.

1.2 Sacárido capsular de la invención

El término "sacárido" en la presente memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. En formas de realización habituales, el sacárido es un polisacárido, en particular, un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*.

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas estándares conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

En la presente invención, los polisacáridos capsulares se pueden preparar, por ejemplo, de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*. En general, polisacáridos capsulares se generan cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio (por ejemplo, en un medio a base de soja), los polisacáridos luego se preparan del cultivo de bacterias. Las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* usadas para obtener los polisacáridos respectivos que se emplean en los glucoconjugados de la invención se pueden obtener de colecciones de cultivo o muestras clínicas establecidas.

La población del organismo (cada serotipo de *S. pneumoniae*) a menudo se aumenta desde un vial de siembra hasta botellas de siembra y se hace pasar a través de uno o más fermentadores de siembra de volumen en aumento hasta que se alcanzan volúmenes de fermentación a escala de producción. Al final del ciclo de crecimiento, las células se lisan, y el cultivo lisado luego se recolecta para procesamiento corriente abajo (purificación) (véanse, por ejemplo, WO 2006/110381, WO 2008/118752 y las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y 2008/0286838).

En general, los polisacáridos individuales se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véase, por ejemplo, WO 2006/110352 y WO 2008/118752).

Los polisacáridos purificados se pueden activar (por ejemplo, activar químicamente) para que sean capaces de reaccionar (por ejemplo, con el espaciador eTEC) y luego se pueden incorporar en los glucoconjugados de la invención, como se describe en la presente.

Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* comprenden unidades de repetición de oligosacáridos que pueden tener hasta 8 residuos de azúcar.

En una forma de realización, el sacárido capsular de la invención puede ser una unidad de oligosacárido o una cadena de sacáridos de longitud más corta que la

nativa de unidades de repetición de oligosacáridos. En una forma de realización, el sacárido capsular de la invención es una unidad de repetición de oligosacáridos del serotipo relevante.

En una forma de realización, el sacárido capsular de la invención puede ser oligosacáridos. Los oligosacáridos tienen una baja cantidad de unidades de repetición (en general, 5-15 unidades de repetición) y, en general, se derivan sintéticamente o mediante hidrólisis de polisacáridos.

Sin embargo, preferentemente todos los sacáridos capsulares de la presente invención y en las composiciones inmunógenas de la presente invención son polisacáridos. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular pueden inducir ciertas respuestas inmunitarias del anticuerpo debido a los epítomos presentes en la superficie antigénica. Preferentemente, se tiene en cuenta el aislamiento y la purificación de los polisacáridos capsulares de alto peso molecular para usar en los conjugados, las composiciones y los métodos de la presente invención.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 4.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 4.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 3.500 kDa; de 50 kDa a 3.000 kDa; de 50 kDa a 2.500 kDa; de 50 kDa a 2.000 kDa; de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 4.000 kDa; de 100 kDa a 3.500 kDa; de 100 kDa a 3.000 kDa; de 100 kDa a 2.500 kDa; de 100 kDa a 2.250 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 4.000 kDa; de 200 kDa a 3.500 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 2.500 kDa; de 200 kDa a 2.250 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Se puede usar dimensionamiento mecánico o químico. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético. El dimensionamiento mecánico

se puede llevar a cabo mediante cizallamiento de homogeneización de alta presión. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación).

En una forma de realización preferida, los polisacáridos purificados son polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F de *S. pneumoniae*, en donde el polisacárido tiene un peso molecular dentro de uno de los rangos de peso molecular como se describió anteriormente en la presente.

Como se usa en la presente, la expresión “peso molecular” del polisacárido o del conjugado proteína portadora-polisacárido se refiere al peso molecular calculado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con el detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).

En algunas formas de realización, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 18C, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención son O-acetilados. En algunas formas de realización, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención son O-acetilados.

Los polisacáridos purificados descritos en la presente se activan químicamente para que los sacáridos puedan reaccionar con la proteína portadora. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos por separado y se formulan en una formulación de dosis única como se describe más adelante.

1.2.1 Polisacárido neumocócico de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F

Los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se pueden preparar mediante técnicas estándares conocidas para las personas del oficio de nivel medio (véase, por ejemplo, WO 2006/110381). Los polisacáridos capsulares se pueden producir cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio; al final del ciclo de crecimiento, las células se lisan, y el cultivo lisado luego se recolecta para procesamiento corriente abajo (purificación). En general, los polisacáridos individuales se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véase, por ejemplo, WO 2006/110352 y WO 2008/118752). Los polisacáridos purificados se pueden procesar adicionalmente como también se describe en la presente para preparar glucoconjugados de la invención.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y/o 23F antes de la

conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 4.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 4.000 kDa; de 50 kDa a 3.000 kDa o de 50 kDa a 2.000 kDa. Aun en otras de esas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 3.500 kDa; de 50 kDa a 3.000 kDa; de 50 kDa a 2.500 kDa; de 50 kDa a 2.000 kDa; de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 4.000 kDa; de 100 kDa a 3.500 kDa; de 100 kDa a 3.000 kDa; de 100 kDa a 2.500 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 4.000 kDa; de 200 kDa a 3.500 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 2.500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

En algunas formas de realización, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V y/o 18C de la invención son O-acetilados. En algunas formas de realización, el sacárido neumocócico de serotipo 9V de la invención es O-acetilado, y el sacárido neumocócico de serotipo 18C de la invención es des-O-acetilado.

1.2.2 Polisacárido neumocócico de serotipo 8

La unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 8 consiste en una unidad de tetrasacárido lineal con un ácido glucurónico (Glc α), dos glucopiranosas (Glc β) y una galactopiranososa (Gal β) (Jones et al. (1957) The Journal of the American Chemical Society. 79(11):2787-2793). Los cuatro monosacáridos se ligan mediante enlaces 1,4 como se muestra en la Figura 1.

Los sacáridos de serotipo 8 se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071,

2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). Además, se pueden obtener mediante protocolos de síntesis.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 8 se pueden obtener de recolecciones de cultivos establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestras clínicas.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 8 antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En una forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 70 kDa a 900 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 800 kDa.

En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

1.2.3 Polisacárido neumocócico de serotipo 10A

La unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 10A consiste en una unidad de repetición de hexasacáridos ramificados con dos galactofuranosas (Gal_f), tres galactopiranosas (Gal_p), una N-acetilgalactosamina (Gal_pNAc) y un fosforibitol de estructura principal (Jones, C. (2005) Carbohydrate Research 269(1):175-181). Existen dos monosacáridos ramificados en la porción β -Gal_pNAc (una β -3-Gal_p y una β -6-Gal_f) como se muestra en la Figura 2.

Los sacáridos de serotipo 10A se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel

medio (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). Además, se pueden obtener mediante protocolos de síntesis.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 10A se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestra clínicas.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 10A antes de la conjugación tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En una forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 70 kDa a 900 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 800 kDa.

En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

1.2.4 Polisacárido neumocócico de serotipo 11A

La unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 11A consiste en una estructura principal de tetrasacáridos lineal (dos galactopiranosas (Gal_p) y dos glucopiranosas (Glc_p)) y un fosfoglicerol colgante (Richards et al. (1988) Adv. Exp. Med. Biol. 228:595-597), como se muestra en la Figura 3. El polisacárido es O-acetilado en múltiples ubicaciones y, en función de los datos informados en la literatura (Calix et al. (2011) J Bacteriol. 193(19):5271-5278), la cantidad total de O-acetilación

en el polisacárido de 11A es de alrededor de 2,6 grupos O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos.

Los sacáridos de serotipo 11A se puede obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). Además, se pueden obtener mediante protocolos de síntesis.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 11A se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestra clínicas.

El polisacárido capsular de serotipo 11A aislado obtenido mediante purificación del polisacárido de serotipo 11A del lisado de *S. pneumoniae* y, opcionalmente, mediante el dimensionamiento del polisacárido purificado se puede caracterizar por diferentes atributos que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (MW) y el mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 11A.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 11A antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En una forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 70 kDa a 900 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 800 kDa.

En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 100 kDa a 200 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 200 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la

conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

En una forma de realización, el tamaño del polisacárido de serotipo 11A purificado se reduce mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión alcanza altas velocidades de cizallamiento mediante el bombeo del flujo del proceso a través de un paso de flujo con dimensiones suficientemente pequeñas. La velocidad de cizallamiento se aumenta usando una homogeneización de presión aplicada en mayor medida, y el tiempo de exposición se puede aumentar recirculando el flujo de alimentación a través del homogeneizador.

El proceso de homogeneización de alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido de serotipo 11A purificado mientras se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular de serotipo 11A activado, aislado o purificado o en un conjugado polisacárido de serotipo 11A-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de ese polisacárido o como el número de grupo O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos.

En una forma de realización preferida, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 11A tienen al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6 μmol de acetato por μmol de ese polisacárido capsular de serotipo 11A.

1.2.5 Polisacárido neumocócico de serotipo 12F

La unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 12F consiste en una estructura principal de trisacáridos lineal (una N-acetilfucosamina (Fuc_pNAc), una N-acetilgalactosamina (Gal_pNAc) y un ácido N-acetilmanurónico (Man_pNAcA)) con dos ramas: una α -galactopiranososa colgante (Gal_p) ligada en C3 de Fuc_pNAc y una rama de disacárido $\alpha\text{-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Glc}_p$ ligada en C3 de Man_pNAcA (Leontein et al. (1983) Carbohydrate Research 114(2):257-266.) como se muestra en la Figura 4.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 12F se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestras clínicas.

Los sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* serotipo 12F se preparan mediante técnicas estándares conocidas por las personas del oficio de nivel medio. En general, polisacáridos capsulares se generan cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio (por ejemplo, en un medio a base de soja), los polisacáridos

luego se preparan del cultivo de bacterias. La población del organismo (*S. Pneumoniae* serotipo 12F) a menudo se aumenta desde un vial de siembra hasta botellas de siembra y se hace pasar a través de uno o más fermentadores de siembra volumen en aumento hasta que se alcanzan volúmenes de producción a escala de producción. Al final del ciclo de crecimiento, las células se lisan, y el cultivo lisado luego se recolecta para procesamiento corriente abajo (purificación) (véanse, por ejemplo, WO 2006/110381 y WO 2008/118752, las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y US2008/0286838). En general, los polisacáridos se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véase, por ejemplo, WO 2006/110352 y WO 2008/118752).

Los polisacáridos purificados de serotipo 12F se pueden activar (por ejemplo, activar químicamente) para que puedan reaccionar y luego se pueden incorporar en glucoconjugados de la invención, como también se describe en la presente.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 12F antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En una forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 300 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 70 kDa a 300 kDa. En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 90 kDa a 250 kDa; de 90 kDa a 150 kDa; de 90 kDa a 120 kDa; de 80 kDa a 120 kDa; de 70 kDa a 100 kDa; de 70 kDa a 110 kDa; de 70 kDa a 120 kDa; de 70 kDa a 130 kDa; de 70 kDa a 140 kDa; de 70 kDa a 150 kDa; de 70 kDa a 160 kDa; de 80 kDa a 110 kDa; de 80 kDa a 120 kDa; de 80 kDa a 130 kDa; de 80 kDa a 140 kDa; de 80 kDa a 150 kDa; de 80 kDa a 160 kDa; de 90 kDa a 110 kDa; de 90 kDa a 120 kDa; de 90 kDa a 130 kDa; de 90 kDa a 140 kDa; de 90 kDa a 150 kDa; de 90 kDa a 160 kDa; de 100 kDa a 120 kDa; de 100 kDa a 130 kDa; de 100 kDa a 140 kDa; de 100 kDa a 150 kDa; de 100 kDa a 160 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a

polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

1.2.6 Polisacárido neumocócico de serotipo 15B

Como se muestra en la Figura 5, la unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 15B consiste en una estructura principal de trisacáridos ramificada (una N-acetilglucosamina (Glc_pNAc), una galactopiranososa (Gal_p) y una glucopiranososa (Glc_p)) con una rama de disacárido αGal_p - βGal_p ligada al grupo C4 hidroxilo de Glc_pNAc . El fosfoglicerol se liga al grupo C3 hidroxilo del residuo βGal_p en la rama de disacárido (Jones et al. (2005) Carbohydrate Research 340(3):403-409). El polisacárido capsular de serotipo 15C tiene la estructura principal idéntica al serotipo 15B pero no tiene O-acetilación.

Los polisacáridos de serotipo 15B se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véase, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). También se pueden producir usando protocolos sintéticos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 15B se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA EE.UU.) (por ejemplo, cepa de depósito N.º ATCC10354) o Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA EE.UU.)) o de muestras clínicas.

Las células bacterianas se cultivan en un medio, preferentemente, en un medio a base de soja. Después de la fermentación de células bacterianas que producen polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* serotipo 15B, las células bacterianas se lisan para producir un lisado celular. El polisacárido de serotipo 15B luego se puede aislar del lisado celular mediante técnicas de purificación conocidas en el estado de la técnica, que incluyen el uso de centrifugación, filtración de profundidad, precipitación, ultrafiltración, tratamiento con carbono activado, diafiltración y/o cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). El polisacárido capsular de serotipo 15B purificado luego se puede usar para la preparación de conjugados inmunógenos.

El polisacárido capsular de serotipo 15B aislado obtenido mediante purificación del polisacárido de serotipo 15B del lisado de *S. pneumoniae* y, opcionalmente, mediante el dimensionamiento del polisacárido purificado se puede caracterizar por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (MW), el mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y el mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

Preferentemente, a fin de generar conjugados de 15B con características y/o rendimientos de filtrabilidad ventajosos, el dimensionamiento del polisacárido en un rango de peso molecular diana se realiza antes de la conjugación con una proteína portadora. De manera ventajosa, el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado se reduce mientras se conservan las características fundamentales de la estructura del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado se reduce mediante homogeneización mecánica.

En una forma de realización preferida, el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado se reduce mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión alcanza altas velocidades de cizallamiento mediante el bombeo del flujo del proceso a través de un paso de flujo con dimensiones suficientemente pequeñas. La velocidad de cizallamiento se aumenta usando una homogeneización de presión aplicada en mayor medida, y el tiempo de exposición se puede aumentar recirculando el flujo de alimentación a través del homogeneizador.

El proceso de homogeneización de alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado mientras se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 5 kDa a 500 kDa, de 50 kDa a 500 kDa, de 50 kDa a 450kDa, de 100 kDa a 400kDa y de 100 kDa a 350 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 350 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 300 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 300 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 350 kDa. En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso

molecular de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 100 kDa a 200 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 200 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

El polisacárido de serotipo 15B es O-acetilado, y la cantidad total de O-acetilación es de aproximadamente 0,8-0,9 grupo O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos. El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante RMN protónica (véanse, por ejemplo, Lemercinier et al. (1996) *Carbohydrate Research* 296:83-96; Jones et al. (2002) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30:1233-1247; WO 2005/033148 y WO 00/56357). Otro método que se usa con frecuencia se describe en Hestrin, S. (1949) *J. Biol. Chem.* 180:249-261. Preferentemente, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular de serotipo 15B activado, aislado o purificado o en un conjugado polisacárido de serotipo 15B-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de ese polisacárido o como el número de grupo O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

La presencia de cadenas laterales de glicerolfosfato se determina mediante la medición de glicerol usando cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) después de su liberación mediante el tratamiento del polisacárido con ácido fluorhídrico (HF). La presencia de glicerol en un polisacárido de serotipo 15B activado, aislado o purificado

o en un conjugado polisacárido de serotipo 15B-proteína portadora se expresa como el número de mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B

aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 150 kDa a 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

1.2.7 Polisacárido neumocócico de serotipo 22F

Como se muestra en la Figura 6, la unidad de repetición de polisacárido de serotipo 22F consiste en una estructura principal de pentasacáridos ramificada (un ácido glucurónico (Glc_pA), una glucopiranososa (Glc_p), una galactofuranosa (Gal_f) y dos ramnopiranosas (Rha_p)) con una rama de αGlc_p ligada al grupo C3 hidroxilo de βRha_p (Richards et al. (1989) Canadian Journal of Chemistry 67(6):1038-1050). Aproximadamente 80 % de grupos C2 hidroxilo del residuo βRha_p en la unidad de repetición de polisacáridos son O-acetilados.

Los polisacáridos de serotipo 22F se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). Además, se pueden obtener mediante protocolos de síntesis.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 22F se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestra clínicas.

El polisacárido capsular de serotipo 22F aislado obtenido mediante purificación del polisacárido de serotipo 22F del lisado de *S. pneumoniae* y, opcionalmente, mediante el dimensionamiento del polisacárido purificado se puede caracterizar por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (MW) y el mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 22F.

Preferentemente, a fin de generar conjugados de serotipo 22F con características y/o rendimientos de filtrabilidad ventajosos, el dimensionamiento del

polisacárido en un rango de peso molecular diana se realiza antes de la conjugación con una proteína portadora. De manera ventajosa, el tamaño del polisacárido de serotipo 22F purificado se reduce mientras se conservan las características fundamentales de la estructura del polisacárido, tales como la presencia de un grupo O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido de serotipo 22F purificado se reduce mediante homogeneización mecánica.

En una forma de realización preferida, el tamaño del polisacárido purificado se reduce mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión alcanza altas velocidades de cizallamiento mediante el bombeo del flujo del proceso a través de un paso de flujo con dimensiones suficientemente pequeñas. La velocidad de cizallamiento se aumenta usando una homogeneización de presión aplicada en mayor medida, y el tiempo de exposición se puede aumentar recirculando el flujo de alimentación a través del homogeneizador.

El proceso de homogeneización de alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido de serotipo 22F purificado mientras se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 22F antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En una forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 70 kDa a 900 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 800 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 200 kDa a 600 kDa. En otra forma de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 400 kDa a 700 kDa.

En otras formas de realización, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 900 kDa; de 100 kDa a 800 kDa; de 100 kDa a 700 kDa; de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 1.000 kDa; de 150 kDa a 900 kDa; de 150 kDa a 800 kDa; de 150 kDa a 700 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 900 kDa; de 200 kDa a 800 kDa; de 200 kDa a 700 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 300 kDa; de 250 kDa a 1.000 kDa; de 250 kDa a 900 kDa; de 250 kDa a 800 kDa; de 250 kDa a 700 kDa; de

250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 1.000 kDa; de 300 kDa a 900 kDa; de 300 kDa a 800 kDa; de 300 kDa a 700 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 1.000 kDa; de 400 kDa a 900 kDa; de 400 kDa a 800 kDa; de 400 kDa a 700 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; y rangos de peso molecular similares deseados. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describió anteriormente en la presente, el polisacárido de 22F se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante RMN protónica (Lemercinier et al. (1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247; WO 2005/033148 y WO 00/56357). Otro método que se usa con frecuencia se describe en Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261. Preferentemente, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular de serotipo 22F activado, aislado o purificado o en un conjugado polisacárido de serotipo 22F-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de ese polisacárido o como el número de grupo O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos.

En una forma de realización preferida, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 22F tiene al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6 μmol de acetato por μmol de ese polisacárido capsular de serotipo 22F.

1.2.8 Polisacárido neumocócico de serotipo 33F

Como se muestra en la Figura 7, la unidad de repetición de polisacáridos de serotipo 33F consiste en una estructura principal de pentasacáridos ramificada (dos galactopiranosas (Gal_p), dos galactofuranosas (Gal_f) y una glucopiranososa (Glc_p) con una αGal_p terminal ligada al grupo C2 hidroxilo del residuo αGal_p dentro de la estructura principal (Lemercinier et al. (2006) Carbohydrate Research 341(1):68-74.). Se informó en la literatura que el grupo C2 hidroxilo del residuo 3- β - Gal_f de estructura principal es O-acetilado.

Los polisacáridos de serotipo 33F se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véase, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). Además, se pueden obtener mediante protocolos de síntesis.

Las cepas de *S. pneumoniae* serotipo 33F se pueden obtener de recolecciones de cultivo establecidas (tales como Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)) o muestra clínicas.

Los polisacáridos purificados de serotipo 33F se pueden activar (por ejemplo, activar químicamente) para que puedan reaccionar y luego se pueden incorporar en glucoconjugados de la invención, como también se describe en la presente.

El polisacárido capsular de serotipo 33F aislado obtenido mediante purificación del polisacárido de serotipo 33F del lisado de *S. pneumoniae* y, opcionalmente, mediante el dimensionamiento del polisacárido purificado se puede caracterizar por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular y el mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 33F.

En algunas formas de realización, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 33F antes de la conjugación tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un polisacárido se puede reducir levemente en tamaño durante procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en la presente, el polisacárido se puede someter a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Los rangos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de la eventual etapa de dimensionamiento.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular de serotipo 33F activado, aislado o purificado o en un conjugado polisacárido de serotipo 33F-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de ese polisacárido o como el número de grupo O-acetilo por unidad de repetición de polisacáridos.

En una forma de realización preferida, los polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* serotipo 33F tiene al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6 μmol de acetato por μmol de ese polisacárido capsular de serotipo 33F.

1.3 Glucoconjugados de la invención

Los sacáridos purificados se activan químicamente para producir sacáridos (es decir, sacáridos activados) que pueden reaccionar con la proteína portadora. Una vez que se activan, cada sacárido capsular se conjuga por separado con una proteína portadora para formar un glucoconjugado. En una forma de realización, cada sacárido capsular se conjuga con la misma proteína portadora. La activación química de los sacáridos y la posterior conjugación con la proteína portadora se pueden lograr mediante métodos de activación y conjugación descritos en la presente.

1.3.1 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F

Los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante técnicas estándares conocidas por las personas del oficio de nivel medio (véanse, por ejemplo, WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352 y las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y 2008/0286838).

En una forma de realización, los polisacáridos se activan con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado luego se acopla directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora (preferentemente, CRM₁₉₇). Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante una ligadura de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando éster de N-[γ -maleimidobutirilo]succinimida (GMBS)) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, N-succinimidil bromoacetato (SBA; SIB), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), sulfosuccinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), N-succinimidil iodoacetato (SIA) o succinimidil 3-[bromoacetamido]propiionato (SBAP)). Preferentemente, el éster

de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla con hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas para conjugación usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En una forma de realización preferida, al menos uno de los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora (tal como se describe en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.ºs 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 y 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653 y WO 2008/143709). En una forma de realización preferida, todos los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se conjugan con la proteína portadora mediante aminación reductora.

La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado. Antes de la oxidación, el polisacárido se hidroliza opcionalmente. Se puede usar hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético. La etapa de oxidación puede incluir la reacción con periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico, y también incluye metaperiodato (IO₄⁻) y ortoperiodato (IO₆⁵⁻) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio).

En una forma de realización, el polisacárido capsular de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F o 23F de *S. pneumoniae* se oxidan en presencia de metaperiodato, preferentemente, en presencia de periodato de sodio (NaIO_4). En otra forma de realización, el polisacárido capsular de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente, en presencia de ácido periódico.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se considera que el polisacárido está activado, y se denomina “polisacárido activado” más adelante. El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse, ya sea de manera independiente (liofilización discreta) o juntos (coliofilizarse). En una forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se coliofilizan. En otra forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.

En una forma de realización, la liofilización se lleva a cabo en presencia de un azúcar no reductor. Los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (denominada aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente acuoso; en otra forma de realización, la reacción se lleva a cabo en solvente aprótico. En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida). El solvente de DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se liofilizó.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, que se pueden bloquear usando un agente bloqueante adecuado. En una forma de realización, este agente bloqueante es borohidruro de sodio (NaBH_4). Después de la conjugación (la reacción de reducción y, opcionalmente, el bloqueo), los glucoconjugados se pueden purificar. Los glucoconjugados se pueden purificar mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño. En una forma de realización, los

glucoconjugados se purifican mediante diafiltración, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño. En una forma de realización, los glucoconjugados se filtran de manera estéril.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 9V y/o 18C comprenden un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de 10 % a 100 %, de 20 % a 100 %, de 30 % a 100 %, de 40 % a 100 %, de 50 % a 100 %, de 60 % a 100 %, de 70 % a 100 %, de 75 % a 100 %, de 80 % a 100 %, de 90 % a 100 %, de 50 % a 90 %, de 60 % a 90 %, de 70 % a 90 % o de 80 % a 90 %. En otras formas de realización, el grado de O-acetilación es $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ o alrededor de 100 %.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 9V y/o 18C de la invención es O-acetilado. En algunas formas de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 9V es O-acetilado, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C es des-O-acetilado.

1.3.2 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 22F se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante un enlace de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et

al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En formas de realización preferidas, los glucoconjugados de serotipo 22F de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) para formar un conjugado.

Preferentemente, antes de la oxidación, se realiza el dimensionamiento del polisacárido de serotipo 22F en un rango de peso molecular (MW) diana. De manera ventajosa, el tamaño del polisacárido de serotipo 22F purificado se reduce mientras se conservan las características fundamentales de la estructura del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido de serotipo 22F purificado se reduce mediante homogeneización mecánica (véase la sección 1.2.7. más arriba).

En una forma de realización, el polisacárido de serotipo se activa (se oxida) mediante un proceso que comprende las etapas de:

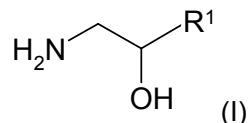
(a) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 22F aislado con un agente oxidante; y

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido de serotipo 22F activado;

En una forma de realización preferida, el agente oxidante es periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico, y también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En una forma de realización preferida, el agente oxidante es periodato de sodio. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido de serotipo 22F es metaperiodato de sodio. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido de serotipo 22F es metaperiodato de sodio.

En una forma de realización, el agente de inactivación se selecciona de dioles próximos, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un 1,2-aminoalcohol de la Fórmula (I):



en donde R^1 se selecciona de H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

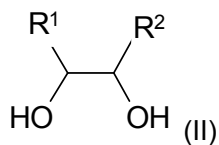
En una forma de realización, el agente de inactivación se selecciona de sales de sodio y potasio de sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un aminoácido. En tales formas de realización, el aminoácido se puede seleccionar de serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, prolina, hidroxiprolina, triptófano, tirosina e histidina.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un sulfito, tal como bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un compuesto que comprende dos grupos hidroxilo próximos (dioles próximos), es decir, dos grupos hidroxilo ligados de manera covalente a dos átomos de carbono adyacentes.

Preferentemente, el agente de inactivación es un compuesto de la Fórmula (II):



en donde R^1 y R^2 se seleccionan, cada uno independientemente, de H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En una forma de realización preferida, el agente de inactivación es glicerol, etilen glicol, propan-1,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol o ácido ascórbico. En una forma de realización preferida, el agente de inactivación es butan-2,3-diol.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F aislado se activa mediante un proceso que comprende la etapa de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 22F aislado con periodato; y

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando butan-2,3-diol que da como resultado un polisacárido de serotipo 22F activado.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se considera que el

polisacárido está activado, y se denomina “polisacárido activado” más adelante.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado se purifica. El polisacárido de serotipo 22F activado se purifica de acuerdo con métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio, tales como cromatografía de penetración en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido de 22F activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido de serotipo 22F activado es de 2 a 30, de 2 a 25, de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 5, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 15, de 5 a 10, de 10 a 30, de 10 a 25, de 10 a 20, de 10 a 15, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 20, de 20 a 30, o de 20 a 25. En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido de serotipo 22F activado es de 2 a 10, de 4 a 8, de 4 a 6, de 6 a 8, de 6 a 12, de 8 a 14, de 9 a 11, de 10 a 16, de 12 a 16, de 14 a 18, de 16 a 20, de 16 a 18, de 18 a 22, o de 18 a 20.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 25 kDa a 1.000 kDa, de 100 kDa a 1.000 kDa, de 300 kDa a 800 kDa, de 300 kDa a 700 kDa, de 300 kDa a 600 kDa, de 400 kDa a 1.000 kDa, de 400 kDa a 800 kDa, de 400 kDa a 700 kDa o de 400 kDa a 600kDa. En una forma de realización, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 300 kDa a 800kDa. En una forma de realización, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 400 kDa a 600 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 400 kda a 600 kDa y un grado de oxidación de 10 a 25, de 10 a 20, de 12 a 20 o de 14 a 18. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 400 kDa a 600 kDa y un grado de oxidación de 10 a 20.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 o alrededor de 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado

tiene un peso molecular de 400 kDa a 800 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 22F activado tiene un peso molecular de 400 kDa a 800 kDa, un grado de oxidación de 12 a 20 y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F.

El polisacárido activado y/o la proteína portadora pueden liofilizarse, ya sea de manera independiente (liofilización discreta) o juntos (coliofilizarse).

En una forma de realización, el polisacárido de serotipo 22F activado se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. En una forma de realización, luego se formula un compuesto con el polisacárido activado liofilizado y una solución que comprende la proteína portadora.

En otra forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se coliofilizan. En tales formas de realización, se formula el polisacárido de serotipo 22F activado y la proteína portadora y se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora coliofilizados luego se pueden volver a suspender en solución y pueden hacerse reaccionar con un agente reductor.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor.

El polisacárido de serotipo 22F activado se puede conjugar con una proteína portadora mediante un proceso que comprende la etapa de:

(c) formular un compuesto con el polisacárido de serotipo 22F activado y una proteína portadora; y

(d) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 22F activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido de serotipo 22F de GBS.

En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente acuoso. En otra forma de realización, la reacción se lleva a cabo en solvente aprótico. En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en

solvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El solvente de DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se liofilizó.

La conjugación de polisacárido de serotipo 22F activado con un portador de proteínas mediante aminación reductora en dimetilsulfóxido (DMSO) es adecuado para conservar el contenido de O-acetilo del polisacárido en comparación con, por ejemplo, la aminación reductora en fase acuosa donde el nivel de O-acetilación del polisacárido se puede reducir significativamente. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la etapa (c) y la etapa (d) se llevan a cabo en DMSO.

En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, amina boranos, tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB). En una forma de realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, que se pueden bloquear usando un agente bloqueante adecuado. En una forma de realización, este agente bloqueante es borohidruro de sodio (NaBH₄).

Después de la conjugación del polisacárido de serotipo 22F con la proteína portadora, el glucoconjugado se puede purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas conocidas por la persona del oficio de nivel medio. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 22F de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 70 kDa a 900 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 800 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 200 kDa a 600 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 900 kDa; de 100 kDa a 800 kDa; de 100 kDa a 700 kDa; de 100

kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 1.000 kDa; de 150 kDa a 900 kDa; de 150 kDa a 800 kDa; de 150 kDa a 700 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 900 kDa; de 200 kDa a 800 kDa; de 200 kDa a 700 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 300 kDa; de 250 kDa a 1.000 kDa; de 250 kDa a 900 kDa; de 250 kDa a 800 kDa; de 250 kDa a 700 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 1000 kDa; de 300 kDa a 900 kDa; de 300 kDa a 800 kDa; de 300 kDa a 700 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 1.000 kDa; de 400 kDa a 900 kDa; de 400 kDa a 800 kDa; de 400 kDa a 700 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción. En algunas de esas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 22F se preparan usando aminación reductora.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F de la invención tiene un peso molecular de 400 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 8.000 kDa o de 3.000 kDa a 5.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F tiene un peso molecular de 500 kDa a 10.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 8.000 kDa. Aun en otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F tiene un peso molecular de 2.000 kDa a 8.000 kDa o de 3.000 kDa a 7.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F de la invención tiene un peso molecular de 200 kDa a 20.000 kDa; de 200 kDa a 15.000 kDa; de 200 kDa a 10.000 kDa; de 200 kDa a 7.500 kDa; de 200 kDa a 5.000 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 500 kDa a 20.000 kDa; de 500 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 12.500 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 500 kDa a 7.500 kDa; de 500 kDa a 6.000 kDa; de 500 kDa a 5.000 kDa; de 500 kDa a 4.000 kDa; de 500 kDa a 3.000 kDa; de 500 kDa a 2.000 kDa; de 500 kDa a 1.500 kDa; de 500 kDa a 1.000 kDa; de 750 kDa a 20.000 kDa; de 750 kDa a 15.000 kDa; de 750 kDa a 12.500 kDa; de 750 kDa a 10.000 kDa; de 750 kDa a 7.500 kDa; de 750 kDa a 6.000 kDa; de 750 kDa a 5.000 kDa; de 750 kDa a 4.000 kDa; de 750 kDa a 3.000 kDa; de 750 kDa a 2.000 kDa; de 750 kDa a 1.500 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 12.500 kDa; de 1.000 kDa a 10,000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 6.000 kDa; de 1.000 kDa a

5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 2.500 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 15.000 kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.500 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa; de 4.000 kDa a 20.000 kDa; de 4.000 kDa a 15.000 kDa; de 4.000 kDa a 12.500 kDa; de 4.000 kDa a 10.000 kDa; de 4.000 kDa a 7.500 kDa; de 4.000 kDa a 6.000 kDa; o de 4.000 kDa a 5.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 22F de la invención tiene un peso molecular de 5.000 kDa a 20.000 kDa; de 5.000 kDa a 15.000 kDa; de 5.000 kDa a 10.000 kDa; de 5.000 kDa a 7.500 kDa; de 6.000 kDa a 20.000 kDa; de 6.000 kDa a 15.000 kDa; de 6.000 kDa a 12.500 kDa; de 6.000 kDa a 10.000 kDa o de 6.000 kDa a 7.500 kDa.

El peso molecular del glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 o alrededor de 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido aislado es

de al menos 0,9.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,9.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 22F de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación). Los datos de la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes a los polisacáridos, se pueden obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos en el estado de la técnica. La conjugación produce una reducción de la cantidad de residuos de lisina recuperados en comparación con el material de inicio de la proteína CRM₁₉₇ que se usa para generar los materiales conjugados. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 22F de la invención es de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 22F de la invención es de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o alrededor de 15. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 22F de la invención es de 4 a 7. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 22F de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) de sacárido con respecto a la proteína portadora. En algunas formas de realización, la relación de polisacárido de serotipo 22F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado (p/p) es de 0,5 a 3,0

(por ejemplo, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9 o alrededor de 3,0). En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,5 a 2,0, de 0,5 a 1,5, de 0,8 a 1,2, de 0,5 a 1,0, de 1,0 a 1,5 o de 1,0 a 2,0. En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,8 y 1,2. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de serotipo 22F con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,9 a 1,1. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 22F y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o 15 % de polisacárido de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 40 % de polisacárido de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 25% de polisacárido de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 20% de polisacárido de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 22F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 15% de polisacárido de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 22F.

Los glucoconjugados de serotipo 22F también se pueden caracterizar por su distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular

relativa del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se usa en columnas alimentadas por gravedad para determinar la distribución de tamaño molecular de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros en los medios se eluyen con mayor rapidez que las moléculas pequeñas. Se utilizan recolectores de fracciones para recolectar el eluato de la columna. Las fracciones se evalúan colorimétricamente mediante ensayo de sacáridos. A fin de determinar la K_d , las columnas se calibran para determinar la fracción en la que las moléculas se excluyen por completo (V_0), ($K_d=0$), y la fracción que representa la retención máxima (V_i), ($K_d=1$). La fracción en la que se logra un atributo de muestra especificado (V_e) está relacionada con la K_d mediante la expresión $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

En una forma de realización preferida, al menos 30 % del glucoconjugado de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 40 % del glucoconjugado tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % del glucoconjugado de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60% del glucoconjugado de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50 % a 80 % del glucoconjugado de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 65% a 80 % del glucoconjugado de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

1.3.3 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 33F

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 33F se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante una ligadura de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de

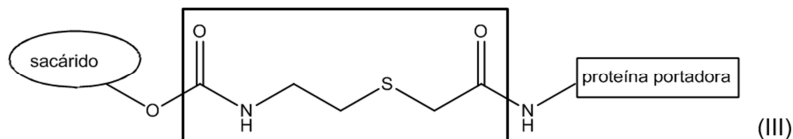
carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención se preparan usando aminación reductora. En tal forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención se pueden preparar usando aminación reductora en fase acuosa (RAC/acuosa). La aminación reductora en fase acuosa se aplicó exitosamente para producir una vacuna neumocócica conjugada (véase, por ejemplo, WO 2006/110381). Sin embargo, preferentemente cuando se usa aminación reductora, los conjugados de serotipo 33F se preparan mediante aminación reductora en DMSO (RAC/DMSO). En vista de los desafíos asociados a la conservación de la funcionalidad de O-acetilo mediante el uso del proceso de RAC/acuosa, se prefiere la aminación reductora en DMSO. RAC/DMSO se aplicó exitosamente para producir una vacuna neumocócica conjugada (véase, por ejemplo, WO 2006/110381).

En formas de realización preferidas, los conjugados de serotipo 33F de la invención se preparan usando conjugación eTEC (en adelante “glucoconjugados ligados a eTEC de serotipo 33F”), tal como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3 y en WO 2014/027302. Tales glucoconjugados de 33F comprenden un sacárido conjugado de manera covalente con una proteína portadora mediante uno o más espaciadores eTEC, en donde el sacárido se conjuga de manera covalente con el espaciador eTEC mediante un enlace de carbamato, y en donde la proteína portadora se conjuga de manera covalente con el espaciador eTEC mediante un enlace de amida. Los

glucoconjugados ligados a eTEC de la invención se pueden representar mediante la Fórmula general (III):



en donde los átomos que comprenden el espaciador eTEC están contenidos en la caja central.

El espaciador eTEC incluye siete átomos lineales (es decir, $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$) y proporciona enlaces de tioéter y amida estables entre el sacárido y la proteína portadora. La síntesis del glucoconjugado ligado a eTEC implica la reacción de un grupo hidroxilo activado del sacárido con el grupo amino de un reactivo de tioalquilamina, por ejemplo, cistamina, cisteinamina o una sal de estas, lo cual forma un enlace de carbamato con el sacárido para obtener un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos de sulfhidrilo libre se produce mediante la reacción con un agente reductor para obtener un sacárido tiolado activado. La reacción de los grupos de sulfhidrilo libre del sacárido tiolado activado con una proteína portadora activada que tiene uno o más grupos de α -haloacetamida en residuos que contienen amina genera un enlace de tioéter para formar el conjugado, en donde la proteína portadora se liga al espaciador eTEC mediante un enlace de amida.

En los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención, el sacárido puede ser un polisacárido o un oligosacárido. La proteína portadora se puede seleccionar de cualquier portador adecuado descrito en la presente o que es conocido por las personas del oficio de nivel medio. En formas de realización habituales, el sacárido es un polisacárido. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado ligado a eTEC comprende un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 33F.

En formas de realización particularmente preferidas, el glucoconjugado ligado a eTEC comprende un polisacárido capsular de Pn-33F, que está conjugado de manera covalente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador eTEC (glucoconjugados ligados a eTEC de serotipo 33F).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tienen un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750

kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 33F de la invención tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 33F tiene un peso molecular de 500 kDa a 10.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 33F tiene un peso molecular de 200 kDa a 10.000 kDa. Aún en otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 33F tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 33F de la invención tiene un peso molecular de 200 kDa a 20.000 kDa; de 200 kDa a 15.000 kDa; de 200 kDa a 10.000 kDa; de 200 kDa a 7.500 kDa; de 200 kDa a 5.000 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; a 200 kDa a 1.000 kDa; de 500 kDa a 20.000 kDa; de 500 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 12.500 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 500 kDa a 7.500 kDa; de 500 kDa a 6.000 kDa; de 500 kDa a 5.000 kDa; de 500 kDa a 4.000 kDa; de 500 kDa a 3.000 kDa; de 500 kDa a 2.000 kDa; de 500 kDa a 1.500 kDa; de 500 kDa a 1.000 kDa; de 750 kDa a 20.000 kDa; de 750 kDa a 15.000 kDa; de 750kDa a 12.500 kDa; de 750kDa a 10.000 kDa; de 750kDa a 7.500 kDa; de 750 kDa a 6.000 kDa; de 750 kDa a 5.000 kDa; de 750 kDa a 4.000 kDa; de 750 kDa a 3.000 kDa; de 750 kDa a 2.000 kDa; de 750 kDa a 1.500 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 12.500 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 6.000 kDa; de 1.000 kDa a 5,000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 2.500 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; de 2.000 kDa a 3.000 kDa; de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 15.000 kDa; de 3.000 kDa a 12.500 kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 9.000 kDa; de 3.000 kDa a 8.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.000 kDa; de 3.000 kDa a 6.000 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa o de 3.000 kDa a 4.000 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 33F de la invención es de 2 a 20, de 4 a 16, de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 33F de la invención es de alrededor de 2, de alrededor de 3, de alrededor de 4, de alrededor de 5, de alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19 o alrededor de 20. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 33F de la invención es de 4 a 16. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En una forma de realización preferida, la proteína portadora comprende CRM₁₉₇, que contiene 39 residuos de lisina. En algunas de esas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender de 4 a 16 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido. Otra manera de expresar este parámetro es que de alrededor del 10% a alrededor del 41% de las lisinas CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido. En otra de esas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender de 2 a 20 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido. Otra manera de expresar este parámetro es que de alrededor del 5% a alrededor del 50% de las lisinas CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido. En algunas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15 o alrededor de 16 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido.

En formas de realización habituales, la proteína portadora se conjuga de manera covalente con un espaciador eTEC mediante un enlace de amida con uno o más grupos ϵ -amino de residuos de lisina en la proteína portadora. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora comprende de 2 a 20 residuos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido. En otras de esas formas de

realización, la proteína portadora comprende de 4 a 16 residuos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido.

Los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) de sacárido con respecto a la proteína portadora. En algunas formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,2 a 4,0 (por ejemplo, alrededor de 0,2, alrededor de 0,3, alrededor de 0,4, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9 o alrededor de 4,0). En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 1,0 a 2,5. En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,4 y 1,7. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

La frecuencia de unión de la cadena de sacáridos a una lisina en la proteína portadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención. Por ejemplo, en algunas formas de realización, al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce cada 4 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 10 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido.

En formas de realización habituales, la proteína portadora es CRM₁₉₇, y el enlace covalente mediante un espaciador eTEC entre CRM₁₉₇ y el polisacárido se produce al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido.

En otras formas de realización, el conjugado comprende al menos un enlace

covalente entre la proteína portadora y el sacárido por cada 5 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 3 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 9 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 15 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 6 unidades de repetición de sacáridos, cada 3 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 20 unidades de repetición de sacáridos; o cada 4 a 25 unidades de repetición de sacáridos o cada 2 a 25 unidades de repetición de sacáridos. En formas de realización frecuentes, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En otra forma de realización, al menos un enlace entre la proteína portadora y el sacárido se produce cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En una forma de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Un aspecto importante para tener en cuenta durante la conjugación es el desarrollo de afecciones que permiten la retención de grupos funcionales sustituyentes no sacáridos potencialmente sensibles de cada uno de los componentes, tales como cadenas laterales de O-acilo, fosfato o glicerolfosfato que pueden formar parte del epítipo del sacárido.

En una forma de realización, los conjugados de serotipo 33F de la invención comprenden un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de 10 % a 100 %. En algunas de esas formas de realización, el sacárido tiene un grado de O-acetilación de 50 % a 100 %. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un grado de O-acetilación de 75 % a 100 %. En otras formas de realización, el sacárido tiene un grado de O-acetilación mayor o igual a 70% ($\geq 70\%$).

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 33F de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de

polisacárido capsular de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,9.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el glucoconjugado con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,9.

Los glucoconjugados de serotipo 33F y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención comprenden menos de alrededor de 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de polisacárido de serotipo 33F libre en comparación con la

cantidad total de polisacárido de serotipo 33F. Preferentemente, el glucoconjugado de serotipo 33F comprende menos de 15% de sacárido libre, con mayor preferencia, menos de 10 % de sacárido libre y, aun con mayor preferencia, menos de 5 % de sacárido libre. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 33F comprende menos de alrededor de 25% de polisacárido de serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 33F comprende menos de alrededor de 20% de polisacárido de serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 33F. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 33F comprende menos de alrededor de 15% de polisacárido de serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 33F.

En determinadas formas de realización preferidas, la invención proporciona un glucoconjugado de serotipo 33F que tiene una o más de las siguientes características solas o en combinación: el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de 500 kDa a 10.000 KDa; la proteína portadora comprende 2 a 20 residuos de lisina ligados de manera covalente al sacárido; la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,2 a 4,0; el glucoconjugado comprende al menos una ligadura covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido; el sacárido tiene un grado de O-acetilación de 75 % a 100 %; el conjugado comprende menos de alrededor de 15 % de polisacárido libre con respecto al polisacárido total; la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 33F también se pueden caracterizar por la distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado, como se mencionó anteriormente.

En una forma de realización, al menos 15 % de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización, al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, al menos 35 % de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En formas de realización preferidas, al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60% de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 70% de los glucoconjugados de serotipo 33F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, 40 % a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 33F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50% a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 33F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 65% a 80% de los glucoconjugados de serotipo 33F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

1.3.4 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 15B

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 15B se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante una enlace de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto

puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En formas de realización preferidas, los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Preferentemente, antes de la oxidación, se realiza el dimensionamiento del polisacárido de serotipo 15B en un rango de peso molecular (MW) diana. De manera ventajosa, el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado se reduce mientras se conservan las características fundamentales de la estructura del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido de serotipo 15B purificado se reduce mediante homogeneización mecánica (véase la sección 1.2.6 más arriba).

La etapa de oxidación puede incluir la reacción con periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico, y también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido capsular de serotipo 15B es metaperiodato. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido capsular de serotipo 15B es metaperiodato de sodio.

En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0, 0,05 a 5,0, 0,1 a 1,0, 0,5 a 1,0, 0,7 a 0,8, 0,05 a 0,5, 0,1 a 0,3 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,15 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,25 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,5 equivalentes molares de agente

oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,6 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización preferida, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,7 equivalentes molares de agente oxidante.

En una forma de realización preferida, la duración de la reacción es de 1 hora a 50 horas, de 10 horas a 30 horas, de 15 horas a 20 horas, de 15 horas a 17 horas, o de alrededor de 16 horas.

En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a una temperatura de 15°C a 45°C, de 15 °C a 30 °C, de 20 °C a 25°C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a alrededor de 23 °C.

En una forma de realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado de fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) o Bis-Tris. En una forma de realización preferida, el amortiguador es fosfato de potasio.

En una forma de realización preferida, el amortiguador tiene una concentración de 1 mM a 500 mM, de 1 mM a 300 mM o de 50 mM a 200 mM. En una forma de realización preferida, el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 100 mM.

En una forma de realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de 4,0 a 8,0, de 5,0 a 7,0 o de 5,5 a 6,5. En una forma de realización preferida, el pH es de alrededor de 6,0.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado se obtiene haciendo reaccionar de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de polisacárido capsular de serotipo 15B aislado con 0,2 a 0,3 equivalentes molares de periodato a una temperatura de 20 °C a 25 °C.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado se purifica. El polisacárido capsular de serotipo 15B activado se purifica de acuerdo con métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio, tales como cromatografía de penetración en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido capsular activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular de serotipo 15B activado es de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 5, de 5 a 20, de 5 a 15, de 5 a 10, de 10 a 20, de 10 a 15 o de 15 a 20. En una forma de

realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular de serotipo 15B activado es de 2 a 10, de 4 a 8, de 4 a 6, de 6 a 8, de 6 a 12, de 8 a 12, de 9 a 11, de 10 a 16, de 12 a 16, de 14 a 18, de 16 a 20, de 16 a 18 o de 18 a 20.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 5 kDa a 500 kDa, de 50 kDa a 500 kDa, de 50 kDa a 450 kDa, de 100 kDa a 400 kDa, de 100 kDa a 350 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 350 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 300 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 250 kDa.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B

activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de ese polisacárido capsular de serotipo 15B.

En una forma de realización, el polisacárido capsular de serotipo 15B activado se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. Luego, se puede formular un compuesto con el polisacárido capsular activado liofilizado y una solución que comprende la proteína portadora.

En otra forma de realización, se formula un compuesto con el polisacárido capsular de serotipo 15B activado y la proteína portadora y se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora coliofilizados luego se pueden volver a suspender en solución y pueden hacerse reaccionar con un agente reductor.

El polisacárido capsular de serotipo 15B activado se puede conjugar con una proteína portadora mediante un proceso que comprende la etapa de:

(a) formular un compuesto con el polisacárido capsular de serotipo 15B activado y una proteína portadora, y

(b) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de serotipo 15B activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de serotipo 15B.

La conjugación de polisacárido de serotipo 15B activado con un portador de proteínas mediante aminación reductora en dimetilsulfóxido (DMSO) es adecuado para conservar el contenido de O-acetilo del polisacárido en comparación con, por ejemplo, la aminación reductora en solución acuosa donde el nivel de O-acetilación del

polisacárido se reduce significativamente. En una forma de realización preferida, la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en DMSO.

En una forma de realización preferida, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular de serotipo 15B liofilizado en una solución que comprende una proteína portadora y DMSO. En una forma de realización preferida, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular de serotipo 15B y la proteína portadora coliofilizados en DMSO.

Cuando las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en solución acuosa, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en un amortiguador, seleccionado preferentemente de PBS, MES, HEPES, Bis-tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Bicine o HEPB a un pH de 6,0 a 8,5, de 7,0 a 8,0 o de 7,0 a 7,5. En una forma de realización preferida, el amortiguador es PBS. En una forma de realización preferida, el pH es de alrededor de 7,3.

En una forma de realización preferida, la concentración de polisacárido capsular de serotipo 15B activado en la etapa (b) es de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml o de 0,5 mg/ml a 2 mg/ml. En una forma de realización preferida, la concentración de polisacárido capsular de serotipo 15B activado en la etapa (b) es de alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 mg/ml.

En una forma de realización preferida, la relación inicial (peso en peso) de polisacárido capsular de serotipo 15B activado con respecto a la proteína portadora es de 5:1 a 0,1:1, de 2:1 a 0,1:1, de 2:1 a 1:1, de 1,5:1 a 1:1, de 0,1:1 a 1:1, de 0,3:1 a 1:1 o de 0,6:1 a 1:1.

En una forma de realización preferida, la relación inicial de polisacárido capsular de serotipo 15B activado con respecto a la proteína portadora es de alrededor de 0,6:1 a 1:1. En otra forma de realización preferida, la relación inicial de polisacárido capsular de serotipo 15B activado con respecto a la proteína portadora es de alrededor de 0,6:1 a 1:1,5. Tal relación inicial es particularmente adecuada para obtener bajos niveles de polisacárido libre en el glucoconjugado.

En una forma de realización preferida, la relación inicial de polisacárido capsular de serotipo 15B activado con respecto a la proteína portadora es de alrededor de 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 o 2:1.

En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de

Bronsted o Lewis, amina boranos, tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMeiPrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB). En una forma de realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio. En una forma de realización preferida, el agente reductor es 2-picolina borano.

En una forma de realización preferida, la cantidad de agente reductor que se usa en la etapa (b) es de 0,1 a 10,0 equivalentes molares, de 0,5 a 5,0 equivalentes molares o de 1,0 a 2,0 equivalentes molares. En una forma de realización preferida, la cantidad de agente reductor que se usa en la etapa (b) es de alrededor de 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 equivalentes molares.

En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (b) es de 1 hora a 60 horas, de 10 horas a 50 horas, de 40 horas a 50 horas o de 42 horas a 46 horas. En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (b) es de alrededor de 44 horas.

En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene a una temperatura de 10 °C a 40 °C, de 15 °C a 30 °C o de 20 °C a 26 °C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene a alrededor de 23 °C.

En una forma de realización preferida, el proceso para la preparación de un glucoconjugado que comprende el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B ligado de manera covalente a una proteína portadora también comprende una etapa (etapa (c)) de bloqueo de aldehído sin reaccionar (inactivación) mediante la adición de NaBH₄.

En una forma de realización preferida, la cantidad de NaBH₄ que se usa en la etapa (c) es de 0,1 a 10 equivalentes molares, de 0,5 a 5,0 equivalentes molares o de 1,0 a 3,0 equivalentes molares. En una forma de realización preferida, la cantidad de NaBH₄ que se usa en la etapa (c) es de alrededor de 2,0 equivalentes molares.

En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (c) es de 0,1 horas a 10 horas, de 0,5 horas a 5 horas o de 2 horas a 4 horas. En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (c) es de alrededor de 3 horas.

En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a una temperatura de 15°C a 45°C, de 15 °C a 30 °C o de 20 °C a 26 °C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a alrededor de 23 °C.

En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de

conjugación es mayor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es mayor de 60 %. En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es mayor de 70%. El rendimiento es la cantidad de polisacárido de serotipo 15B en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.

En una forma de realización preferida, el proceso para la preparación de un glucoconjugado que comprende el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B ligado de manera covalente a una proteína portadora comprende las etapas de:

- (a) dimensionar el polisacárido de serotipo 15B purificado mediante homogeneización de alta presión;
- (b) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 15B dimensionado con un agente oxidante;
- (c) formular un compuesto con el polisacárido de serotipo 15B activado y una proteína portadora,
- (d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido de serotipo 15B activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de serotipo 15B; y
- (e) bloquear el aldehído sin reaccionar (inactivación) mediante la adición de NaBH_4 .

En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa d) del proceso anterior es mayor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa d) es mayor de 60 %. En una forma de realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa d) es mayor de 70%. El rendimiento es la cantidad de polisacárido de serotipo 15B en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.

Después de la conjugación del polisacárido capsular de serotipo 15B con la proteína portadora, el conjugado proteína-polisacárido se puede purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas conocidas por la persona del oficio de nivel medio. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

En una forma de realización, la proteína portadora es como se definió en la

sección 1.1. En una forma de realización, la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (toxóide tetánico), CRM₁₉₇, otros mutantes de DT, PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*) o sus equivalentes inmunológicamente funcionales. En una forma de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 15B de la presente invención se conjugan con la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de 5 kDa a 1.500 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 10 kDa a 1.500 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 50 kDa a 250 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 250 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa; o de 200 kDa a 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción. En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa. En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 20.000 kDa. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa, de 5.000 kDa a 10.000 kDa, de 5.000 kDa a 20.000 kDa, de 8.000 kDa a 20.000 kDa, de 8.000 kDa a 16.000 kDa o de 10.000 kDa a 16.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de alrededor de 1.000 kDa, alrededor de 1.500 kDa, alrededor de 2.000 kDa, alrededor de 2.500 kDa, alrededor de 3.000 kDa, alrededor de 3.500 kDa, alrededor de 4.000 kDa, alrededor de 4.500 kDa, alrededor de 5.000 kDa, alrededor de 5.500 kDa, alrededor de 6.000 kDa, alrededor de 6.500 kDa, alrededor de 7.000 kDa, alrededor de 7.500 kDa, alrededor de 8.000 kDa, alrededor de 8.500 kDa, alrededor de 9.000 kDa, alrededor de 9.500 kDa alrededor de 10.000 kDa, alrededor de 10.500 kDa, alrededor de 11.000 kDa, alrededor de 11.500 kDa, alrededor de 12.000 kDa, alrededor de 12.500 kDa, alrededor de 13.000 kDa, alrededor de 13.500 kDa, alrededor de 14.000 kDa, alrededor de 14.500 kDa, alrededor de 15.000 kDa, alrededor de 15.500 kDa, alrededor de 16.000 kDa, alrededor de 16.500 kDa,

alrededor de 17.000 kDa, alrededor de 17.500 kDa, alrededor de 18.000 kDa, alrededor de 18.500 kDa alrededor de 19.000 kDa, alrededor de 19.500 kDa o alrededor de 20.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 20.000 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 3.000 kDa; de 2.000 kDa a 20.000 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 15.000 kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.500 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa; de 3.000 kDa a 4.000 kDa; de 4.000 kDa a 20.000 kDa; de 4.000 kDa a 15.000 kDa; de 4.000 kDa a 12.500 kDa; de 4.000 kDa a 10.000 kDa; de 4.000 kDa a 7.500 kDa; de 4.000 kDa a 6.000 kDa o de 4.000 kDa a 5.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de 5.000 kDa a 20.000 kDa; de 5.000 kDa a 15.000 kDa; de 5.000 kDa a 10.000 kDa; de 5.000 kDa a 7.500 kDa; de 6.000 kDa a 20.000 kDa; de 6.000 kDa a 15.000 kDa; de 6.000 kDa a 12.500 kDa; de 6.000 kDa a 10.000 kDa o de 6.000 kDa a 7.500 kDa.

El peso molecular del glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción. En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 15B se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) entre el sacárido y la proteína portadora. En una forma de realización preferida, la relación (peso en peso) del polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,5 a 3,0 (por ejemplo, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9 o alrededor de 3,0). En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto

a la proteína portadora en el conjugado es de 0,4 a 2. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,5 a 2,0, de 0,5 a 1,5, de 0,5 a 1,0, de 1,0 a 1,5, de 1,0 a 2,0. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,7 a 0,9.

Los glucoconjugados de serotipo 15B y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende menos de alrededor de 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o 15 % de polisacárido capsular de serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende menos de alrededor de 25 % de polisacárido capsular de serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende menos de alrededor de 20% de polisacárido capsular de serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención comprenden menos de alrededor de 15% de polisacárido capsular de serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 15B.

Los glucoconjugados de serotipo 15B también se pueden caracterizar por su distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado, como se mencionó anteriormente.

En una forma de realización preferida, al menos 20 % de los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 30 % de conjugado inmunógeno tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 40% de los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una

forma de realización preferida, al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % de los glucoconjugados de serotipo 15 de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60% de los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 70% de los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, 40 % a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 15B tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50% a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 15B tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 65% a 80% de los glucoconjugados de serotipo 15B tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,9. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,9. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 15B de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación). Los datos de la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes a los polisacáridos, se pueden obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos en el estado de la técnica. La conjugación produce una reducción de la cantidad de residuos de lisina recuperados en comparación con el material de inicio de la proteína CRM₁₉₇ que se usa para generar los materiales conjugados.

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 15B de la invención es de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6,

de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 15B de la invención es de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o alrededor de 15. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 15B de la invención es de 2 a 5.

1.3.5 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F

En los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F de la presente invención, el sacárido se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido y un oligosacárido, y la proteína portadora se selecciona de cualquier portador adecuado como se describe en la presente o es conocido por las personas del oficio de nivel medio. En algunas formas de realización preferidas, el sacárido es un polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 12F.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F se preparan usando CDAP. Los polisacáridos se activan con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado luego se acopla directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora (preferentemente, CRM₁₉₇). Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante un enlace de tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla con hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjugua con la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas.

Otras técnicas de conjugación usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-

518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En una forma de realización, los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* serotipo 12F se conjugan con la proteína portadora mediante aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido de serotipo 12F se hidroliza opcionalmente (se dimensiona). Se puede usar hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético.

En una forma de realización, el agente oxidante es periodato. El término 'periodato' incluye periodato y ácido periódico (véase más adelante).

En una forma de realización preferida, el agente oxidante es el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante. En tal forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F se preparan usando el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) para oxidar alcoholes primarios de sacárido a aldehídos usando N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante (en adelante "oxidación de TEMPO/NCS"), tal como se describe en el Ejemplo 7 y en WO 2014/097099. Por lo tanto, en un aspecto, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F se pueden obtener mediante un método que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido de 12F con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un solvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amina (en adelante "aminación reductora de TEMPO/NCS"). En un aspecto, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F se obtienen mediante ese método. En una forma de realización, el grado de oxidación del sacárido de 12F activado varía de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12,

de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40, de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20 o de 10 a 15. En otro aspecto, el grado de oxidación del sacárido activado es de 1, 2, 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, 35, 36, 37, 38, 39 o 40. Preferentemente, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En una forma de realización, antes de la etapa a), el sacárido de 12F se hidroliza a un peso molecular que varía de 100 kDa a 400 kDa. Por ejemplo, en un aspecto, el peso molecular varía de 100 kDa a 350 kDa, de 100 kDa a 300 kDa, de 100 kDa a 250 kDa, de 100 kDa a 200 kDa, de 100 kDa a 150 kDa, de 200 kDa a 400 kDa, de 200 kDa a 350 kDa, de 200 kDa a 300 kDa, de 200 kDa a 250 kDa, de 300 kDa a 400 kDa o de 300 kDa a 350 kDa.

En otro aspecto, el método también comprende la etapa de purificación del polisacárido activado antes de la etapa b). En otro aspecto, los métodos también comprenden la etapa de adición de un agente reductor después de la etapa b). En un aspecto, el agente reductor es NaCNBH₃. En otro aspecto, los métodos también comprenden la etapa de adición de NaBH₄ después de la adición de NaCNBH₃. En otro aspecto, el método comprende una etapa de purificación después de la adición de NaBH₄.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F producido, o que se puede obtener, mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente. Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción proporciona un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F que comprende un sacárido conjugado con una proteína portadora que se produce o se puede obtener mediante el método que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un solvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amina.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F de la presente invención tiene un peso molecular de alrededor de 50 kDa a alrededor de 20.000 kDa. En otra forma de realización, el glucoconjugado tiene un peso molecular de alrededor de 200 kDa a alrededor de 10.000 kDa. En otra forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F tiene un peso molecular

de alrededor de 500 kDa a alrededor de 5.000 kDa. En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F tiene un peso molecular de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 3.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F tiene un peso molecular de alrededor de 600 kDa a alrededor de 2.800 kDa; de alrededor de 700 kDa a alrededor de 2.700 kDa; de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 2.000 kDa; de alrededor de 1.800 kDa a alrededor de 2.500 kDa; de alrededor de 1.100 kDa a alrededor de 2.200 kDa; de alrededor de 1.900 kDa a alrededor de 2.700 kDa; de alrededor de 1.200 kDa a alrededor de 2.400 kDa; de alrededor de 1.700 kDa a alrededor de 2.600 kDa; de alrededor de 1.300 kDa a alrededor de 2.600 kDa; de alrededor de 1.600 kDa a alrededor de 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F de la invención tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 20.000 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 3.000 kDa; de 2.000 kDa a 20.000 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 12F de la invención es de 2 a 20, de 4 a 16, de 4 a 15, de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 12F de la invención es de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18,

alrededor de 19 o alrededor de 20.

La cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora conjugada con el sacárido también se puede expresar como una relación molar. Por ejemplo, en un glucoconjugado donde 4 a 15 residuos de lisina de CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido, la relación molar de lisinas conjugadas con CRM₁₉₇ en el glucoconjugado es de alrededor de 10:1 a alrededor 40:1. En una composición inmunógena donde 2 a 20 residuos de lisina de CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido, la relación molar de lisinas conjugadas con CRM₁₉₇ en el glucoconjugado es de alrededor de 5:1 a alrededor de 50:1. En una forma de realización, en el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F de la presente invención, la relación molar de lisinas conjugadas con la proteína portadora es de alrededor de 10:1 a alrededor de 25:1. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En algunas formas de realización, la CRM₁₉₇ puede comprender alrededor de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 residuos de lisina de 39 ligados de manera covalente al sacárido. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

En una forma de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,2 a 4,0 en el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F (por ejemplo, alrededor de 0,2, alrededor de 0,3, alrededor de 0,4, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9 o alrededor de 4,0). En otra forma de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 1,1 a 1,7 en el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F. En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,8 a 1,8 (por ejemplo, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7 o alrededor de 1,8). En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En algunas de esas formas de realización, la proteína

portadora es CRM₁₉₇. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

La frecuencia de unión de la cadena de sacáridos a una lisina en la proteína portadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados de serotipo 12F de la descripción. Por ejemplo, en una forma de realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido cada 100 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En una forma de realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 50 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En una forma de realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 4 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 10 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En formas de realización habituales, la proteína portadora es CRM₁₉₇, y el enlace covalente entre CRM₁₉₇ y el polisacárido se produce al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido.

En otras formas de realización, el conjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el sacárido por cada 5 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 3 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 9 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 15 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 6 unidades de repetición de sacáridos, cada 3 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 20 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 25 unidades de repetición de sacáridos o cada 2 a

25 unidades de repetición de sacáridos. En formas de realización frecuentes, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En otra forma de realización, al menos un enlace entre CRM₁₉₇ y el sacárido se produce cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F de la invención comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 4 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 10 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En otra forma de realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

Los glucoconjugados de serotipo 12F y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención comprenden menos de alrededor de 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F comprende menos de alrededor de 45% de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En otra forma de realización, el glucoconjugado comprende menos de alrededor

de 30 % de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En otra forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F comprende menos de alrededor 20 % de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En otra forma de realización, el glucoconjugado comprende menos de alrededor de 10% de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación de la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En otra forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F comprende menos de alrededor 5% de polisacárido de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido de serotipo 12F. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F de la presente invención comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa; o de 200 kDa a 400 kDa. En algunas de esas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 12F se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora de TEMPO/NCS.

Los glucoconjugados de serotipo 12F también se pueden caracterizar por su distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado, como se mencionó anteriormente.

En una forma de realización preferida, al menos 35 % de los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60% de los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de

realización preferida, al menos 70% de los glucoconjugados de serotipo 12F de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, 40 % a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 12F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50% a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 12F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 65% a 80% de los glucoconjugados de serotipo 12F tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

1.3.6 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 10A

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 10A se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante un enlace de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una

proteína.

En formas de realización preferidas, los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido de serotipo 10A se hidroliza opcionalmente (se dimensiona). Se puede usar hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético.

En una forma de realización, el polisacárido de serotipo se activa (se oxida) mediante un proceso que comprende las etapas de:

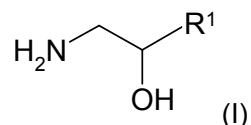
(a) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 10A aislado con un agente oxidante; y

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido de serotipo 10A activado;

En una forma de realización preferida, el agente oxidante es periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico, y también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En una forma de realización preferida, el agente oxidante es periodato de sodio. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido de serotipo 10A es metaperiodato. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido de serotipo 10A es metaperiodato de sodio.

En una forma de realización, el agente de inactivación se selecciona de dioles próximos, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un 1,2-aminoalcohol de la Fórmula (I):



en donde R^1 se selecciona de H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

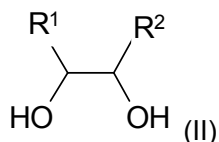
En una forma de realización, el agente de inactivación se selecciona de sales de sodio y potasio de sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un aminoácido. En tales formas de realización, el aminoácido se puede seleccionar de serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, prolina, hidroxiprolina, triptófano, tirosina e histidina.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un sulfito, tal como bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato.

En una forma de realización, el agente de inactivación es un compuesto que comprende dos grupos hidroxilo próximos (dioles próximos), es decir, dos grupos hidroxilo ligados de manera covalente a dos átomos de carbono adyacentes.

Preferentemente, el agente de inactivación es un compuesto de la Fórmula (II):



en donde R^1 y R^2 se seleccionan, cada uno independientemente, de H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En una forma de realización preferida, el agente de inactivación es glicerol, etilenglicol, propan-1,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol, ácido ascórbico. En una forma de realización preferida, el agente de inactivación es butan-2,3-diol.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A aislado se activa mediante un proceso que comprende la etapa de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido de serotipo 10A aislado con periodato; y

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando butan-2,3-diol que da como resultado un polisacárido de serotipo 10A activado.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se considera que el polisacárido está activado, y se denomina “polisacárido activado” en adelante.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado se purifica. El polisacárido de serotipo 10A activado se purifica de acuerdo con métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio, tales como cromatografía de penetración en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido de 10A activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido de serotipo 10A activado es de 2 a 30, de 2 a 25, de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 5, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 15, de 5 a 10, de 10 a 30, de 10 a 25, de 10 a 20, de 10 a 15, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 20, de 20 a 30 o de 20 a 25. En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido de serotipo 10A

activado es de 2 a 10, de 4 a 8, de 4 a 6, de 6 a 8, de 6 a 12, de 8 a 14, de 9 a 11, de 10 a 16, de 12 a 16, de 14 a 18, de 16 a 20, de 16 a 18, de 18 a 22 o de 18 a 20.

En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado tiene un peso molecular de 50 kDa a 400 kDa, de 50 kDa a 350 kDa, de 50 kDa a 300 kDa, de 50 kDa a 250 kDa, de 50 kDa a 200 kDa, de 100 kDa a 300 kDa, de 100 kDa a 250 kDa o de 100 kDa a 200 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado tiene un peso molecular de 50 kDa a 300 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 200 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 200 kDa y un grado de oxidación de 5 a 20, de 5 a 15, de 8 a 14, de 8 a 12 o de 9 a 11. En una forma de realización preferida, el polisacárido de serotipo 10A activado tiene un peso molecular de 100 kDa a 200 kDa y un grado de oxidación de 9 a 11.

El polisacárido activado y/o la proteína portadora pueden liofilizarse, ya sea de manera independiente (liofilización discreta) o juntos (coliofilizarse).

En una forma de realización, el polisacárido de serotipo 10A activado se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. En una forma de realización, luego se formula un compuesto con el polisacárido activado liofilizado y una solución que comprende la proteína portadora.

En otra forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se coliofilizan. En tales formas de realización, se formula un compuesto con el polisacárido de serotipo 10A activado y la proteína portadora y se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora coliofilizados luego se pueden volver a suspender en solución y pueden hacerse reaccionar con un agente reductor.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor.

El polisacárido de serotipo 10A activado se puede conjugar con una proteína

portadora mediante un proceso que comprende la etapa de:

(c) formular un compuesto con el polisacárido de serotipo 10A activado y una proteína portadora; y

(d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido de serotipo 10A activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido de serotipo 10A.

En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente acuoso; en otra forma de realización, la reacción se lleva a cabo en solvente aprótico. En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida). El solvente de DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se liofilizó.

En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, amina boranos, tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMeiPrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB). En una forma de realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, que se pueden bloquear usando un agente bloqueante adecuado. En una forma de realización, este agente bloqueante es borohidruro de sodio (NaBH₄).

Después de la conjugación del polisacárido de serotipo 10A con la proteína portadora, el glucoconjugado se puede purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas conocidas por la persona del oficio de nivel medio. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 10A de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de

100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa; o de 200 kDa a 400 kDa. En algunas de esas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 10A se preparan usando aminación reductora.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 50 kDa a 15.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 500 kDa a 15.000 kDa, de 500 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; o de 3.000 kDa a 8.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 10.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 8.000 kDa. Aun en otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 2.000 kDa a 8.000 kDa o de 3.000 kDa a 7.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 200 kDa a 20.000 kDa; de 200 kDa a 15.000 kDa; de 200 kDa a 10.000 kDa; de 200 kDa a 7.500 kDa; de 200 kDa a 5.000 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 500 kDa a 20.000 kDa; de 500 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 12.500 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 500 kDa a 7.500 kDa; de 500 kDa a 6.000 kDa; de 500 kDa a 5.000 kDa; de 500 kDa a 4.000 kDa; de 500 kDa a 3.000 kDa; de 500 kDa a 2.000 kDa; de 500 kDa a 1.500 kDa; de 500 kDa a 1.000 kDa; de 750 kDa a 20.000 kDa; de 750 kDa a 15.000 kDa; de 750 kDa a 12.500 kDa; de 750 kDa a 10.000 kDa; de 750 kDa a 7.500 kDa; de 750 kDa a 6.000 kDa; de 750 kDa a 5.000 kDa; de 750 kDa a 4.000 kDa; de 750 kDa a 3.000 kDa; de 750 kDa a 2.000 kDa; de 750 kDa a 1.500 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 12.500 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 6.000 kDa; de 1.000 kDa a 5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 2.500 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 15.000

kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.500 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa; de 4.000 kDa a 20.000 kDa; de 4.000 kDa a 15.000 kDa; de 4.000 kDa a 12.500 kDa; de 4.000 kDa a 10.000 kDa; de 4.000 kDa a 7.500 kDa; de 4.000 kDa a 6.000 kDa; o de 4.000 kDa a 5.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 5.000 kDa a 20.000 kDa; de 5.000 kDa a 15.000 kDa; de 5.000 kDa a 10.000 kDa o de 5.000 kDa a 7.500 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 6.000 kDa a 20.000 kDa; de 6.000 kDa a 15.000 kDa; de 6.000 kDa a 10.000 kDa o de 6.000 kDa a 7.500 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 7.000 kDa a 20.000 kDa; de 7.000 kDa a 15.000 kDa; de 7.000 kDa a 10.000 kDa o de 7.000 kDa a 8.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de 8.000 kDa a 20.000 kDa; de 8.000 kDa a 15.000 kDa; o de 8.000 kDa a 10.000 kDa.

Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción. El peso molecular del glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación). Los datos de la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes a los polisacáridos, se pueden obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos en el estado de la técnica. La conjugación produce una reducción de la cantidad de residuos de lisina recuperados en comparación con el material de inicio de la proteína CRM₁₉₇ que se usa para generar los materiales conjugados.

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 10A es de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 10A es de 6 a 8. En una forma de realización preferida, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) de sacárido con respecto a la proteína portadora. En algunas formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la

proteína portadora (p/p) es de 0,5 a 3,0 (por ejemplo, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9 o alrededor de 3,0). En una forma de realización preferida, la relación de sacárido de serotipo 10A con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,5 a 2,0, 0,5 a 1,5, 0,5 a 1,0, 1,0 a 1,5 o 1,0 a 2,0. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido de serotipo 10A con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,8 a 1,4. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido de serotipo 10A con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de 0,8 a 1,2 (por ejemplo, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1 o alrededor de 1,2). En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 10A y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención comprenden menos de alrededor de 50 % de sacárido libre, menos de alrededor de 45 % de sacárido libre, menos de alrededor de 40 % de sacárido libre, menos de alrededor de 35 % de sacárido libre, menos de alrededor de 30 % de sacárido libre, menos de alrededor de 25% de sacárido libre, menos de alrededor de 20 % de sacárido libre, menos de alrededor de 15 % de sacárido libre, menos de alrededor de 10 % de sacárido libre o menos de alrededor de 5 % de sacárido libre con respecto a la cantidad total de sacárido de 10A. Preferentemente, el glucoconjugado de serotipo 10A comprende menos de 15 % de sacárido libre, con mayor preferencia, menos de 10 % de sacárido libre y, aun con mayor preferencia, menos de 5 % de sacárido libre.

Los glucoconjugados de serotipo 10A también se pueden caracterizar por la distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular

relativa del conjugado, como se mencionó anteriormente.

En una forma de realización preferida, al menos 30 % de los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 40% de los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % de los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60 % de los glucoconjugados de serotipo 10A tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50 % a 80 % de los glucoconjugados de serotipo 10A de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

1.3.7 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 11A

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 11A se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante un enlace de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979). Biol. Chern. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto

puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En formas de realización preferidas, los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido de serotipo 11A se hidroliza opcionalmente para reducir su viscosidad. Se puede usar hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético. El dimensionamiento mecánico se puede llevar a cabo mediante cizallamiento de homogeneización de alta presión.

La etapa de oxidación puede incluir la reacción con periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico; el término también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En una forma de realización, el polisacárido capsular de serotipo 11A de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de metaperiodato, preferentemente, en presencia de periodato de sodio (NaIO_4). En otra forma de realización, el polisacárido capsular de serotipo 11A se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente, en presencia de ácido periódico.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se considera que el polisacárido está activado, y se denomina "polisacárido activado" más adelante. El polisacárido activado se puede purificar y liofilizar.

El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse, ya sea de manera independiente (liofilización discreta) o juntos (coliofilizarse). En una forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se coliofilizan. En otra forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.

En una forma de realización, la liofilización se lleva a cabo en presencia de un azúcar no reductor. Los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente acuoso; en otra forma de realización, la reacción se lleva a cabo en solvente aprótico. En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida). El solvente de DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se liofilizó.

En una forma de realización, se usan de 0,1 a 3,0, de 0,15 a 2,0, de 0,2 a 2,0 o de 0,5 a 1,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción. En una forma de realización, se usan alrededor de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

En una forma de realización, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. En otra forma de realización, se usan de 1,0 a 6,0 equivalentes molares, de 2,0 a 5,0 equivalentes molares o alrededor de 3,0 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados. Estos se pueden bloquear usando un agente bloqueante adecuado. En una forma de realización, este agente bloqueante es borohidruro de sodio (NaBH_4). En una forma de realización, el bloqueo se logra mezclando la reacción de reducción con 0,5 a 5,0 equivalentes molares de NaBH_4 , por ejemplo, alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 equivalentes molares de NaBH_4 .

Después de la conjugación (la reacción de reducción y, opcionalmente, el bloqueo), los glucoconjugados se pueden purificar. Los glucoconjugados se pueden purificar mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño. En una forma de realización, los glucoconjugados se purifican mediante diafiltración, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

En una forma de realización, los glucoconjugados se filtran de manera estéril.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 11A de la presente invención se conjugan con la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 50 kDa a 400 kDa; de 50 kDa a 300 kDa; de 50 kDa a 200 kDa; de 50 kDa a 100 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de 100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 100 kDa a 200 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa o de 200 kDa a 300 kDa.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 50 kDa a 15.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 500 kDa a 10.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 200 kDa a 10.000 kDa. Aun en otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 8.000 kDa o de 2.000 kDa a 8.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de 200 kDa a 20.000 kDa; de 200 kDa a 17.500 kDa; de 200 kDa a 15.000 kDa; de 200 kDa a 10.000 kDa; de 200 kDa a 7.500 kDa; de 200 kDa a 5.000 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 500 kDa a 20.000 kDa; de 500 kDa a 17.500 kDa; de 500 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 12.500 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 500 kDa a 7.500 kDa; de 500 kDa a 6.000 kDa; de 500 kDa a 5.000 kDa; de 500 kDa a 4.000 kDa; de 500 kDa a 3.000 kDa; de 500 kDa a 2.000 kDa; de 500 kDa a 1.500 kDa; de 500 kDa a 1.000 kDa; de 700 kDa a 20.000 kDa; de 700 kDa a 17.500 kDa; de 700 kDa a 15.000 kDa; de 700 kDa a 12.500 kDa; de 700 kDa a 10.000 kDa; de 700 kDa a 7.500 kDa; de 700 kDa a 6.000 kDa; de 700 kDa a 5.000 kDa; de 700 kDa a 4.500 kDa; de 700 kDa a 4.000 kDa; de 700 kDa a 3.500 kDa; de 700 kDa a 3.000 kDa; de 700 kDa a 2.000 kDa; de 700 kDa a 1.500 kDa; de 1.000 kDa a 20.000 kDa; de 1.000 kDa a 17.500

kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 12.500 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 6.000 kDa; de 1.000 kDa a 5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 2.500 kDa; de 2.000 kDa a 20.000 kDa; de 2.000 kDa a 17.500 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 17.500 kDa; de 3.000 kDa a 15.000 kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.500 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa; de 4.000 kDa a 20.000 kDa; de 4.000 kDa a 17.500 kDa; de 4.000 kDa a 15.000 kDa; de 4.000 kDa a 12.500 kDa; de 4.000 kDa a 10.000 kDa; de 4.000 kDa a 7.500 kDa; de 4.000 kDa a 6.000 kDa; o de 4.000 kDa a 5.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de 5.000 kDa a 20.000 kDa; de 5.000 kDa a 17.500 kDa; de 5.000 kDa a 15.000 kDa; de 5.000 kDa a 10.000 kDa o de 5.000 kDa a 7.500 kDa.

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 11A se preparan usando aminación reductora.

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,3, 0,5, 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, 3,0, 3,4, 3,8, 4,2, 4,6 o 5,0 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 1,8, 2,2 o 2,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización, el glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, 3,0, 3,4, 3,8, 4,2 o 4,6 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A y menos de alrededor de 5,0 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6 o 3,0 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A y menos de alrededor de 3,4 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6 o alrededor de 3,0 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A y menos de alrededor de 3,3 mM de acetato por mM de polisacárido de serotipo 11A. Cualquiera de los números anteriores

se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,9. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una forma de realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,9. En una forma de realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis de HPLC iónica.

En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 0,2, 0,3 o 0,4 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A y menos de alrededor de 1,0 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A. En una forma de realización preferida, el glucoconjugado de serotipo 11A de la invención

comprende al menos 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A y menos de alrededor de 0,8 mM de glicerol por mM de polisacárido de serotipo 11A. Cualquiera de los números anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

Los datos de la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes a los polisacáridos, se pueden obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos en el estado de la técnica. La conjugación produce una reducción de la cantidad de residuos de lisina recuperados en comparación con el material de inicio de la proteína CRM₁₉₇ que se usa para generar los materiales conjugados.

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 11A de la invención es de 1 a 15, de 1 a 13, de 1 a 10, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 11A de la invención es de alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o alrededor de 15. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 11A de la invención es de 1 a 6 o de 2 a 5. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) de sacárido con respecto a la proteína portadora. En algunas formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,2 a 4,0 (por ejemplo, alrededor de 0,2, alrededor de 0,3, alrededor de 0,4, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de

3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9 o alrededor de 4,0). En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,7 a 2,5, de 0,8 a 2,0, de 0,7 a 2,0, de 0,8 a 1,5, de 0,7 a 1,5, de 0,7 a 1,4, de 0,8 a 1,4, de 0,7 a 1,45 o de 0,8 a 1,45. En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,8 a 1,6 (por ejemplo, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5 o alrededor de 1,6). En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 11A se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados de serotipo 11A y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención comprenden menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 11A libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 11A, menos de alrededor de 45 % de sacárido libre, menos de alrededor de 40 % de sacárido libre, menos de alrededor de 35 % de sacárido libre, menos de alrededor de 30 % de sacárido libre, menos de alrededor de 25 % de sacárido libre, menos de alrededor de 20 % de sacárido libre, menos de alrededor de 15 % de sacárido libre, menos de alrededor de 10 % de sacárido libre o menos de alrededor de 5 % de polisacárido capsular de serotipo 11A libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 11A. Preferentemente, el glucoconjugado de serotipo 11A comprende menos de 15 % de sacárido libre, con mayor preferencia, menos de 10 % de sacárido libre y, aun con mayor preferencia, menos de 5 % de sacárido libre.

Los glucoconjugados de serotipo 11A también se pueden caracterizar por la distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado, como se mencionó anteriormente.

En una forma de realización preferida, al menos 30 % de los glucoconjugados

de serotipo 11A de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 % de los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 60% de los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 65% de los glucoconjugados de serotipo 11A de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

1.3.8 Glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 8

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante una enlace de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla a hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario de carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI con un grupo amino en una

proteína.

En formas de realización preferidas, los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido de serotipo 8 se hidroliza opcionalmente para reducir su viscosidad. Se puede usar hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético.

La etapa de oxidación puede incluir la reacción con periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye periodato y ácido periódico, y también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}) y las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En una forma de realización, el polisacárido capsular de serotipo 8 de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de metaperiodato, preferentemente, en presencia de periodato de sodio (NaIO_4). En otra forma de realización, el polisacárido capsular de serotipo 8 se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente, en presencia de ácido periódico.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se considera que el polisacárido está activado, y se denomina "polisacárido activado" más adelante. El polisacárido activado se puede purificar y liofilizar.

El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse, ya sea de manera independiente (liofilización discreta) o juntos (coliofilizarse). En una forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se coliofilizan. En otra forma de realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.

En una forma de realización, la liofilización se lleva a cabo en presencia de un azúcar no reductor. Los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en

solvente acuoso; en otra forma de realización, la reacción se lleva a cabo en solvente aprótico. En una forma de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida). El solvente de DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se liofilizó.

En una forma de realización, se usan de 0,1 a 3,0, de 0,15 a 2,0, de 0,2 a 1,0 o de 0,25 a 0,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción. En una forma de realización, se usan alrededor de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

En una forma de realización, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. En otra forma de realización, se usan de 1,0 a 6,0 equivalentes molares, de 2,0 a 5,0 equivalentes molares o alrededor de 3,0 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, que se pueden bloquear usando un agente bloqueante adecuado. En una forma de realización, este agente bloqueante es borohidruro de sodio (NaBH_4). En una forma de realización, el bloqueo se logra mezclando la reacción de reducción con 0,5 a 5,0 equivalentes molares de NaBH_4 , por ejemplo, alrededor de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 equivalentes molares de NaBH_4 .

Después de la conjugación (la reacción de reducción y, opcionalmente, el bloqueo), los glucoconjugados se pueden purificar. Los glucoconjugados se pueden purificar mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño. En una forma de realización, los glucoconjugados se purifican mediante diafiltración, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

En una forma de realización, los glucoconjugados se filtran de manera estéril.

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 de la presente invención se conjugan con la proteína portadora (por ejemplo, CRM_{197}) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 2.000 kDa. En otras de esas formas de realización, el sacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 1.750 kDa; de 50 kDa a 1.500 kDa; de 50 kDa a 1.250 kDa; de 50 kDa a 1.000 kDa; de 50 kDa a 750 kDa; de 50 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 2.000 kDa; de

100 kDa a 1.750 kDa; de 100 kDa a 1.500 kDa; de 100 kDa a 1.250 kDa; de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 750 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 2.000 kDa; de 200 kDa a 1.750 kDa; de 200 kDa a 1.500 kDa; de 200 kDa a 1.250 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 750 kDa; o de 200 kDa a 500 kDa; o de 200 kDa a 400 kDa. En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

En algunas formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 50 kDa a 15.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 500 kDa a 10.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 200 kDa a 10.000 kDa. Aun en otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 8.000 kDa o de 2.000 kDa a 8.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 200 kDa a 20.000 kDa; de 200 kDa a 15.000 kDa; de 200 kDa a 10.000 kDa; de 200 kDa a 7.500 kDa; de 200 kDa a 5.000 kDa; de 200 kDa a 3.000 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 500 kDa a 20.000 kDa; de 500 kDa a 15.000 kDa; de 500 kDa a 12.500 kDa; de 500 kDa a 10.000 kDa; de 500 kDa a 7.500 kDa; de 500 kDa a 6.000 kDa; de 500 kDa a 5.000 kDa; de 500 kDa a 4.000 kDa; de 500 kDa a 3.000 kDa; de 500 kDa a 2.000 kDa; de 500 kDa a 1.500 kDa; de 500 kDa a 1.000 kDa; de 750 kDa a 20.000 kDa; de 750 kDa a 15.000 kDa; de 750 kDa a 12.500 kDa; de 750 kDa a 10.000 kDa; de 750 kDa a 7.500 kDa; de 750 kDa a 6.000 kDa; de 750 kDa a 5.000 kDa; de 750 kDa a 4.000 kDa; de 750 kDa a 3.000 kDa; de 750 kDa a 2.000 kDa; de 750 kDa a 1.500 kDa; de 1.000 kDa a 15.000 kDa; de 1.000 kDa a 12.500 kDa; de 1.000 kDa a 10.000 kDa; de 1.000 kDa a 7.500 kDa; de 1.000 kDa a 6.000 kDa; de 1.000 kDa a 5.000 kDa; de 1.000 kDa a 4.000 kDa; de 1.000 kDa a 2.500 kDa; de 2.000 kDa a 15.000 kDa; de 2.000 kDa a 12.500 kDa; de 2.000 kDa a 10.000 kDa; de 2.000 kDa a 7.500 kDa; de 2.000 kDa a 6.000 kDa; de 2.000 kDa a 5.000 kDa; de 2.000 kDa a 4.000 kDa; o de 2.000 kDa a 3.000 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 3.000 kDa a 20.000 kDa; de 3.000 kDa a 15.000 kDa; de 3.000 kDa a 10.000 kDa; de 3.000 kDa a 7.500 kDa; de 3.000 kDa a 5.000 kDa; de 4.000 kDa a 20.000 kDa; de 4.000 kDa a 15.000 kDa; de 4.000 kDa a 12.500 kDa; de 4.000 kDa a 10.000 kDa; de 4.000 kDa a 7.500 kDa; de 4.000 kDa a 6.000 kDa; o de

4.000 kDa a 5.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 5.000 kDa a 20.000 kDa; de 5.000 kDa a 15.000 kDa; de 5.000 kDa a 10.000 kDa, o de 5.000 kDa a 7.500 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 6.000 kDa a 20.000 kDa; de 6.000 kDa a 15.000 kDa; de 6.000 kDa a 10.000 kDa, o de 6.000 kDa a 7.500 kDa.

En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 7.000 kDa a 20.000 kDa; de 7.000 kDa a 15.000 kDa; de 7.000 kDa a 10.000 kDa, o de 7.000 kDa a 8.000 kDa. En otras formas de realización, el glucoconjugado de serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de 8.000 kDa a 20.000 kDa; de 8.000 kDa a 15.000 kDa; o de 8.000 kDa a 10.000 kDa.

En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

Otra manera de caracterizar los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención es mediante la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) que se conjugan con el sacárido, que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

Los datos de la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a enlaces covalentes a los polisacáridos, se pueden obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos en el estado de la técnica. En formas de realización habituales, la proteína portadora se conjuga en forma covalente con el polisacárido activado mediante un enlace de amina con uno o más grupos ϵ -amino de residuos de lisina en la proteína portadora. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora comprende de 2 a 20 residuos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido. En otras de esas formas de realización, la proteína portadora comprende de 4 a 16 o de 6 a 14 residuos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido.

En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 8 de la invención es de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 8 de la invención es de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o

alrededor de 15. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 8 de la invención es de 4 a 16 o de 6 a 14. En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En una forma de realización preferida, la proteína portadora comprende CRM₁₉₇, que contiene 39 residuos de lisina. En algunas de esas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender de 4 a 16 o de 6 a 14 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido. Otra manera de expresar este parámetro es que de alrededor del 10 % a alrededor de 10 % a alrededor de 41 % o alrededor de 15 % a alrededor de 36 % de las lisinas CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido. En otra de esas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender de 2 a 20 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido. Otra manera de expresar este parámetro es que de alrededor del 5% a alrededor del 50% de las lisinas CRM₁₉₇ se ligan de manera covalente al sacárido. En algunas de esas formas de realización, CRM₁₉₇ puede comprender alrededor de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 residuos de lisina de un total de 39 ligados de manera covalente al sacárido.

Los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) entre el sacárido y la proteína portadora. En algunas formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,2 a 4,0 (por ejemplo, alrededor de 0,2, alrededor de 0,3, alrededor de 0,4, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9 o alrededor de 4,0). En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,7 a 2,5. En otras formas de realización, la relación de sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) es de 0,8 a 1,5 (por ejemplo, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4 o alrededor de 1,5). En algunas de esas formas de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En una forma de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados de serotipo 8 y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacáridos libres no conjugados de manera covalente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, están presentes en la composición de glucoconjugados. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente al glucoconjugado (es decir, unido de manera no covalente, adsorbido o atrapado en o dentro de aquel).

En algunas formas de realización, los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención comprenden menos de alrededor de 50 % de sacárido libre, menos de alrededor de 45 % de sacárido libre, menos de alrededor de 40 % de sacárido libre, menos de alrededor de 35 % de sacárido libre, menos de alrededor de 30 % de sacárido libre, menos de alrededor de 25 % de sacárido libre, menos de alrededor de 20 % de sacárido libre, menos de alrededor de 15 % de sacárido libre, menos de alrededor de 10 % de sacárido libre o menos de alrededor de 5 % de sacárido libre con respecto a la cantidad total de sacárido. Preferentemente, el glucoconjugado de serotipo 8 comprende menos de 15 % de sacárido libre, con mayor preferencia, menos de 10 % de sacárido libre y, aun con mayor preferencia, menos de 5 % de sacárido libre.

Los glucoconjugados de serotipo 8 también se pueden caracterizar por la distribución del tamaño molecular (K_d). Se pueden usar medios de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) a fin de determinar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se usa en columnas alimentadas por gravedad para determinar la distribución de tamaño molecular de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros en los medios se eluyen con mayor rapidez que las moléculas pequeñas. Se utilizan recolectores de fracciones para recolectar el eluato de la columna. Las fracciones se evalúan colorimétricamente mediante ensayo de sacáridos. A fin de determinar la K_d , las columnas se calibran para determinar la fracción en la que las moléculas se excluyen por completo (V_0), ($K_d=0$), y la fracción que representa la retención máxima (V_i), ($K_d=1$). La fracción en la que se logra un atributo de muestra especificado (V_e) está relacionada con la K_d mediante la expresión $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

En una forma de realización preferida, al menos 40 % de los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma

de realización preferida, al menos 60% de los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, al menos 70% de los glucoconjugados de serotipo 8 de la invención tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

En una forma de realización preferida, 40 % a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 8 tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 50% a 90 % de los glucoconjugados de serotipo 8 tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B. En una forma de realización preferida, 65% a 80% de los glucoconjugados de serotipo 8 tienen una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

2. Composiciones inmunógenas de la presente invención

En una forma de realización, la cantidad de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* de la composición inmunógena puede variar de 1 serotipo (o "v", valencia) a 7 serotipos diferentes (7 v). En una forma de realización, existe 1 serotipo. En una forma de realización, existen 2 serotipos diferentes. En una forma de realización, existen 3 serotipos diferentes. En una forma de realización, existen 4 serotipos diferentes. En una forma de realización, existen 5 serotipos diferentes. En una forma de realización, existen 6 serotipos diferentes. En una forma de realización, existen 7 serotipos diferentes. Los sacáridos capsulares se conjugan con una proteína portadora para formar glucoconjugados como se describió anteriormente en la presente.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado seleccionado del grupo que consiste en un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.2 anterior), un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.3 anterior), un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.5 anterior), un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.6 anterior), un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.7 anterior) y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8 (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.8 anterior).

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, tal como el

glucoconjugado de la sección 1.3.4 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, tal como los descritos en la sección 1.3.2 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, tal como los descritos en la sección 1.3.3 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, tal como los descritos en la sección 1.3.5 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, tal como los descritos en la sección 1.3.6 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A, tal como los descritos en la sección 1.3.7 anterior. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, tal como los descritos en la sección 1.3.8 anterior.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los dos serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 15B y 22F, 15B y 33F, 15B y 12F, 15B y 10A, 15B y 11A, 15B y 8, 22F y 33F, 22F y 12F, 22F y 10A, 22F y 11A, 22F y 8, 33F y 12F, 33F y 10A, 33F y 11A, 33F y 8, 12F y 10A, 12F y 11A, 12F y 8, 10A y 11A, 10A y 8, y 11A y 8.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los tres serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

- 15B, 22F y 33F,
- 15B, 22F y 12F,
- 15B, 22F y 10A,
- 15B, 22F y 11A,
- 15B, 22F y 8,
- 15B, 33F y 12F,
- 15B, 33F y 10A,
- 15B, 33F y 11A,
- 15B, 33F y 8,
- 15B, 12F y 10A,
- 15B, 12F y 11A,

15B, 12F y 8,
 15B, 10A y 11A,
 15B, 10A y 8,
 15B, 11A y 8,
 22F, 33F y 12F,
 22F, 33F y 10A,
 22F, 33F y 11A,
 22F, 33F y 8,
 22F, 12F y 10A,
 22F, 12F y 11A,
 22F, 12F y 8,
 22F, 10A y 11A,
 22F, 10A y 8,
 22F, 11A y 8,
 33F, 12F y 10A,
 33F, 12F y 11A,
 33F, 12F y 8,
 33F, 10A y 11A,
 33F, 10A y 8,
 33F, 11A y 8,
 12F, 10A y 11A,
 12F, 10A y 8,
 12F, 11A y 8, o
 10A, 11A y 8.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los cuatro serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

15B, 22F, 33F y 12F,
 15B, 22F, 33F y 10A,
 15B, 22F, 33F y 11A,
 15B, 22F, 33F y 8,
 15B, 22F, 12F y 10A,
 15B, 22F, 12F y 11A,
 15B, 22F, 12F y 8,
 15B, 22F, 10A y 11A,

15B, 22F, 10A y 8,
 15B, 22F, 11A y 8,
 15B, 33F, 12F y 10A,
 15B, 33F, 12F y 11A,
 15B, 33F, 12F y 8,
 15B, 33F, 10A y 11A,
 15B, 33F, 10A y 8,
 15B, 33F, 11A y 8,
 15B, 12F, 10A y 11A,
 15B, 12F, 10A y 8,
 15B, 12F, 11A y 8,
 15B, 10A, 11A y 8,
 22F, 33F, 12F y 10A,
 22F, 33F, 12F y 11A,
 22F, 33F, 12F y 8,
 22F, 33F, 10A y 11A,
 22F, 33F, 10A y 8,
 22F, 33F, 11A y 8,
 22F, 12F, 10A y 11A,
 22F, 12F, 10A y 8,
 22F, 12F, 11A y 8,
 22F, 10A, 11A y 8,
 33F, 12F, 10A y 11A,
 33F, 12F, 10A y 8,
 33F, 12F, 11A y 8,
 33F, 10A, 11A y 8, o
 12F, 10A, 11A y 8.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los cinco serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

15B, 22F, 33F, 12F y 10A,
 15B, 22F, 33F, 12F y 11A,
 15B, 22F, 33F, 12F y 8,
 15B, 22F, 33F, 10A y 11A,
 15B, 22F, 33F, 10A y 8,

15B, 22F, 33F, 11A y 8,
 15B, 22F, 12F, 10A y 11A,
 15B, 22F, 12F, 10A y 8,
 15B, 22F, 12F, 11A y 8,
 15B, 22F, 10A, 11A y 8,
 15B, 33F, 12F, 10A y 11A,
 15B, 33F, 12F, 10A y 8,
 15B, 33F, 12F, 11A y 8,
 15B, 33F, 10A, 11A y 8,
 15B, 12F, 10A, 11A y 8,
 22F, 33F, 12F, 10A y 11A,
 22F, 33F, 12F, 10A y 8,
 22F, 33F, 12F, 11A y 8,
 22F, 33F, 10A, 11A y 8,
 22F, 12F, 10A, 11A y 8, o
 33F, 12F, 10A, 11A y 8.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los seis serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

15B, 22F, 33F, 12F, 10A y 11A,
 15B, 22F, 33F, 12F, 10A y 8,
 15B, 22F, 33F, 12F, 11A y 8,
 15B, 22F, 33F, 10A, 11A y 8,
 15B, 22F, 12F, 10A, 11A y 8,
 15B, 33F, 12F, 10A, 11A y 8, o
 22F, 33F, 12F, 10A, 11A y 8.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los siete serotipos de *S. pneumoniae* siguientes: 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A y 8.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A y/u 8 de cualquiera de las composiciones inmunógenas definidas en esta sección son como se describen en las secciones 1.3.2 a 1.3.8 anteriores.

Preferentemente, todos los glucoconjugados de las composiciones inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con la proteína portadora.

En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 15B se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 12F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 10A se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 11A se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 8 se conjugan con CRM₁₉₇.

En una forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En otra forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con PD. En otra forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con TT. Aun en otra forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con DT.

En otra forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F, 33F, 15B, 12F, 10A, 11A y/u 8 se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F, 33F, 15B, 12F, 10A, 11A y/u 8 se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F, 33F, 15B, 12F, 10A, 11A y/u 8 se conjugan individualmente con PD.

En otra forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con DT, y los otros glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con TT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con

DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con PD, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con PD, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con TT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con PD. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con DT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con PD.

En otra forma de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas anteriores, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los otros glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con PD. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con DT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con TT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados se conjuga individualmente con PD, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas comprenden de 1 a 7 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 6. En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7.

1. En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior.

2. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además del punto 1 anterior, al menos un glucoconjugado de *S.*

pneumoniae serotipo 22F, tal como los descritos en la sección 1.3.2 anterior.

3. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además de los puntos 1 o 2 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, tal como los descritos en la sección 1.3.3 anterior.

4. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además de los puntos 1, 2 o 3 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, tal como los descritos en la sección 1.3.5 anterior.

5. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además de los puntos 1, 2, 3 o 4 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, tal como los descritos en la sección 1.3.6 anterior.

6. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además de los puntos 1, 2, 3, 4 o 5 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A, tal como los descritos en la sección 1.3.7 anterior.

7. En otra forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende, además de los puntos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, tal como los descritos en la sección 1.3.8 anterior.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende sacáridos de *S. pneumoniae* conjugados de serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

En una forma de realización, los glucoconjugados de la composición inmunógena de la invención consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

Preferentemente, todos los glucoconjugados de la composición inmunógena de la invención (por ejemplo, de cualquiera de los puntos 1 a 7 anteriores) se conjugan individualmente con la proteína portadora.

En una forma de realización de cualquiera de los puntos 1 a 7 anteriores, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los puntos 2 a 7 anteriores, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los puntos 3 a 7 anteriores, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los puntos 4 a 7 anteriores, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los puntos 5 a 7 anteriores,

el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los puntos 6 a 7 anteriores, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A se conjuga con CRM₁₉₇. En una forma de realización del punto 7 anterior, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8 se conjuga con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjugan individualmente con PD. En una forma de realización, los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjugan individualmente con TT. En una forma de realización, los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjugan individualmente con DT.

En una forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con DT, y los otros glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con TT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con PD, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con PD, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con TT, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con PD. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con DT, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con PD.

En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los otros glucoconjugados de *S. pneumoniae* se conjugan individualmente con DT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se

conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con TT. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con CRM₁₉₇, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con PD. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con DT, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con TT, y los otros glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇. En otra forma de realización, al menos uno de los glucoconjugados de la composición inmunógena de los puntos 1 a 7 anteriores se conjuga individualmente con PD, y los glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 6. En una forma de realización, la composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los glucoconjugados se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración en profundidad (véanse, por ejemplo las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2007/0184072 o WO 2008/079653). Una vez que los glucoconjugados individuales se purificaron, se formula la composición inmunógena de la presente invención con estos.

En una forma de realización, la dosificación de la composición inmunógena anterior es como se describe en la sección 5 más adelante.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas anteriores también comprenden antígenos de otros patógenos, en particular, de bacterias y/o virus, tales como los que se describen en la sección 6 más adelante.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas anteriores también comprenden uno o más adyuvantes como se describe en la sección 6 más adelante.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas anteriores se

formulan como se describe en la sección 8 más adelante.

3. Composiciones inmunógenas que se pueden usar en combinación con las composiciones inmunógenas de la presente invención

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas de la invención (tales como cualquiera de la sección 2 anterior) se usan en combinación con una segunda composición inmunógena.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

1. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

2. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además del punto 1 anterior, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

3. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1 o 2 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

4. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2 o 3 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 3 (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

5. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2, 3 o 4 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, tal como los descritos en la sección 1.3.2 anterior.

6. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2, 3, 4 o 5 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, tal como los descritos en la sección 1.3.3 anterior.

Preferentemente, todos los glucoconjugados de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con la proteína portadora.

En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 3 se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjugan con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, los glucoconjugados de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con PD.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjuga con TT.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjuga con DT.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las segundas composiciones inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las segundas composiciones

inmunógenas anteriores se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjugaba con TT, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjugaba con DT, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjugaba con CRM₁₉₇, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjugaba con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden de 7 a 15 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden glucoconjugados de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden glucoconjugados de 10 a 15 serotipos diferentes. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 10. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 12. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 15.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, en donde los 7 conjugados consisten en 7 glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 10, en donde los 10 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados

consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 12, en donde los 12 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇ y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, en donde los 13 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 15, en donde los 15 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la dosificación de la segunda composición inmunógena anterior es como se describe en la sección 5 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores también comprenden antígenos de otros patógenos, en particular, de bacterias y/o virus, tales como los que se describen en la sección 6 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores también comprenden uno o más adyuvantes como se describe en la sección 7 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores se formulan como se describe en la sección 8 más adelante.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas de la invención (tales como cualquiera de la sección 2 anterior) se usan en combinación con PREVNAR® (PREVENAR® en algunos países) (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® (vacuna decavalente) y/o PREVNAR 13® (PREVENAR 13® en algunos países) (vacuna tridecavalente).

4. Kit de la presente invención

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena, como se definió en la sección 2 anterior; y (b) una segunda composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena, como se definió en la sección 2 anterior; y (b) una segunda composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena, como se definió en la sección 2 anterior; y (b) una segunda composición inmunógena como se definió en la sección 3 anterior.

1. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit (parte (b) del kit) comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

2. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además del punto 1 anterior, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

3. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena

comprende, además de los puntos 1 o 2 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

4. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2 o 3 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 3 (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

5. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2, 3 o 4 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, tal como los descritos en la sección 1.3.2 anterior.

6. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena comprende, además de los puntos 1, 2, 3, 4 o 5 anteriores, al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, tal como los descritos en la sección 1.3.3 anterior.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit (parte (b) del kit) comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 22F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1 y 1.3.2 anteriores).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 33F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1 y 1.3.3 anteriores).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C,

19F, 23F, 22F y 33F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3 anteriores).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1 y 1.3.2 anteriores).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1 y 1.3.3 anteriores).

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F (tales como los glucoconjugados de las secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3 anteriores).

Preferentemente, todos los glucoconjugados de la segunda composición inmunógena del kit se conjugan individualmente con la proteína portadora.

En una forma de realización de cualquiera de los kits anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los kits anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los kits anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A se conjugan con CRM₁₉₇. En una forma de realización de cualquiera de los kits anteriores, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 3 se conjugan con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, los glucoconjugados de cualquiera de los kits anteriores se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

En otra forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de los kits anteriores se conjugan individualmente con PD.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C de cualquiera de los kits anteriores se conjuga con TT.

En una forma de realización, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F de cualquiera de los kits anteriores se conjuga con DT.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de los kits anteriores se conjugan

individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.

En una forma de realización, los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de los kits anteriores se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden de 7 a 15 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden glucoconjugados de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 serotipos diferentes. En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores comprenden glucoconjugados de 10 a 15 serotipos diferentes. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 10. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 12. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 15.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, en donde los 7 conjugados consisten en 7 glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 10, en donde los 10 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado

con DT.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 12, en donde los 12 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT, glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇ y glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, en donde los 13 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 15, en donde los 15 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V,

14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una forma de realización, la dosificación de la segunda composición inmunógena anterior es como se describe en la sección 5 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores también comprenden antígenos de otros patógenos, en particular, de bacterias y/o virus, tales como los que se describen en la sección 6 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores también comprenden uno o más adyuvantes como se describe en la sección 7 más adelante.

En una forma de realización, las segundas composiciones inmunógenas anteriores se formulan como se describe en la sección 8 más adelante.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas de la invención (tales como cualquiera de la sección 2 anterior) se usan en combinación con PREVNAR[®] (PREVENAR[®] en algunos países) (vacuna heptavalente), SYNFLORIX[®] (vacuna decavalente) y/o PREVNAR 13[®] (PREVENAR 13[®] en algunos países) (vacuna tridecavalente).

En un aspecto de la presente invención, el kit toma la forma de dos recipientes. Por ende, en una forma de realización de la presente invención, cada una de las composiciones inmunógenas del kit (es decir, la primera composición inmunógena y la segunda composición inmunógena) está comprendida en un recipiente separado.

En una forma de realización, la primera composición inmunógena del kit (parte (a) del kit) está comprendida en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un vial, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y una lapicera descartable. En algunas formas de realización, el recipiente es siliconado.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit (parte (b) del kit) está comprendida en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un vial, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y una lapicera descartable. En algunas formas de realización, el recipiente es siliconado.

En una forma de realización, el recipiente está hecho de vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y/o polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una forma de realización, el recipiente está hecho de vidrio.

En una forma de realización, la primera y segunda composiciones

inmunógenas del kit están comprendidas en una jeringa o una lapicera descartable. En una forma de realización, la primera y segunda composiciones inmunógenas del kit están comprendidas en una jeringa. En algunas formas de realización, las jeringas son siliconadas. En algunas formas de realización, las jeringas siliconadas están hechas de vidrio.

En una forma de realización, la primera y segunda composiciones inmunógenas del kit se mezclan de manera improvisada para la administración simultánea.

En una forma de realización, la primera y segunda composiciones inmunógenas están en forma líquida, preferentemente, contenidas en dos recipientes. En una forma de realización, el primer y el segundo recipiente son cámaras separadas en una jeringa de doble cámara de manera que, cuando se acciona, el líquido en el primer recipiente se introduce en el segundo recipiente. La mezcla resultante luego puede salir de la jeringa. Las dos composiciones inmunógenas se mantienen separadas hasta que estén listas para mezclarse.

En una forma de realización, la primera y/o la segunda composición inmunógena del kit están en forma liofilizada.

En una forma de realización, la primera composición inmunógena del kit está en forma liofilizada, y la segunda composición inmunógena está en forma líquida. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena del kit está en forma liofilizada, y la primera composición inmunógena está en forma líquida. En tales formas de realización, la composición inmunógena liofilizada se puede reconstituir de manera improvisada con la composición inmunógena líquida para la administración simultánea de ambas composiciones inmunógenas.

En tales formas de realización, el kit contiene dos recipientes: un recipiente incluye material líquido para la reconstitución, y el segundo recipiente incluye material liofilizado. En una forma de realización, el segundo recipiente está herméticamente sellado. En una forma de realización, el material líquido se introduce en el segundo recipiente mediante una primera aguja, y así se reconstituye el material liofilizado en una forma líquida. La mezcla resultante luego se retira y se coloca en un recipiente (tal como una jeringa), para la administración a un paciente. En una forma de realización, la etapa de retirada es mediante la primera aguja. En otra forma de realización, la etapa de retirada es mediante una segunda aguja. En una forma de realización, la aguja utilizada para la etapa de retirada es la misma aguja que se usa para la inyección al paciente. En otra forma de realización, la aguja utilizada para la etapa de

retirada es diferente de la aguja utilizada para la inyección al paciente.

En una forma de realización, el segundo recipiente es un vial. En otra forma de realización, el primer y el segundo contenedor son cámaras separadas en una jeringa de doble cámara de manera que, cuando se acciona, el material líquido del primer recipiente se introduce en el segundo recipiente. La mezcla resultante sale de la jeringa en forma líquida. En una forma de realización preferida, el material liofilizado y el material líquido se mantienen separados hasta estar listos para mezclarse.

En una forma de realización, el kit comprende una jeringa previamente cargada y un vial. En una forma de realización, la jeringa comprende una dosis única de la primera composición inmunógena, y el vial comprende una dosis única de la segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la jeringa comprende una dosis única de la segunda composición inmunógena, y el vial comprende una dosis única de la primera composición inmunógena. En otra forma de realización, la jeringa y el vial comprenden dosis múltiples.

5. Dosificación de las composiciones inmunógenas

La cantidad de glucoconjugados en cada dosis se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos considerables en las vacunas habituales. Dicha cantidad varía según el inmunógeno específico que se usa y cómo se presenta.

5.1 Cantidad de glucoconjugado

La cantidad de un glucoconjugado particular en una composición inmunógena se puede calcular en función del total de polisacárido para ese conjugado (conjugado y no conjugado). Por ejemplo, un glucoconjugado con 20 % de polisacárido libre tiene alrededor de 80 µg de polisacárido conjugado y alrededor de 20 µg de polisacárido no conjugado en una dosis de polisacárido de 100 µg. La cantidad de glucoconjugado puede variar según el serotipo neumocócico. La concentración de sacárido se puede determinar mediante el ensayo de ácido urónico.

La "cantidad inmunógena" de los distintos componentes de polisacárido en la composición inmunógena puede diferir, y cada uno puede comprender alrededor de 1 µg, alrededor de 2 µg, alrededor de 3 µg, alrededor de 4 µg, alrededor de 5 µg, alrededor de 6 µg, alrededor de 7 µg, alrededor de 8 µg, alrededor de 9 µg, alrededor de 10 µg, alrededor de 15 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 30 µg, alrededor de 40 µg, alrededor de 50 µg, alrededor de 60 µg, alrededor de 70 µg, alrededor de 80 µg, alrededor de 90 µg o alrededor de 100 µg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

En general, cada dosis comprende 0,1 µg a 100 µg de polisacárido para un serotipo determinado, en particular, 0,5 µg a 20 µg, más en particular, 1,0 µg a 10 µg y, aun más en particular, 2,0 µg a 5,0 µg. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1,0 µg, alrededor de 1,2 µg, alrededor de 1,4 µg, alrededor de 1,6 µg, alrededor de 1,8 µg, alrededor de 2,0 µg, alrededor de 2,2 µg, alrededor de 2,4 µg, alrededor de 2,6 µg, alrededor de 2,8 µg, alrededor de 3,0 µg, alrededor de 3,2 µg, alrededor de 3,4 µg, alrededor de 3,6 µg, alrededor de 3,8 µg, alrededor de 4,0 µg, alrededor de 4,2 µg, alrededor de 4,4 µg, alrededor de 4,6 µg, alrededor de 4,8 µg, alrededor de 5,0 µg, alrededor de 5,2 µg, alrededor de 5,4 µg, alrededor de 5,6 µg, alrededor de 5,8 µg o alrededor de 6,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado particular.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1,1 µg, alrededor de 1,2 µg, alrededor de 1,3 µg, alrededor de 1,4 µg, alrededor de 1,5 µg, alrededor de 1,6 µg, alrededor de 1,7 µg, alrededor de 1,8 µg, alrededor de 1,9 µg, alrededor de 2,0 µg, alrededor de 2,1 µg, alrededor de 2,2 µg, alrededor de 2,3 µg, alrededor de 2,4 µg, alrededor de 2,5 µg, alrededor de 2,6 µg, alrededor de 2,7 µg, alrededor de 2,8 µg, alrededor de 2,9 µg o alrededor de 3,0 µg µg de polisacárido para glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1,1 µg, alrededor de 1,2 µg, alrededor de 1,3 µg, alrededor de 1,4 µg, alrededor de 1,5 µg, alrededor de 1,6 µg, alrededor de 1,7 µg, alrededor de 1,8 µg, alrededor de 1,9 µg, alrededor de 2,0 µg, alrededor de 2,1 µg, alrededor de 2,2 µg, alrededor de 2,3 µg, alrededor de 2,4 µg, alrededor de 2,5 µg, alrededor de 2,6 µg, alrededor de 2,7 µg, alrededor de 2,8 µg, alrededor de 2,9 µg o alrededor de 3,0 µg de polisacárido para glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 2,0 µg, alrededor de 2,2 µg, alrededor de 2,4 µg, alrededor de 2,6 µg, alrededor de 2,8 µg, alrededor de 3,0 µg, alrededor de 3,2 µg, alrededor de 3,4 µg, alrededor de 3,6 µg, alrededor de 3,8 µg, alrededor de 4,0 µg, alrededor de 4,2 µg, alrededor de 4,4 µg, alrededor de 4,6 µg, alrededor de 4,8 µg, alrededor de 5,0, alrededor de 5,2 µg, alrededor de 5,4 µg, alrededor de 5,6 µg, alrededor de 5,8 µg o alrededor de 6,0 µg de polisacárido para glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 6B.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1,5 µg a alrededor de 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F, y alrededor de 3,0 µg a alrededor de 6,0 µg de polisacárido para el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 6B.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 2,0 µg a alrededor de 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F, y alrededor de 4,0 µg a alrededor de 4,8 µg de polisacárido para el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 6B.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 2,2 µg de polisacárido de cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F, y alrededor de 4,4 µg de polisacárido para el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 6B.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1,5 µg a alrededor de 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 2,0 µg a alrededor de 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 2,2 µg de polisacárido de cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F.

5.2 Cantidad de portador

En general, cada dosis de una composición inmunógena de la invención comprende 1 µg a 150 µg de proteína portadora, en particular, 10 µg a 100 µg de proteína portadora, más en particular, 15 µg a 50 µg de proteína portadora y, aun más en particular, 16 µg a 40 µg de proteína portadora. En una forma de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 1 µg, alrededor de 2 µg, alrededor de 3 µg, alrededor de 4 µg, alrededor de 5 µg, alrededor de 6 µg, alrededor de 7 µg, alrededor de 8 µg, alrededor de 9 µg, alrededor de 10 µg, alrededor de 11 µg, alrededor de 12 µg, alrededor de 13 µg, alrededor de 14 µg, alrededor de 15 µg, alrededor de 16 µg, alrededor de 17 µg, alrededor de 18 µg, alrededor de 19 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 21 µg, alrededor de 22 µg,

alrededor de 23 µg, alrededor de 24 µg, alrededor de 25 µg, alrededor de 26 µg, alrededor de 27 µg, alrededor de 28 µg, alrededor de 29 µg, alrededor de 30 µg, alrededor de 31 µg, alrededor de 32 µg, alrededor de 33 µg, alrededor de 34 µg, alrededor de 35 µg, alrededor de 36 µg, alrededor de 37 µg, alrededor de 38 µg, alrededor de 39 µg, alrededor de 40 µg, alrededor de 41 µg, alrededor de 42 µg, alrededor de 43 µg, alrededor de 44 µg, alrededor de 45 µg, alrededor de 46 µg, alrededor de 47 µg, alrededor de 48 µg, alrededor de 49 µg, alrededor de 50 µg, alrededor de 51 µg, alrededor de 52 µg, alrededor de 53 µg, alrededor de 54 µg, alrededor de 55 µg, alrededor de 56 µg, alrededor de 57 µg, alrededor de 58 µg, alrededor de 59 µg, alrededor de 60 µg, alrededor de 61 µg, alrededor de 62 µg, alrededor de 63 µg, alrededor de 64 µg, alrededor de 65 µg, alrededor de 66 µg, alrededor de 67 µg, alrededor de 68 µg, alrededor de 69 µg, alrededor de 70 µg, alrededor de 71 µg, alrededor de 72 µg, alrededor de 73 µg, alrededor de 74 µg o alrededor de 75 µg de proteína portadora. En una forma de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En una forma de realización, cada dosis comprende alrededor de 10 µg, alrededor de 11 µg, alrededor de 12 µg, alrededor de 13 µg, alrededor de 14 µg, alrededor de 15 µg, alrededor de 16 µg, alrededor de 17 µg, alrededor de 18 µg, alrededor de 19 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 21 µg, alrededor de 22 µg, alrededor de 23 µg, alrededor de 24 µg, alrededor de 25 µg, alrededor de 26 µg, alrededor de 27 µg, alrededor de 28 µg, alrededor de 29 µg o alrededor de 30 µg de proteína portadora. En una forma de realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

6. Antígenos adicionales

Las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden glucoconjugados de antígenos de sacárido de *S. pneumoniae* conjugados. También pueden incluir al menos un antígeno de otros patógenos, en particular, de bacterias y/o virus.

En una forma de realización, la composición inmunógena descrita en la presente también comprende al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un toxoide diftérico (D), un toxoide tetánico (T), un antígeno pertúsico (P), un antígeno pertúsico acelular (Pa), un antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBV) (HBsAg), un antígeno del virus de la hepatitis A (HAV), un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugado y una vacuna contra el poliovirus inactivado (IPV).

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la

presente comprenden D-T-Pa. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden D-T-Pa-Hib, D-T-Pa-IPV o D-T-Pa-HBsAg. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden D-T-Pa-HBsAg-IPV o D-T-Pa-HBsAg-Hib. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib.

Antígenos pertúsicos: *Bordetella pertussis* causa tos ferina. Los antígenos pertúsicos en las vacunas son celulares (de células completas, en forma de células de *B. pertussis* inactivadas) o acelulares. La preparación de antígenos pertúsicos celulares está documentada (por ejemplo, se pueden obtener mediante inactivación por calor de cultivo de fase I de *B. pertussis*). Preferentemente, sin embargo, la invención usa antígenos acelulares. Cuando se usan antígenos acelulares, se prefiere usar uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes antígenos: (1) toxina pertúsica desintoxicada (toxoides pertúsico o PT); (2) hemaglutinina filamentosa (FHA); (3) pertactina (también conocida como la proteína de membrana externa de 69 kiloDalton). FHA y pertactina se pueden tratar con formaldehído antes de usarse de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, PT se desintoxica mediante el tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído. Preferentemente, los antígenos pertúsicos acelulares se adsorben en uno o más adyuvantes de sal de aluminio. Como alternativa, se pueden agregar en estado no adsorbido. Cuando se agrega pertactina, preferentemente ya se adsorbió en un adyuvante de hidróxido de aluminio. PT y FHA se pueden adsorber en un adyuvante de hidróxido de aluminio o un fosfato de aluminio. Se prefiere la adsorción de PT, FHA y pertactina en hidróxido de aluminio.

Vacuna contra poliovirus inactivado: El poliovirus causa poliomiелitis. En lugar de usar una vacuna contra el poliovirus oral, en formas de realización preferidas de la invención, se usa IPV. Antes de la administración a pacientes, los poliovirus se deben inactivar, y esto se puede lograr mediante el tratamiento con formaldehído. La poliomiелitis puede ser causada por uno de tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y provocan síntomas idénticos, pero son antigénicamente diferentes, y la infección por un tipo no protege contra la infección por otros. Por ende, se prefiere usar tres antígenos de poliovirus en la invención: poliovirus tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1) y poliovirus tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett). Preferentemente, los virus crecen, se purifican e inactivan en forma individual, y luego se combinan para obtener un volumen de mezcla trivalente para usar con la invención.

Toxoide diftérico: *Corynebacterium diphtheriae* causa difteria. La toxina diftérica se puede tratar (por ejemplo, usando formalina o formaldehído) para eliminar la toxicidad y a la vez retener la capacidad para inducir anticuerpos contra toxinas específicos después de la inyección. Estos toxoides diftéricos se usan en vacunas contra la difteria. Los toxoides diftéricos preferidos son aquellos que se preparan mediante el tratamiento con formaldehído. El toxoide diftérico se puede obtener cultivando *C. diphtheriae* en medio de crecimiento, y luego mediante tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material de toxoide luego se puede tratar mediante un proceso que comprende filtración estéril y/o diálisis. Preferentemente, el toxoide diftérico se adsorbe en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Toxoide tetánico: *Clostridium tetani* causa el tétanos. La toxina tetánica se puede tratar para obtener un toxoide protector. Los toxoides se usan en vacunas contra el tétanos. Los toxoides tetánicos preferidos son aquellos que se preparan mediante el tratamiento con formaldehído. El toxoide tetánico se puede obtener cultivando *C. tetani* en medio de crecimiento, y luego mediante el tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material luego se puede tratar mediante un proceso que comprende filtración estéril y/o diálisis.

Antígenos del virus de la hepatitis A: El virus de la hepatitis A (HAV) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. Un componente de HAV preferido es a base de virus inactivado, y la inactivación se puede lograr mediante tratamiento con formalina.

El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. El componente principal de la cápside es una proteína conocida como antígeno superficial de HBV o, más comúnmente, HBsAg, que en general es un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de ~24 kDa. Todas las vacunas contra la hepatitis B existentes contienen HBsAg, y cuando este antígeno se administra en una vacuna normal, estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen contra la infección por HBV.

Para la fabricación de vacunas, HBsAg se hizo de dos maneras: purificación del antígeno en forma particulada del plasma de portadores de la hepatitis B crónica o expresión de la proteína mediante métodos de ADN recombinante (por ejemplo, expresión recombinante en células de levadura). A diferencia de HBsAg nativo (es decir, como en el producto purificado en plasma), HBsAg expresado en levadura, en general, es no glucosilado, y esta es la forma de máxima preferencia de HBsAg para usar con la invención.

Antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugados: *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) causa meningitis bacteriana. En general, las vacunas contra Hib son a base de antígeno de sacárido capsular, cuya preparación está documentada. El sacárido de Hib se puede conjugar con una proteína portadora a fin de mejorar su inmunogenicidad, en especial, en niños. Las proteínas portadoras típicas son toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM₁₉₇, proteína D de *H.influenzae* y un complejo de proteínas de membrana externa del meningococo serogrupo B. La porción sacárido del conjugado puede comprender fosfato de polirribosilribitol (PRP) de longitud completa según se prepara de bacterias de Hib y/o fragmentos de PRP de longitud completa. Los conjugados de Hib pueden o no ser adsorbidos en un adyuvante de sal de aluminio.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente también incluyen un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY) conjugado y/o un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC) conjugado.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente también incluyen un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A (MenA) conjugado, un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W135 (MenW135) conjugado, un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY) conjugado y/o un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC) conjugado.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente también incluyen un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W135 (MenW135) conjugado, un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY) conjugado y/o un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC) conjugado.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde cualquiera de los antígenos adicionales anteriores es parte de la primera composición inmunógena (parte (a) del kit).

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde cualquiera de los antígenos adicionales anteriores es parte de la segunda composición inmunógena (parte (b) del kit).

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde cualquiera de los antígenos adicionales anteriores es parte de la primera composición inmunógena (parte (a) del kit), y cualquiera de los antígenos adicionales anteriores es parte de la segunda composición inmunógena (parte (b) del kit).

7. Adyuvantes

En algunas formas de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente también pueden comprender al menos 1, 2 o 3 adyuvantes. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o una mezcla que mejora la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Los antígenos pueden actuar principalmente como un sistema de administración, en particular, como un modulador inmunitario, o tener características fuertes de ambos. Los adyuvantes adecuados incluyen aquellos adecuados para usar en mamíferos, incluso seres humanos.

Los ejemplos de adyuvantes como sistemas de administración adecuados conocidos que se pueden usar en seres humanos incluyen, entre otros, alumbre (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio), fosfato de calcio, liposomas, emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 (4,3 % p/v de escualeno, 0,5 % p/v de polisorbato 80 (TWEEN® 80), 0,5 % p/v de trioleato de sorbitán (Span 85)), emulsiones de agua en aceite, tales como MONTANIDE™, y micropartículas o nanopartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG).

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden sales de aluminio (alumbre) como adyuvante (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio). En una forma de realización preferida, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio como adyuvante. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml o de 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden alrededor de 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio.

Los ejemplos de adyuvantes como moduladores inmunitarios adecuados conocidos que se pueden usar en seres humanos incluyen, entre otros, extractos de saponina de la corteza del árbol Aquilla (QS21, QUILA®), agonistas de TLR4, tales como MPL (monofosforil lípido A), 3DMPL (MPL 3-O-desacilado) o GLA-AQ, mutantes de LT/CT, citocinas, tales como las diversas interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-12) o GM-CSF, y similares.

Los ejemplos de adyuvantes como moduladores inmunitarios adecuados conocidos con características moduladoras inmunitarias y de administración que se pueden usar en seres humanos incluyen, entre otros, ISCOMS (véanse, por ejemplo, Sjölander et al. (1998) J. Leukocyte Biol. 64:713; WO 90/03184, WO 96/11711, WO

00/48630, WO 98/36772, WO 00/41720, WO 2006/134423 y WO 2007/026190) o GLA-EM, que es una combinación de un agonista de TLR4 y una emulsión de aceite en agua.

Para aplicaciones veterinarias que incluyen, entre otros, experimentación en animales, se puede usar adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), EMULSIGEN®, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE) y RIBI™, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de 2 % de escualeno/TWEEN® 80.

Otros ejemplos de adyuvantes para mejorar la eficacia de las vacunas neumocócicas como se describe en la presente incluyen, entre otras: (1) se pueden usar formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como péptidos de muramilo (véanse más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como (a) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de TWEEN®, 80, 5 % de polímero en bloque L121 Pluronic y thr-MDP, microfluidizada en una emulsión submicrométrica o agitado por vórtice para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño, y (b) sistema adyuvante de RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de TWEEN® 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana, tales como monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente, MPL + CWS (DETOX™); (2) adyuvantes de saponina, tales como QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), ABISCO® (Isconova, Suecia) o ISCOMATRIX® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), o partículas generadas de estos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), que pueden estar libres de detergente adicional (por ejemplo, WO 00/07621); (3) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (por ejemplo, WO 99/44636)), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) (véanse, por ejemplo, GB-2220221, EP0689454), opcionalmente en ausencia considerable de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos

(véase, por ejemplo, WO 00/56358); (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de agua en aceite (véanse, por ejemplo, EP0835318, EP0735898, EP0761231); (7) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno (véase, por ejemplo, WO 99/52549); (8) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (por ejemplo, WO 01/21207) o un tensioactivo de alquil éter o éster de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como un octoxinol (por ejemplo, WO 01/21152); (9) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (por ejemplo, WO 00/62800); (10) un inmunoestimulante y una partícula de sal de metal (véase, por ejemplo, WO 00/23105); (11) una saponina y una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, WO 99/11241); (12) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un esteroide) (por ejemplo, WO 98/57659); (13) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden un oligonucleótido CpG como adyuvante. Un oligonucleótido CpG, como se usa en la presente, se refiere a un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) inmunoestimulador y, en consecuencia, estos términos se usan de manera indistinta a menos que se indique lo contrario. Los oligodesoxinucleótidos CpG inmunoestimuladores contienen uno o más motivos CpG inmunoestimuladores que son dinucleótidos citosina-guanina no metilados, opcionalmente dentro de determinados contextos de base preferidos. En general, el estado de metilación del motivo CpG inmunoestimulador se refiere al residuo de citosina en el dinucleótido. Un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es un oligonucleótido que contiene una citosina no metilada 5' ligada mediante un enlace de fosfato a una guanina 3', y que activa el sistema inmunitario a través de la fijación al receptor de tipo Toll 9 (TLR-9). En otra forma de realización, el oligonucleótido inmunoestimulador puede contener uno o más dinucleótidos CpG metilados, que activan el sistema inmunitario a través de TLR9, pero no con la misma potencia que si los motivos CpG fueran no metilados. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden comprender uno o más palíndromos que, a su vez, pueden comprender el dinucleótido CpG. Los

oligonucleótidos CpG se describieron en varias patentes publicadas, solicitudes de patente publicadas y otras publicaciones, que incluyen las patentes estadounidenses N.^{os} 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden cualquiera de los oligonucleótidos CpG descritos en la página 3, línea 22, a la página 12, línea 36 de WO 2010/125480.

Se identificaron distintas clases de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores. Estas se denominan clases A, B, C y P, y se describen con más detalle en la página 3, línea 22, a la página 12, línea 36, de WO 2010/125480. Los métodos de la invención abarcan el uso de estas clases diferentes de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden un oligonucleótido CpG de clase A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG de "clase A" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácidos nucleicos: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1). Algunos ejemplos no limitativos de oligonucleótidos de clase A incluyen: 5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 2); en donde "*" se refiere a un enlace de fosforotioato, y "_" se refiere a un enlace de fosfodiéster.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden un oligonucleótido CpG de clase B. En una forma de realización, el oligonucleótido CpG para usar en la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase B representado al menos por la Fórmula:

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3', en donde X₁, X₂, X₃ y X₄ son nucleótidos. En una forma de realización, X₂ es adenina, guanina o timina. En otra forma de realización, X₃ es citosina, adenina o timina.

Las secuencias de oligonucleótidos CpG de clase B de la invención son aquellas que se describieron ampliamente con anterioridad, al igual que en WO 96/02555, WO 98/18810 y las patentes estadounidenses N.^{os} 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116 y 6.339.068. Los ejemplos de secuencias incluyen, entre otros, aquellas que se describen en estas últimas solicitudes y patentes.

En una forma de realización, el oligonucleótido CpG de "clase B" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 3), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 4), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 5), o
 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 6), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 7).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces de fosforotioato. En otra forma de realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces puede ser de fosfodiéster, preferentemente, de "C" y "G" del motivo CpG que forma un oligonucleótido CpG semiflexible. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno se pueden sustituir con T 5'; los ejemplos de sustituciones de halógeno incluyen, entre otros, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

Algunos ejemplos no limitativos de oligonucleótidos de clase B incluyen:

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 8), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 9), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 10),
 o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 11),
 o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO: 12).

en donde "*" se refiere a un enlace de fosforotioato.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden un oligonucleótido CpG de clase C. En una forma de realización, los oligonucleótidos CpG de "clase C" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 13), o
 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 14), o
 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 15), o
 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 16), o
 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 17), o
 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 18), o
 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 19), o
 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 20), o
 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 21), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 22), o

5' TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCGG 3' (SEQ ID NO: 23), o
 5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (SEQ ID NO: 24), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO: 25).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces de fosforotioato. En otra forma de realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces puede ser de fosfodiéster, preferentemente, de “C” y “G” del motivo CpG que forma un oligonucleótido CpG semiflexible.

Algunos ejemplos no limitativos de oligonucleótidos de clase C incluyen:

5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 26),
 o

5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 27), o

5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 28), o

5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 29), o

5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 30), o

5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 31), o

5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 32), o

5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 33), o

5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 34),
 o

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 35), o

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 36), o

5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 37), o

5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3' (SEQ ID NO: 38)

en donde “*” se refiere a un enlace de fosforotioato, y “_” se refiere a un enlace de fosfodiéster.

En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno se pueden sustituir con T 5'; los ejemplos de sustituciones de halógeno incluyen, entre otros, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones inmunógenas como se describen en la presente comprenden un oligonucleótido CpG de clase P. En una forma de realización, el oligonucleótido CpG para usar en la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase P que contiene un dominio de activación de TLR 5' y al menos dos regiones palindrómicas, en donde una región

palindrómica es una región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y está conectada a una región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud, ya sea en forma directa o mediante un espaciador, en donde el oligonucleótido incluye al menos un dinucleótido YpR. En una forma de realización, dicho oligonucleótido no es T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO: 27). En una forma de realización, el oligonucleótido CpG de clase P incluye al menos un dinucleótido CpG no metilado. En otra forma de realización, el dominio de activación de TLR es TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT o TTTT. Aun en otra forma de realización, el dominio de activación de TLR está dentro de la región palindrómica 5'. En otra forma de realización, el dominio de activación de TLR se encuentra inmediatamente en posición 5' con respecto a la región palindrómica 5'.

En una forma de realización, los oligonucleótidos CpG de "clase P" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácidos nucleicos: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 39).

En dichas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces de fosforotioato. En otra forma de realización, uno o más de los enlaces puede ser de fosfodiéster, preferentemente, de "C" y "G" del motivo CpG que forma un oligonucleótido CpG semiflexible. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno se pueden sustituir con T 5'; los ejemplos de sustituciones de halógeno incluyen, entre otros, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

Un ejemplo no limitativo de oligonucleótidos de clase P es:

5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 40)

en donde "*" se refiere a un enlace de fosforotioato, y "_" se refiere a un enlace de fosfodiéster.

En una forma de realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace de fosforotioato. En otra forma de realización, todos los enlaces internucleótidos del oligonucleótido son enlaces de fosforotioato. En otra forma de realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace similar a fosfodiéster. En otra forma de realización, el enlace similar a fosfodiéster es un enlace de fosfodiéster. En otra forma de realización, un grupo lipófilo se conjuga con el oligonucleótido. En una forma de realización, el grupo lipófilo es colesterol.

En una forma de realización, todos los enlaces internucleótidos de los oligonucleótidos CpG descritos en la presente son enlaces de fosfodiéster

(oligonucleótidos “flexibles”, como se describe en WO 2007/026190). En otra forma de realización, los oligonucleótidos CpG de la invención se vuelven resistentes a la degradación (por ejemplo, se estabilizan). Un “oligonucleótido estabilizado” se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exo- o endo-nucleasa). La estabilización del ácido nucleico se puede lograr mediante modificaciones de la estructura principal. Los oligonucleótidos que tienen enlaces de fosforotioato proporcionan máxima actividad y protegen el oligonucleótido de la degradación mediante exo- y endo-nucleasas intracelulares.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener una estructura principal quimérica, que tiene combinaciones de enlaces de fosfodiéster y fosforotioato. A los fines de la presente invención, una estructura principal quimérica se refiere a una estructura principal parcialmente estabilizada, en donde al menos un enlace internucleótido es de fosfodiéster o similar a fosfodiéster, y en donde al menos un enlace internucleótido diferente es un enlace internucleótido estabilizado, en donde al menos un enlace de fosfodiéster o similar a fosfodiéster y al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace de fosfodiéster se ubica preferentemente dentro del motivo CpG, tales moléculas se denominan “semiflexibles” como se describe en WO 2007/026190.

Otros oligonucleótidos modificados incluyen combinaciones de enlaces de fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y/o p-etoxi.

Los ODN combinados de estructura principal modificada se pueden sintetizar como se describe en WO 2007/026190.

El tamaño del oligonucleótido CpG (es decir, la cantidad de residuos de nucleótido a lo largo del oligonucleótido) también puede contribuir a la actividad estimuladora del oligonucleótido. A fin de facilitar la absorción en las células, el oligonucleótido CpG de la invención tiene, preferentemente, una longitud mínima de 6 residuos de nucleótido. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño mayor de 6 nucleótidos (incluso de muchos kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria si suficientes motivos inmunoestimuladores están presentes, porque los oligonucleótidos más grandes se degradan dentro de las células. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos CpG tienen de 6 a 100 nucleótidos de longitud, preferentemente, de 8 a 30 nucleótidos de longitud. En formas de realización importantes, los ácidos nucleicos y oligonucleótidos de la invención no son plásmidos o vectores de expresión.

En una forma de realización, el oligonucleótido CpG descrito en la presente

comprende sustituciones o modificaciones, por ejemplo, en las bases y/o los azúcares como se describen en los párrafos 134 a 147 de WO 2007/026190.

En una forma de realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención se modifica químicamente. Los ejemplos de modificaciones químicas son conocidos por la persona del oficio de nivel medio y se describen, por ejemplo, en Uhlmann et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, EE. UU. 1993; Crooke et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; y Hunziker et al. (1995) Mod. Synth. Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en donde cada modificación se ubica en un puente internucleósido de fosfodiéster particular y/o en una unidad de β -D-ribosa particular y/o en una posición de base de nucleósido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que se compone de ADN o ARN natural.

En algunas formas de realización de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG pueden mezclarse simplemente con portadores inmunógenos de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, WO 03/024480).

En una forma de realización particular de la presente invención, cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden de 2 μ g a 100 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente, de 0,1 mg a 50 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente, de 0,2 mg a 10 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente, de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente, de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, aun con mayor preferencia, de 0,5 a 2 mg de oligonucleótido CpG, aun con mayor preferencia, de 0,75 a 1,5 mg de oligonucleótido CpG. En una forma de realización preferida, cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprende alrededor de 1 mg de oligonucleótido CpG.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención (tal como la que se define en la sección 2 anterior) comprende un adyuvante como se definió anteriormente, preferentemente, una sal de aluminio (alumbre) (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio). En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio como adyuvante.

En una forma de realización, la composición inmunógena que se puede usar en combinación con la composición inmunógena de la invención (tal como la que se define en la sección 3 anterior) comprende un adyuvante como se definió

anteriormente, preferentemente, una sal de aluminio (alumbre) (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio). En una forma de realización, las composiciones inmunógenas comprenden fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio como adyuvante.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde solo la primera composición inmunógena (parte (a) del kit) comprende un adyuvante como se definió anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde solo la segunda composición inmunógena (parte (b) del kit) comprende un adyuvante como se definió anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) comprenden un adyuvante como se definió anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) comprenden un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) comprenden fosfato de aluminio como adyuvante.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) comprenden hidróxido de aluminio como adyuvante.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) comprenden sulfato de aluminio como adyuvante.

8. Formulación

Las composiciones inmunógenas descritas en la presente se pueden formular en forma líquida (es decir, soluciones o suspensiones) o en forma liofilizada. Las formulaciones líquidas se pueden administrar de manera ventajosa directamente de su forma envasada y, por ende, son ideales para la inyección sin necesidad de reconstitución en medio acuoso, como se requiere para las composiciones liofilizadas.

La formulación de la composición inmunógena descrita en la presente se puede lograr usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, los conjugados neumocócicos se pueden formular con un vehículo fisiológicamente

aceptable para preparar la composición. Los ejemplos de tales vehículos incluyen, entre otros, agua, solución salina amortiguada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

La presente descripción proporciona una composición inmunógena que comprende cualquier combinación de glucoconjugados descritos en la presente y un excipiente, un portador o un diluyente aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

En una forma de realización, la composición inmunógena descrita en la presente está en forma líquida, preferentemente, en forma líquida acuosa.

Las composiciones inmunógenas de la descripción pueden comprender uno o más de los siguientes: un amortiguador, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector, tal como un azúcar, y un antioxidante, tal como un secuestrante de radicales libres o un agente quelante, o cualquier combinación de estos.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden un amortiguador. En una forma de realización, el amortiguador tiene una pKa de alrededor de 3,5 a alrededor de 7,5. En algunas formas de realización, el amortiguador es fosfato, succinato, histidina o citrato. En algunas formas de realización, el amortiguador es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM. En una forma de realización particular, la concentración final del amortiguador de succinato es de alrededor de 5 mM.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden una sal. En algunas formas de realización, la sal se selecciona de los grupos que consisten en cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y una combinación de estos. En una forma de realización particular, la sal es cloruro de sodio. En una forma de realización particular, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden cloruro de sodio a 150 mM.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente comprenden un tensioactivo. En una forma de realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (TWEENTM20), polisorbato 40 (TWEENTM40), polisorbato 60 (TWEENTM60), polisorbato 65 (TWEENTM65), polisorbato 80 (TWEENTM80), polisorbato 85 (TWEENTM85), TRITONTM N-101, TRITONTM X-100, octoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipéptido de trietanolamina, hidroxiestearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H 15), polioxietileno-35-ricinoleato (CREMOPHOR[®] EL), lecitina de soja y un poloxámero. En una forma de realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En algunas de

tales formas de realización, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,0001 % a 10 % de polisorbato 80 en peso (p/p). En algunas de tales formas de realización, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,001% a 1% de polisorbato 80 en peso (p/p). En algunas de tales formas de realización, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,01% a 1% de polisorbato 80 en peso (p/p). En otras formas de realización, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 % de polisorbato 80 (p/p). En otra forma de realización, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es de 1 % de polisorbato 80 (p/p).

En algunas formas de realización, la composición inmunógena descrita en la presente tiene un pH de 5,5 a 7,5, con mayor preferencia, un pH de 5,6 a 7,0, aun con mayor preferencia, un pH de 5,8 a 6,0.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un recipiente cargado con cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en la presente. En una forma de realización, el recipiente se selecciona del grupo que consiste en un vial, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un frasco, una ampolla, un cartucho y una lapicera descartable. En algunas formas de realización, el recipiente es siliconado.

En una forma de realización, el recipiente de la presente invención está hecho de vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y/o polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una forma de realización, el recipiente de la presente invención está hecho de vidrio.

En una forma de realización, la presente invención proporciona una jeringa cargada con cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en la presente. En algunas formas de realización, la jeringa es siliconada y/o está hecha de vidrio.

Una dosis típica de la composición inmunógena descrita en la presente para inyección tiene un volumen de 0,1 ml a 2 ml, con mayor preferencia, 0,2 ml a 1 ml, aun con mayor preferencia, un volumen de alrededor de 0,5 ml.

Por lo tanto, el recipiente o la jeringa como se definieron anteriormente se cargan con un volumen de 0,1 ml a 2 ml, con mayor preferencia, 0,2 ml a 1 ml, aun con mayor preferencia, un volumen de alrededor de 0,5 ml de cualquiera de las composiciones inmunógenas definidas en la presente.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención (tal como la que se definió en la sección 2 anterior) se formula como se describió

anteriormente.

En una forma de realización, la composición inmunógena que se puede usar en combinación con la composición inmunógena de la invención (tal como la que se definió en la sección 3 anterior) se formula como se describió anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) se formulan como se describió anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) se formulan en forma líquida.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde ambas composiciones inmunógenas (parte (a) y (b) del kit) se formulan en forma liofilizada.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde la primera composición inmunógena (parte (a) del kit) está en forma líquida, y la segunda composición inmunógena (parte (b) del kit) está en forma liofilizada.

Un aspecto de la invención proporciona un kit como se definió en la sección 4 anterior, en donde la primera composición inmunógena (parte (a) del kit) está en forma liofilizada, y la segunda composición inmunógena (parte (b) del kit) está en forma líquida.

9. Usos de las composiciones inmunógenas y kits de la invención

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar como un medicamento.

Las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente se pueden usar en distintos métodos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto. En particular, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente se pueden usar para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección por *S. pneumoniae* en un sujeto.

Por ende, en un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociadas a *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena descrita en la presente.

En algunas de esas formas de realización, la infección, enfermedad o afección

se seleccionan del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección del tejido blando y absceso cerebral.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria a *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena de la invención.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar como una vacuna. En tales formas de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente se pueden usar para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena de la invención. En algunas de esas formas de realización, la infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección del tejido blando y absceso cerebral. En un aspecto, el sujeto que se debe vacunar es un mamífero, tal como un ser humano, un gato, una oveja, un cerdo, un caballo, un bovino o un perro.

En un aspecto, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar en un método para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociadas a *S. pneumoniae* en un sujeto. En algunas de esas formas de realización, la infección, enfermedad o afección se seleccionan del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección del tejido blando y absceso cerebral.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar como una vacuna. En tales formas de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente se pueden usar para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto. Por ende, en un aspecto, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar en un método para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto.

En algunas de esas formas de realización, la infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección del tejido blando y absceso cerebral. En un aspecto, el sujeto que se debe vacunar es un mamífero, tal como un ser humano, un gato, una oveja, un cerdo, un caballo, un bovino o un perro.

Las composiciones inmunógenas y los kits de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección neumocócica, mediante la administración de composiciones inmunógenas mediante una vía sistémica o mucosa. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente se administran por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente se administran mediante inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, puede inducir la formación de anticuerpos capaces de fijarse a *S. pneumoniae* serotipos 15B, 15A y/o 15C según se mide mediante ensayo ELISA estándar. En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, puede inducir la formación de anticuerpos capaces de fijarse a *S. pneumoniae* serotipo 15B y 15C según se mide mediante ensayo ELISA estándar.

En el método de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), los anticuerpos del suero de sujetos vacunados se incuban con polisacáridos que se adsorbieron en un soporte sólido. Los anticuerpos unidos se detectan usando anticuerpos de detección secundarios conjugados con enzimas.

En una forma de realización, el ensayo ELISA estándar es el ensayo ELISA estandarizado (OMS) como define la OMS en el 'Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn PS ELISA).' (accesible en <http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>; último acceso el 31 de marzo de

2014).

ELISA mide anticuerpos IgG anti-polisacárido capsular (PS) de *S. pneumoniae* de tipo específico presentes en suero humano. Cuando las diluciones de suero humano se agregan a placas de microtitulación recubiertas con PS capsular de tipo específico, los anticuerpos específicos contra ese PS capsular se fijan a las placas de microtitulación. Los anticuerpos unidos a las placas se detectan usando un anticuerpo etiquetado con fosfatasa alcalina anti-IgG humana de cabra, y luego un sustrato de fosfato de p-nitrofenilo. La densidad óptica del producto final de color es proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-PS capsular presente en el suero.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de fijarse al polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 15B en una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de fijarse al polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 15C en una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de fijarse al polisacárido de *S. pneumoniae* serotipos 15B y 15C en una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml según se determina mediante ensayo ELISA.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, puede inducir la formación de anticuerpos capaces de inactivar *S. pneumoniae* serotipo 15B en un ensayo de opsonofagocitosis como se describe en la presente (tal como el ensayo OPA del Ejemplo 12).

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo

15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se evalúa en un ensayo OPA como se describe en la presente (tal como el ensayo OPA del Ejemplo 12), tiene un título OPA mayor que el título OPA obtenido con un polisacárido capsular de *S. pneumonia* serotipo 15B nativo no conjugado.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, puede inducir la formación de anticuerpos capaces de inactivar *S. pneumonia* serotipo 15C en un ensayo de opsonofagocitosis como se describe en la presente (tal como el ensayo OPA del Ejemplo 12). En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se evalúa en un ensayo OPA como se describe en la presente (tal como el ensayo OPA del Ejemplo 12), tiene un título OPA mayor que el título OPA obtenido con un polisacárido capsular de *S. pneumonia* serotipo 15B nativo no conjugado.

El ensayo opsonofagocítico neumocócico (OPA), que mide la inactivación de células de *S. pneumoniae* mediante células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpo funcional y complemento, se considera un sustituto importante para evaluar la eficacia de las vacunas neumocócicas.

El ensayo opsonofagocítico (OPA) se puede llevar a cabo incubando una mezcla de células de *Streptococcus pneumoniae* junto con un suero humano inactivado por calor que se debe evaluar, células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y una fuente de complemento exógeno (por ejemplo, complemento de conejo bebé). La opsonofagocitosis se desarrolla durante la incubación, y las células bacterianas que están recubiertas con el anticuerpo y el complemento se inactivan durante la opsonofagocitosis. Las unidades formadoras de colonias (cfu) de las bacterias sobrevivientes que escapan de la opsonofagocitosis se determinan colocando la mezcla del ensayo en una placa. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El título OPA se interpola de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Un título del criterio de valoración de 1:8 o más se considera un resultado positivo en estos OPA de inactivación.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente

descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir un título de al menos 1:8 con respecto a *S. pneumoniae* serotipo 15B en al menos 50 % de los sujetos según se determina mediante ensayo de inactivación opsonofagocítica (OPA). En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir un título de al menos 1:8 con respecto a *S. pneumoniae* serotipo 15B en al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos 93 % de los sujetos según se determina mediante ensayo de inactivación opsonofagocítica (OPA).

En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir un título de al menos 1:8 con respecto a *S. pneumoniae* serotipo 15C en al menos 50 % de los sujetos según se determina mediante ensayo de inactivación opsonofagocítica (OPA). En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) puede producir un título de al menos 1:8 con respecto a *S. pneumoniae* serotipo 15C en al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos 95 % de los sujetos según se determina mediante ensayo de inactivación opsonofagocítica (OPA).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir una infección por *S. pneumoniae*, una enfermedad o una afección asociadas a *S. pneumoniae* serotipo 15A, 15B y/o 15C en un sujeto, en donde el método comprende la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción, que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior). En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de fijarse a *S. pneumoniae* serotipos 15B, 15A y/o 15C. En una forma de realización, la composición inmunógena de la presente descripción que comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto,

induce la formación de anticuerpos capaces de inactivar *S. pneumoniae* serotipos 15B, 15C y/o 15A en un ensayo de opsonofagocitosis como se describe en la presente (tal como el ensayo OPA del Ejemplo 12).

Una forma de realización de la descripción proporciona un método para proteger a un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae* serotipo 15C, o un método para prevenir la infección por *S. pneumoniae* serotipo 15C, o un método para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *S. pneumoniae* serotipo 15C, en donde los métodos comprenden administrar a un sujeto una cantidad inmunógena de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción, que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior). Una forma de realización de la descripción proporciona un método para tratar o prevenir una infección por *S. pneumoniae*, una enfermedad o una afección asociadas a *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B) en un sujeto, en donde el método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción, que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior). Otra forma de realización proporciona un método para tratar o prevenir una infección por *S. pneumoniae*, una enfermedad o una afección asociadas a *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B) en un sujeto, en donde el método comprende generar una preparación de anticuerpo policlonal o monoclonal de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción, que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), y usando dicha preparación de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva al sujeto.

En una forma de realización, la descripción se refiere al uso de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae*, y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae*, y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *S. pneumoniae*, y/o proteger a un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B

y/o 15C, con mayor preferencia, 15B) y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B), y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B).

En una forma de realización, la descripción se refiere al uso de cualquiera de las composiciones inmunógenas de la presente descripción que comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) para proteger a un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae*, y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae*, y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *S. pneumoniae*, y/o proteger a un sujeto contra una infección por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B) y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B), y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado a una infección causada por *S. pneumoniae* serotipos 15A, 15B y/o 15C (preferentemente, 15B y/o 15C, con mayor preferencia, 15B).

10. Sujeto que será tratado con composiciones inmunógenas y kits de la invención

Como se describe en la presente, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente se pueden usar en distintos métodos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto.

En una forma de realización preferida, el sujeto es un ser humano. En una forma de realización de máxima preferencia, el sujeto es un bebé recién nacido (es decir, de menos de 3 meses de vida), un lactante (es decir, de 3 meses a 1 año de edad) o un niño pequeño (es decir, de 1 a 4 años de edad).

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas y los kits descritos en la presente son para usar como una vacuna.

En tal forma de realización, el sujeto que debe ser vacunado puede tener menos de 1 año de edad. Por ejemplo, el sujeto que debe ser vacunado puede tener alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11 o alrededor de 12 meses de vida. En una forma de realización, el

sujeto que debe ser vacunado tiene alrededor de 2, alrededor de 4 o alrededor de 6 meses de vida. En otra forma de realización, el sujeto que debe ser vacunado tiene menos de 2 años de edad. Por ejemplo, el sujeto que debe ser vacunado puede tener alrededor de 12 a alrededor de 15 meses de vida. En algunos casos, se requiere tan solo una dosis de la composición inmunógena de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, se pueden administrar una segunda, una tercera o una cuarta dosis (véase la sección 11 más adelante).

En una forma de realización de la presente invención, el sujeto que debe ser vacunado es un adulto humano de 50 años de edad o más, con mayor preferencia, un adulto humano de 55 años de edad o más. En una forma de realización, el sujeto que debe ser vacunado es un adulto humano de 65 años de edad o más, 70 años de edad o más, 75 años de edad o más u 80 años de edad o más.

En una forma de realización, el sujeto que debe ser vacunado es una persona inmunodeprimida, en particular, un ser humano. Una persona inmunodeprimida se define, generalmente, como una persona que muestra una capacidad atenuada o reducida para montar una defensa humoral o celular normal ante la exposición a agentes infecciosos.

En una forma de realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene una enfermedad o afección que afecta el sistema inmunitario y da como resultado una respuesta de anticuerpos que no es suficiente para brindar protección contra la enfermedad neumocócica o para tratarla.

En una forma de realización, dicha enfermedad es un trastorno de inmunodeficiencia primario. Preferentemente, dicho trastorno de inmunodeficiencia primario se selecciona del grupo que consiste en: inmunodeficiencias de linfocitos T y B combinados, deficiencias de anticuerpos, síndromes bien definidos, enfermedades de desregulación inmunitaria, trastornos de fagocitos, deficiencias inmunitarias innatas, trastornos autoinflamatorios y deficiencias complementarias. En una forma de realización, dicho trastorno de inmunodeficiencia primario se selecciona de aquel descrito en la página 24, línea 11, a página 25, línea 19, de WO 2010/125480.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: Infección por HIV, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, trastornos cardíacos o pulmonares crónicos, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus, enfermedad hepática crónica, alcoholismo, cirrosis, pérdidas de líquido cefalorraquídeo, miocardiopatía, bronquitis crónica, enfisema,

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), disfunción del bazo (tal como enfermedad de células falciformes), ausencia de la función del bazo (asplenia), neoplasia de la sangre, leucemia, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma, insuficiencia renal, síndrome nefrótico y asma.

En una forma de realización de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene malnutrición.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado está tomando un fármaco o recibiendo un tratamiento que disminuye la resistencia del cuerpo a la infección. En una forma de realización, dicho fármaco se selecciona de aquel descrito en la página 26, línea 33, a página 26, línea 4, de WO 2010/125480.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado es fumador.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene un recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos) por debajo de 5×10^9 células por litro, o por debajo de 4×10^9 células por litro, o por debajo de 3×10^9 células por litro, o por debajo de 2×10^9 células por litro, o por debajo de 1×10^9 células por litro, o por debajo de $0,5 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,3 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,1 \times 10^9$ células por litro.

Recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos): La cantidad de glóbulos blancos (WBC) en la sangre. Generalmente, los WBC se miden como parte del CBC (hemograma completo). Los glóbulos blancos son células que combaten las infecciones en la sangre y son distintos de los glóbulos rojos (que portan oxígeno), conocidos como eritrocitos. Existen diferentes tipos de glóbulos blancos, que incluyen neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN), cayados (neutrófilos levemente inmaduros), linfocitos de tipo T (linfocitos T), linfocitos de tipo B (linfocitos B), monocitos, eosinófilos y basófilos. En el recuento de glóbulos blancos se reflejan todos los tipos de glóbulos blancos. El rango normal para el recuento de glóbulos blancos es, generalmente, de 4300 a 10.800 células por milímetro cúbico de sangre. Esto también se puede denominar recuento de leucocitos y se puede expresar en unidades internacionales como $4,3 - 10,8 \times 10^9$ células por litro.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene neutropenia. En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser

vacunado tiene un recuento de neutrófilos por debajo de 2×10^9 células por litro, o por debajo de 1×10^9 células por litro, o por debajo de $0,5 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,1 \times 10^9$ células por litro, o por debajo de $0,05 \times 10^9$ células por litro.

Un recuento de glóbulos blancos o “neutropenia” es una afección caracterizada por niveles anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre circulante. Los neutrófilos son una especie específica de glóbulos blancos que ayudan a prevenir y combatir infecciones. La mayor parte de los pacientes de cáncer que tienen neutropenia la experimentan como un efecto secundario de la quimioterapia. La neutropenia inducida por quimioterapia aumenta el riesgo de un paciente de contraer infecciones y altera el tratamiento del cáncer.

En una forma de realización particular de la presente invención, el sujeto inmunodeprimido que debe ser vacunado tiene un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $500/\text{mm}^3$, o un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $300/\text{mm}^3$, o un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $200/\text{mm}^3$, recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $100/\text{mm}^3$, un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $75/\text{mm}^3$, o un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de $50/\text{mm}^3$.

Generalmente, las pruebas de linfocitos CD4 se informan como la cantidad de células en mm^3 . Los recuentos de CD4 normales son de 500 a 1600, y los recuentos de CD8 son de 375 a 1100. Los recuentos de CD4 disminuyen drásticamente en personas que tienen VIH.

En una forma de realización de la invención, cualquiera de los sujetos inmunodeprimidos descritos en la presente es un ser humano de sexo masculino o un ser humano de sexo femenino.

11. Programa de inmunización

En algunos casos, se requiere tan solo una dosis de la composición inmunógena de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, tales como condiciones de mayor insuficiencia inmunitaria o inmadurez inmunitaria, se pueden administrar una segunda, una tercera o una cuarta dosis. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la composición inmunógena de acuerdo con la invención es una dosis única. En una forma de realización particular, ese programa de dosis única es para personas sanas que tienen al menos 2 años de edad.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la composición

inmunógena de acuerdo con la invención es un programa de dosis múltiple. Un programa de dosis múltiple suele usarse en condiciones, tales como insuficiencia inmunitaria (tal como un ser personas ancianas o inmunodeprimidas) o inmadurez inmunitaria (tal como seres humanos recién nacidos (es decir, de menos de 3 meses de vida), lactantes (es decir, de 3 meses a 1 año de edad) o niños pequeños (es decir, de 1 año a 4 años de edad)). En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular,

ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida. En otra forma

de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una o más dosis de refuerzo se administran en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas entre dosis, preferentemente, con un intervalo de dosis de 4-8 semanas.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una dosis de refuerzo se administra alrededor de 3 meses después.

En otra forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 6, 7 u 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 6, 7 u 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 6, 7 u 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 6, 7 u 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 6, 7 u 8

dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

Un aspecto de la invención se refiere a cualquier composición inmunógena de la invención para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial con una segunda composición inmunógena. Un aspecto de la invención se refiere a cualquier kit descrito en la presente para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial.

La expresión "administración simultánea" significa la administración de dosis terapéuticamente eficaces de una primera y una segunda composiciones inmunógenas en una sola forma de dosis unitaria.

La expresión "administración concurrente" significa la administración de dosis terapéuticamente eficaces de una primera y una segunda composiciones inmunógenas a través del mismo sitio de acceso, pero en formas de dosis unitarias separadas, con un período de separación breve entre ellas. Administración concurrente es, esencialmente, administrar las dos composiciones inmunógenas a alrededor del mismo tiempo, pero en formas de dosis separadas, a través del mismo sitio de acceso. La administración concurrente de la primera y segunda composiciones inmunógenas suele ocurrir en la misma visita al consultorio del médico.

La expresión "administración concomitante" significa la administración de dosis terapéuticamente eficaces de una primera y una segunda composiciones inmunógenas, en formas de dosis unitarias separadas, con un período de separación breve entre ellas, en sitios anatómicos diferentes. Administración concomitante es, esencialmente, administrar las dos composiciones inmunógenas a alrededor del mismo tiempo, pero en formas de dosis separadas, y en sitios anatómicos diferentes. La administración concomitante de la primera y segunda composiciones inmunógenas suele ocurrir en la misma visita al consultorio del médico.

La expresión "administración secuencial" significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una primera o una segunda composición inmunógena sola, y luego la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la composición inmunógena restante después de un intervalo de al menos alrededor de 1 mes. Por ejemplo, en una forma de realización, la primera composición inmunógena se administra en una forma de dosis única, y luego, después de un intervalo de al menos alrededor de 1 mes, la segunda composición inmunógena se administra en una forma de dosis única separada. En una forma de realización alternativa, la segunda composición inmunógena se administra en una forma de dosis única, y luego, después de un intervalo de al menos alrededor de 1 mes, la primera composición inmunógena

se administra en una forma de dosis única separada. La administración secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas suele ocurrir en diferentes visitas al consultorio del médico.

En un aspecto de la presente invención, una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) se administra de manera simultánea, concurrente, concomitante o secuencial con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) para el uso simultáneo, concurrente, concomitante o secuencial con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En algunos casos, se requiere tan solo una dosis de cada una de las composiciones inmunógenas, pero en algunas circunstancias, se pueden administrar una segunda, tercera o cuarta dosis de una o cada una de las composiciones inmunógenas. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) para la administración simultánea con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración simultánea es una dosis única. En una forma de realización particular, ese programa de dosis única es para personas sanas que tienen al menos 2 años de edad.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración simultánea es un programa de dosis múltiple. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una

forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a

alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida. En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna administrada a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una o más dosis de refuerzo se administran en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas entre dosis, preferentemente, con un intervalo de dosis de 4-

8 semanas.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una dosis de refuerzo se administra alrededor de 3 meses después.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) para la administración concomitante con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración concomitante es una dosis única (la administración de la primera y segunda composiciones inmunógenas, si bien se realiza en formas de dosis unitarias separadas, es considerada una dosis única a los fines de definir el programa de inmunización). En una forma de realización particular, ese programa de dosis única es para personas sanas que tienen al menos 2 años de edad.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración concomitante es un programa de dosis múltiple (la administración de la primera y segunda composiciones inmunógenas, si bien se realiza en formas de dosis unitarias separadas, es considerada una dosis única a los fines de definir el programa de inmunización). En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a

alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna administradas a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una o más dosis de refuerzo se administran en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas, preferentemente, con un intervalo de dosis de 4-8 semanas.

En una forma de realización, una primera dosis se administra el Día 0, y una dosis de refuerzo se administra alrededor de 3 meses después.

En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 o 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5, 6, 7 u 8 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) para la administración concurrente con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración concurrente es una dosis única (la administración de la primera y segunda composiciones inmunógenas, si bien se realiza en formas de dosis unitarias separadas, es considerada una dosis única a los fines de definir el programa de inmunización). En una forma de realización particular, ese programa de dosis única es para personas sanas que tienen al menos 2 años de edad.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración concurrente es un programa de dosis múltiple, en particular, cualquiera de los programas múltiples descritos anteriormente para la administración concomitante.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) para la administración secuencial con una segunda composición inmunógena. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en primer lugar, y la segunda composición inmunógena

se administra en segundo lugar. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en segundo lugar.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2, 3 o 4 dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2 dosis. En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 2 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en primer lugar, y la segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en segundo lugar.

En una forma de realización de ese programa de 2 dosis, la primera y segunda dosis se administran en el primer año de vida. En una forma de realización de ese programa de 2 dosis, la primera dosis se administra en el primer año de vida, y la segunda dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, la dosis cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la dosis cuando el niño es pequeño se administra a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 3 dosis. En una forma de realización particular,

ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 3 dosis, la primera y segunda dosis se administran en el primer año de vida, y la tercera dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, la primera y segunda dosis están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y la tercera dosis se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la primera y segunda dosis están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y la tercera dosis se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 3 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como las dos primeras dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 3 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como las dos primeras dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 3 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera

dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera dosis.

Aun en otra forma de realización de ese programa de 3 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

Aun en otra forma de realización de ese programa de 3 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 3 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda y tercera dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 4 dosis.

En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 4 dosis, el programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10

meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 2 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, luego una tercera dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, y una cuarta dosis alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses después de la tercera dosis.

En una forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera y segunda dosis se administran en el primer año de vida, y la tercera y cuarta dosis se administran cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera, segunda y tercera dosis se administran en el primer año de vida, y la cuarta dosis se administra cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización, ese programa de 4 dosis consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como las tres primeras dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como las tres primeras dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera y segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera y segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la cuarta dosis.

Aun en otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la segunda, la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda, la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera

dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis y la tercera dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la cuarta dosis.

En otra forma de realización de ese programa de 4 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la segunda y tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 5 dosis.

En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización

particular, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 5 dosis consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego una quinta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una quinta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una quinta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una quinta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, y una quinta dosis alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses después de la cuarta dosis.

En una forma de realización de ese programa de 5 dosis, la primera, segunda y tercera dosis se administran en el primer año de vida, y la cuarta y quinta dosis se administran cuando el niño es pequeño.

En una forma de realización de ese programa de 5 dosis, la primera, segunda, tercera y cuarta dosis se administran en el primer año de vida, y la quinta dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 5 dosis consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un

intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 5 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2, denominada 1.^a IC en la tabla siguiente) y la segunda composición inmunógena (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 3, denominada 2.^a IC en la tabla siguiente) se administran en el siguiente orden:

Número de programa	Dosis				
	1	2	3	4	5
1	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
3	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
4	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
5	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
6	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
7	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
8	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
9	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
10	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
11	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
12	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
13	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
14	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
15	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
16	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
17	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
18	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
19	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC

20	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
21	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
22	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
23	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
24	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
25	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
26	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
27	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
28	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
29	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
30	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC

La tabla anterior proporciona el orden de administración de la primera y segunda composiciones inmunógenas (denominadas 1.^a IC y 2.^a IC, respectivamente) para las diferentes dosis, por ejemplo, el número de programa 1 debe interpretarse de la siguiente manera: en una forma de realización del programa de 5 dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda, tercera y cuarta dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la quinta dosis.

En una forma de realización preferida, el orden de administración de la primera y segunda composiciones inmunógenas es de acuerdo al programa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 o 21.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la dosis secuencial consiste en una serie de 6 dosis.

En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a

alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 6 dosis consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una sexta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una sexta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización de ese programa de 6 dosis, la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta dosis se administran en el primer año de vida, y la sexta dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 6 dosis consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 6 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y la segunda composición inmunógena (tal como las que se describieron anteriormente en la sección 3) se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los 30 programas proporcionados para el programa de 5 dosis (véase la tabla anterior, programas 1 a 30), y luego una sexta dosis. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la sexta dosis. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra como la sexta dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la dosis secuencial consiste en una serie de 7 dosis.

En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 7 dosis consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización de ese programa de 7 dosis, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta dosis se administran en el primer año de vida, y la séptima dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 7 dosis consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 7 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y la segunda composición inmunógena (tal como las que se describieron anteriormente en la sección 3) se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa

de 6 dosis (véase antes), y luego una séptima dosis. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la séptima dosis. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra como la séptima dosis.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la dosis secuencial consiste en una serie de 8 dosis.

En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 8 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 8 dosis consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

En una forma de realización de ese programa de 8 dosis, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima dosis se administran en el primer año de vida, y la octava dosis se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 8 dosis consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis

cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 8 dosis, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y la segunda composición inmunógena (tal como las que se describieron anteriormente en la sección 3) se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa de 7 dosis (véase antes), y luego una octava dosis. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la octava dosis. En otra forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra como la octava dosis.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la administración secuencial de:

(a) una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y

(b) la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) con una segunda composición inmunógena.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2 administraciones. En una forma de realización, el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa, una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en primer lugar, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con una segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar. En otra forma de realización, la administración concomitante de una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con una segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en segundo lugar.

En una forma de realización de ese programa de 2 administraciones, la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida. En una forma de realización de ese programa de 2 administraciones, la primera administración se administra en el primer año de vida, y la segunda administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 3 administraciones. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización,

la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de este programa de 3 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera administración.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera administración.

Aun en otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración.

Aun en otra forma de realización de este programa de 3 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, y la administración concomitante de la primera composición

inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda y tercera administraciones.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 4 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, el programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta administración

alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la primera, segunda y tercera administraciones se administran en el primer año de vida, y la cuarta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 4 administraciones consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, ese programa de 4 administraciones consiste en una serie de administraciones a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de este programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de este programa de 4 administraciones, la

primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera y segunda administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de este programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda, la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena

de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la primera

administración, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 5 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 5 administraciones, la primera, segunda, tercera y cuarta administraciones se administran en el primer año de vida, y la quinta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 5 administraciones consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego otra administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego otra administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de este programa de 5 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (denominada 1.^a IC en la siguiente tabla) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) se administran en el siguiente orden.

Número de programa	Dosis				
	1	2	3	4	5
1	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
2	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
3	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
4	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
5	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
6	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
7	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
8	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
9	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
10	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
11	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
12	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

13	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
14	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
15	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
16	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
17	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
18	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
19	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
20	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
21	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
22	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
23	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
24	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
25	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
26	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
27	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
28	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
29	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
30	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

La tabla anterior proporciona el orden de administración de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (denominada 1.^a IC en la siguiente tabla), y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) para las diferentes dosis, por ejemplo, el programa número 1 debe interpretarse como: en la forma de realización de ese programa de 5 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda, tercera y cuarta dosis, y la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la quinta dosis.

En una forma de realización preferida, el orden de administración es de acuerdo con el programa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22 o 23.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la dosis secuencial consiste en una serie de 6 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 6 administraciones consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 6 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta administraciones se administran en el primer año de vida, y la sexta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 6 administraciones consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5

administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 6 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los 30 programas proporcionados para el programa de 5 administraciones (véase la tabla anterior, programas 1 a 30), y luego una sexta administración. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la sexta administración. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la sexta administración.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 7 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 7 administraciones consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un

intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 7 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 7 administraciones consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 7 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa de 6 administraciones (véase antes), y luego una séptima administración. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la séptima administración. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la séptima administración.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 8 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6

meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 8 administraciones consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 8 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima administraciones se administran en el primer año de vida, y la octava administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 8 administraciones consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 8 administraciones, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa de 7 administraciones (véase antes), y luego una octava dosis. En una forma de realización, la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra en la octava dosis. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se

administra en la octava dosis.

En una forma de realización, en los programas de administración descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por una administración concurrente.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la administración secuencial de:

(a) la segunda composición inmunógena (tal como las que se describieron anteriormente en la sección 3) y

(b) la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) con la segunda composición inmunógena.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de administración es cualquiera de los programas descritos anteriormente para la administración secuencial de una primera composición inmunógena de acuerdo con la invención, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con una segunda composición inmunógena (parte inferior de la página 152 hasta la página 164), en donde la administración de esa segunda composición inmunógena de (a) reemplaza la administración de la primera composición inmunógena de (a) en esos programas.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de administración descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

Por ende, en una forma de realización, la presente invención se refiere a la administración secuencial de:

(a) la segunda composición inmunógena (tal como las que se describieron anteriormente en la sección 3) y

(b) la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 2) con la segunda composición inmunógena.

En una forma de realización, la segunda composición inmunógena es cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente en la sección 3.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2 administraciones. En una forma de realización, el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en primer lugar, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en segundo lugar.

En una forma de realización de ese programa de 2 administraciones, la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida. En una forma de realización de ese programa de 2 administraciones, la primera administración se administra en el primer año de vida, y la segunda administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 2 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración

secuencial consiste en una serie de 3 administraciones. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde las primeras dos administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una tercera administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en primer lugar, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la

invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar.

En una forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera administración.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) se administra en la segunda administración, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera administración.

Aun en otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) se administra en la tercera administración.

Aun en otra forma de realización de este programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) se administra en la segunda y tercera administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la

invención (tal como las de la sección 2 anterior) se administra en la primera administración, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda y tercera administraciones.

Por lo tanto, en una forma de realización de este programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) se administran en el siguiente orden.

Número de programa	Dosis		
	1	2	3
1	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
3	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
4	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
5	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
6	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC

La tabla anterior proporciona el orden de administración de la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla), y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) para las diferentes dosis, por ejemplo, el programa número 1 debe interpretarse como: en la forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

En una forma de realización preferida, el orden de administración es de acuerdo con el programa 1.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 3 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 4 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, el programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la

primera, segunda y tercera administraciones se administran en el primer año de vida, y la cuarta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 4 administraciones consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 3 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización, ese programa de 4 administraciones consiste en una serie de administraciones a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la

invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera y segunda administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda, tercera y cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2

anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda administración, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la primera administración, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2

anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones, y la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la cuarta administración.

En otra forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) se administra en la segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

Por lo tanto, en una forma de realización de ese programa de 4 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) se administran en el siguiente orden:

Número de programa	Dosis			
	1	2	3	4
1	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
3	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
4	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
5	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
6	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
7	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
8	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
9	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
10	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
11	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
12	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
13	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
14	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

La tabla anterior proporciona el orden de administración de la segunda

composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla), y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) para las diferentes dosis, por ejemplo, el programa número 1 debe interpretarse como: en la forma de realización de ese programa de 3 administraciones, la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda y tercera dosis, y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

En una forma de realización preferida, el orden de administración es de acuerdo con el programa 1, 3 o 5.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de administración descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 5 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10

meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 5 administraciones, la primera, segunda, tercera y cuarta administraciones se administran en el primer año de vida, y la quinta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 5 administraciones consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego otra administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego otra administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 5 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) se administran en el siguiente orden:

Número de programa	Dosis				
	1	2	3	4	5
1	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
2	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
3	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
4	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
5	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
6	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
7	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
8	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
9	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
10	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
11	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
12	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
13	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
14	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
15	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
16	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
17	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
18	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
19	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
20	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
21	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
22	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
23	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
24	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
25	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
26	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
27	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
28	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
29	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
30	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

La tabla anterior proporciona el orden de administración de la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) (denominada 2.^a IC en la siguiente tabla), y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena (denominada 1.^a IC/2.^a IC en la siguiente tabla) para las diferentes dosis, por ejemplo, el programa número 1 debe interpretarse como: en la forma de realización de ese programa de 5 administraciones, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda, tercera y cuarta dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la quinta dosis.

En una forma de realización preferida, el orden de administración es de acuerdo con el programa 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 30.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 5 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la dosis secuencial consiste en una serie de 6 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 6 administraciones consiste en

una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración, o una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 6 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta administraciones se administran en el primer año de vida, y la sexta administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 6 administraciones consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 6 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las de la sección 3 anterior) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los 30 programas proporcionados para el programa de 5 administraciones (véase la tabla anterior, programas 1 a 30), y luego una sexta administración. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra en la sexta administración. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la sexta administración.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 6 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 7 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 7 administraciones consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 7 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 7 administraciones consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se

administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 7 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 3) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa de 6 administraciones (véase antes), y luego una séptima administración. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra en la séptima administración. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la séptima administración.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 7 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 8 administraciones.

En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses. En una forma de realización particular, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses. En otra forma de realización, ese programa consiste en una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, o una serie de 8 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 2 meses.

En una forma de realización, ese programa de 8 administraciones consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un

intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

En una forma de realización de ese programa de 8 administraciones, la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima administraciones se administran en el primer año de vida, y la octava administración se administra cuando el niño es pequeño. En una forma de realización, ese programa de 8 administraciones consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida. En una forma de realización, ese programa consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28-40 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y luego una administración cuando el niño es pequeño, a los 12-15 meses de vida.

En una forma de realización de ese programa de 8 administraciones, la segunda composición inmunógena (tal como las que se mencionaron anteriormente en la sección 3) y la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención (tal como las de la sección 2 anterior) con la segunda composición inmunógena se administran en el orden de acuerdo con cualquiera de los programas proporcionados para el programa de 7 administraciones (véase antes), y luego una octava dosis. En una forma de realización, la segunda composición inmunógena se administra en la octava dosis. En otra forma de realización, la administración concomitante de la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención con la segunda composición inmunógena se administra en la octava dosis.

En una forma de realización, en cualquiera de los programas de 8 administraciones descritos anteriormente, la administración concomitante se reemplaza por la administración concurrente.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas descritas en la presente se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas se administran mediante inyección intramuscular en el muslo o en el brazo. En una forma de realización, el lugar de la inyección es el músculo anterolateral del muslo o el músculo deltoides.

En una forma de realización, las composiciones inmunógenas se administran

mediante inyección subcutánea en el muslo o en el brazo. En una forma de realización, el lugar de la inyección es el tejido adiposo sobre el músculo anterolateral del muslo o el tejido adiposo sobre los tríceps.

En el caso de la administración concomitante, la primera inyección se puede administrar en un muslo, y la segunda, en el otro muslo (preferentemente, en los músculos anterolaterales de los muslos). De manera alternativa, la primera inyección se puede administrar en un brazo, y la segunda, en el otro brazo (preferentemente, en el músculo deltoides). La primera inyección también se puede administrar en un muslo, y la segunda, en un brazo, o la primera inyección en un brazo, y la segunda, en un muslo.

En un aspecto, la invención se refiere al kit de la presente invención (tal como los que se describieron anteriormente en la sección 4) para usar en cualquiera de los programas de inmunización descritos anteriormente.

Las formas de realización particulares de la invención se establecen en los siguientes párrafos numerados:

1. Una composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado seleccionado del grupo que consiste en un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, en donde tal composición es una composición neumocócica conjugada de valencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

2. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 1, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B.

3. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-2, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F.

4. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-3, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F.

5. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-4, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F.

6. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

1-5, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A.

7. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-6, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A.

8. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-7, en donde la composición comprende al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8.

9. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-8, en donde la composición comprende un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, en donde la composición es una composición neumocócica conjugada de valencia 7.

10. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-9, en donde los glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

11. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-9, en donde los glucoconjugados se conjugan individualmente con PD.

12. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-9, en donde los glucoconjugados se conjugan individualmente con TT.

13. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-9, en donde los glucoconjugados se conjugan individualmente con DT.

14. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-13, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 20.000 kDa.

15. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-14, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B tiene un peso molecular de 10.000 kDa a 16.000 kDa.

16. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-15, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 15B es de 0,5 a 3.

17. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-16, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 15B con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 15B es de 0,7 a 0,9.

18. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-17, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 15B.

19. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-18, en donde al menos 40 % de los glucoconjugados de serotipo 15F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

20. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-19, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende al menos 0,1 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

21. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-20, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

22. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-21, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,6.

23. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-22, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el glucoconjugado de serotipo 15B con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,6.

24. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-23, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende al menos 0,1 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

25. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-24, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende al menos 0,5 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

26. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-25, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B.

27. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-26, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 15B es de 2 a 15.

28. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-27, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 1.500 kDa.

29. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-28, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 15B es CRM₁₉₇.

30. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-29, en donde el glucoconjugado de serotipo 15B se prepara usando aminación reductora.

31. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-30, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F tiene un peso molecular de 400 kDa a 15.000 kDa.

32. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-31, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 8.000 kDa.

33. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-32, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 22F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 22F es de 0,5 a 3.

34. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-33, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 22F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 22F es de 0,9 a 1,1.

35. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-34, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 22F.

36. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-35, en donde al menos 30 % de los glucoconjugados de serotipo 22F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

37. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-36, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F comprende al menos 0,1 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 22F.

38. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-37, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 22F.

39. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-38, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de

serotipo 22F en el glucoconjugado de serotipo 22F con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6.

40. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-39, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 22F en el glucoconjugado de serotipo 22F con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,6.

41. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-40, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 22F es de 2 a 15.

42. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-41, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

43. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-42, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 22F es CRM₁₉₇.

44. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 3-43, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F se prepara usando aminación reductora.

45. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-44, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa.

46. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-45, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 5.000 kDa.

47. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-46, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 33F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 33F es de 0,2 a 4.

48. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-47, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 33F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 33F es de 0,4 a 1,7.

49. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-48, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F comprende menos de alrededor de 40% de polisacárido capsular de serotipo 33F libre en comparación con la cantidad

total de polisacárido capsular de serotipo 33F.

50. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-49, en donde al menos 35% de los glucoconjugados de serotipo 33F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

51. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-50, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F comprende al menos 0,1 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F.

52. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-51, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F.

53. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-52, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F en el glucoconjugado de serotipo 33F con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6.

54. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-53, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F en el glucoconjugado de serotipo 33F con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,6.

55. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-54, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 33F es de 2 a 20.

56. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-55, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

57. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-56, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el sacárido cada 2 a 25 unidades de repetición de sacáridos.

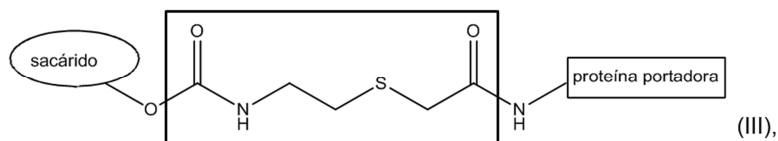
58. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-57, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 33F es CRM₁₉₇.

59. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-58, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F se prepara usando aminación

reductora.

60. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 4-59, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F se prepara usando conjugación eTEC.

61. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 60, en donde el glucoconjugado de serotipo 33F se representa mediante la Fórmula general (III):



en donde los átomos que comprenden el espaciador eTEC están contenidos en la caja central.

62. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-61, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa.

63. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-62, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F tiene un peso molecular de 500 kDa a 5.000 kDa.

64. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-63, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 12F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 12F es de 0,2 a 4.

65. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-64, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 12F con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 12F es de 0,8 a 1,8.

66. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-65, en donde el glucoconjugado de serotipo 22F comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 12F.

67. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-66, en donde al menos 35% de los glucoconjugados de serotipo 12F tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

68. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-67, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 12F es de 2 a 20.

69. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-68, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F comprende un sacárido que

tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

70. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-69, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el sacárido cada 2 a 25 unidades de repetición de sacáridos.

71. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-70, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 12F es CRM₁₉₇.

72. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-71, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F se prepara usando aminación reductora.

73. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 5-72, en donde el glucoconjugado de serotipo 12F se prepara usando aminación reductora TEMPO/NCS.

74. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-73, en donde el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa.

75. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-74, en donde el glucoconjugado de serotipo 10A tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 10.000 kDa.

76. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-75, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 10A con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 10A es de 0,5 a 3.

77. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-76, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 10A con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 10A es de 0,8 a 1,2.

78. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-77, en donde el glucoconjugado de serotipo 10A comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 10A libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 10A.

79. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-78, en donde al menos 30 % de los glucoconjugados de serotipo 10A tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

80. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-79, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 10A es de

2 a 15.

81. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-80, en donde el glucoconjugado de serotipo 10A comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

82. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-81, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 10A es CRM₁₉₇.

83. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 6-82, en donde el glucoconjugado de serotipo 10A se prepara usando aminación reductora.

84. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-83, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa.

85. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-84, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A tiene un peso molecular de 500 kDa a 20.000 kDa.

86. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-85, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 11A con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 11A es de 0,2 a 4.

87. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-86, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 11A con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 11A es de 0,8 a 1,6.

88. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-87, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 11A libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 11A.

89. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-88, en donde al menos 30 % de los glucoconjugados de serotipo 11A tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

90. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-89, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 0,3 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A.

91. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-90, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 1,8 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A.

92. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-91, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,6.

93. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-92, en donde la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el glucoconjugado de serotipo 11A con respecto a mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,6.

94. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-93, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 0,1 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A.

95. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-94, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende al menos 0,4 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular de serotipo 11A.

96. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-95, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 11A es de 1 a 15.

97. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-96, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

98. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-97, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 11A es CRM₁₉₇.

99. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 o 7-98, en donde el glucoconjugado de serotipo 11A se prepara usando aminación reductora.

100. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-99, en donde el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 50 kDa a 20.000 kDa.

101. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-100, en donde el glucoconjugado de serotipo 8 tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 15.000 kDa.

102. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

1 u 8-101, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 8 con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 8 es de 0,2 a 4.

103. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-102, en donde la relación (p/p) de polisacárido capsular de serotipo 8 con respecto a la proteína portadora en el glucoconjugado de serotipo 8 es de 0,8 a 1,5.

104. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-103, en donde el glucoconjugado de serotipo 8 comprende menos de alrededor de 50 % de polisacárido capsular de serotipo 8 libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de serotipo 8.

105. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-104, en donde al menos 30 % de los glucoconjugados de serotipo 8 tiene una K_d menor o igual a 0,3 en una columna de CL-4B.

106. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-105, en donde el grado de conjugación del glucoconjugado de serotipo 8 es de 2 a 20.

107. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-106, en donde el glucoconjugado de serotipo 8 comprende un sacárido que tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa.

108. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-107, en donde la proteína portadora del glucoconjugado de serotipo 8 es CRM₁₉₇.

109. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 u 8-108, en donde el glucoconjugado de serotipo 8 se prepara usando aminación reductora.

110. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-109, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende 0,1 µg a 100 µg de polisacárido de cada serotipo.

111. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-110, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende 1,0 µg a 10 µg de polisacárido de cada serotipo.

112. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-111, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende alrededor de 1,0 µg, alrededor de 1,2 µg, alrededor de 1,4 µg, alrededor de 1,6 µg, alrededor de 1,8 µg, 2,0 µg, alrededor de 2,2 µg, alrededor de 2,4 µg, alrededor de 2,6 µg, alrededor de 2,8 µg, alrededor de 3,0 µg, alrededor de 3,2 µg, alrededor de 3,4 µg, alrededor de 3,6

µg, alrededor de 3,8 µg, alrededor de 4,0 µg, alrededor de 4,2 µg, alrededor de 4,4 µg, alrededor de 4,6 µg, alrededor de 4,8 µg, alrededor de 5,0 µg, alrededor de 5,2 µg, alrededor de 5,4 µg, alrededor de 5,6 µg, alrededor de 5,8 µg o alrededor de 6,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de serotipo.

113. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-112, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende alrededor de 1,5 µg a alrededor de 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y/o 33F, si están presentes.

114. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-113, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende 10 µg a 150 µg de proteína portadora.

115. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-114, en donde cada dosis de la composición inmunógena comprende alrededor de 1 µg, alrededor de 2 µg, alrededor de 3 µg, alrededor de 4 µg, alrededor de 5 µg, alrededor de 6 µg, alrededor de 7 µg, alrededor de 8 µg, alrededor de 9 µg, alrededor de 10 µg, alrededor de 11 µg, alrededor de 12 µg, alrededor de 13 µg, alrededor de 14 µg, alrededor de 15 µg, alrededor de 16 µg, alrededor de 17 µg, alrededor de 18 µg, alrededor de 19 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 21 µg, alrededor de 22 µg, alrededor de 23 µg, alrededor de 24 µg, alrededor de 25 µg, alrededor de 26 µg, alrededor de 27 µg, alrededor de 28 µg, alrededor de 29 µg, alrededor de 30 µg, alrededor de 31 µg, alrededor de 32 µg, alrededor de 33 µg, alrededor de 34 µg, alrededor de 35 µg, alrededor de 36 µg, alrededor de 37 µg, alrededor de 38 µg, alrededor de 39 µg, alrededor de 40 µg, alrededor de 41 µg, alrededor de 42 µg, alrededor de 43 µg, alrededor de 44 µg, alrededor de 45 µg, alrededor de 46 µg, alrededor de 47 µg, alrededor de 48 µg, alrededor de 49 µg, alrededor de 50 µg, alrededor de 51 µg, alrededor de 52 µg, alrededor de 53 µg, alrededor de 54 µg, alrededor de 55 µg, alrededor de 56 µg, alrededor de 57 µg, alrededor de 58 µg, alrededor de 59 µg, alrededor de 60 µg, alrededor de 61 µg, alrededor de 62 µg, alrededor de 63 µg, alrededor de 64 µg, alrededor de 65 µg, alrededor de 66 µg, alrededor de 67 µg, alrededor de 68 µg, alrededor de 69 µg, alrededor de 70 µg, alrededor de 71 µg, alrededor de 72 µg, alrededor de 73 µg, alrededor de 74 µg o alrededor de 75 µg de proteína portadora.

116. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-115, en donde la composición inmunógena también comprende al menos un antígeno de otros patógenos.

117. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-116, en donde la composición inmunógena también comprende al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un toxoide diftérico (D), un toxoide tetánico (T), un antígeno pertúsico (P), un antígeno pertúsico acelular (Pa), un antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBV) (HBsAg), un antígeno del virus de la hepatitis A (HAV), un sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugado y una vacuna contra el poliovirus inactivado (IPV).

118. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T y Pa.

119. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa y Hib.

120. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa e IPV.

121. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa y HBsAg.

122. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa, HBsAg y IPV.

123. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa, HBsAg y Hib.

124. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-117, en donde la composición inmunógena también comprende D, T, Pa, HBsAg, IPV y Hib.

125. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-124, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y conjugado (MenY).

126. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-125, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C conjugado (MenC).

127. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-126, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A conjugado (MenA).

128. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-127, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular

de *N. meningitidis* serogrupo W135 conjugado (MenW135).

129. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-128, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y conjugado (MenY) y un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C conjugado (MenC).

130. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-124, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W135 conjugado (MenW135), un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y conjugado (MenY) y/o un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C conjugado (MenC).

131. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-124, en donde la composición inmunógena también comprende un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A conjugado (MenA), un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W135 conjugado (MenW135), un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y conjugado (MenY) y/o un sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C conjugado (MenC).

132. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante.

133. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-132, en donde la composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, liposomas, una emulsión de aceite-en-agua, MF59 (4,3 % p/v de escualeno, 0,5 % p/v de polisorbato 80, 0,5 % p/v de trioleato de sorbitán), una emulsión de agua-en-aceite, MONTANIDE™, micropartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG) y nanopartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG).

134. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

135. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena también comprende fosfato de aluminio como adyuvante.

136. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

1-131, en donde la composición inmunógena también comprende sulfato de aluminio como adyuvante.

137. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena también comprende hidróxido de aluminio como adyuvante.

138. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena comprende 0,1 mg/ml a 1 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

139. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena comprende 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

140. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-131, en donde la composición inmunógena comprende alrededor de 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

141. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-140, en donde la composición inmunógena también comprende un oligonucleótido CpG.

142. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-141, en donde la composición inmunógena se formula en forma líquida.

143. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-141, en donde la composición inmunógena se formula en forma liofilizada.

144. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-142, en donde la composición inmunógena se formula en forma líquida acuosa.

145. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-144, en donde la composición inmunógena comprende uno o más de los siguientes: un amortiguador, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector, tal como un azúcar, y un antioxidante, tal como un secuestrante de radicales libres o un agente quelante, o cualquier combinación de estos.

146. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-145, en donde la composición inmunógena comprende un amortiguador.

147. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 146, en donde el amortiguador tiene una pKa de alrededor de 3,5 a alrededor de 7,5.

148. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 146-147, en donde el amortiguador es fosfato, succinato, histidina o citrato.

149. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

146-148, en donde el amortiguador es succinato en una concentración final de 1,0 mM a 10 mM.

150. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 146-149, en donde el amortiguador es succinato en una concentración final de alrededor de 5,0 mM.

151. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-150, en donde la composición inmunógena comprende una sal.

152. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 151, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y una combinación de estos.

153. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 151-152, en donde la sal es cloruro de sodio.

154. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 151-153, en donde la sal es cloruro de sodio en una concentración de alrededor de 150 mM.

155. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-154, en donde la composición inmunógena comprende un tensioactivo.

156. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 155, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 85, Triton N-1 01, Triton X-100, octoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipéptido de trietanolamina, hidroxistearato de polioxietileno-660, polioxietileno-35-ricinoleato, lecitina de soja y un poloxámero.

157. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-156, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo de polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 85 y un poloxámero.

158. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-157, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

159. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-158, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 en una concentración final de al menos 0,0001 % a 10 % en peso (p/p).

160. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-159, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 en una concentración final de al menos 0,001% a 1% en peso (p/p).

161. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-160, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 en una concentración final de al menos 0,01% a 1% en peso (p/p).

162. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 155-161, en donde el tensioactivo es polisorbato 80 en una concentración final de 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 % en peso (p/p).

163. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-162, en donde la composición inmunógena tiene un pH de 5,5 a 7,5.

164. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-163, en donde la composición inmunógena tiene un pH de 5,6 a 7,0.

165. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-164, en donde la composición inmunógena tiene un pH de 5,8 a 6,0.

166. Un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena que comprende tal composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165; y (b) una segunda composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

167. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

168. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

169. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

170. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

171. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 22F.

172. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición

inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 33F.

173. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 22F y 33F.

174. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F.

175. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F.

176. 175. El kit de acuerdo con el párrafo 166, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

177. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-176, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇.

178. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-177, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F se conjugan con CRM₁₉₇.

179. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-178, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A se conjugan con CRM₁₉₇.

180. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-179, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 3 se conjuga con CRM₁₉₇.

181. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-180, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇.

182. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-181, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇.

183. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-182, en donde los glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

184. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-176, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F se conjugan individualmente con PD.

185. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-176 o 184, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT.

186. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-176 o 184-185, en

donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.

187. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-176 o 184-186, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.

188. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 184-187, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇.

189. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 184-188, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇.

190. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-189, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

191. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-190, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

192. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 13.

193. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇.

194. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

195. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica

conjugada de valencia 12, en donde los 12 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇ y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

196. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-192, en donde la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, en donde los 13 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

197. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

198. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

199. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-191, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 15, en donde los 15 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

200. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-199, en donde todos los glucoconjugados de la segunda composición inmunógena se conjugan con la proteína portadora mediante aminación reductora.

201. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-200, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende 1,0 µg a 10 µg de polisacárido de cada serotipo.

202. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-201, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende 10 µg a 150 µg de proteína portadora.

203. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-202, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende alrededor de 15 µg, alrededor de 16 µg, alrededor de 17 µg, alrededor de 18 µg, alrededor de 19 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 21 µg, alrededor de 22 µg, alrededor de 23 µg, alrededor de 24 µg, alrededor de 25 µg, alrededor de 26 µg, alrededor de 27 µg, alrededor de 28 µg, alrededor de 29 µg, alrededor de 30 µg, alrededor de 31 µg, alrededor de 32 µg, alrededor de 33 µg, alrededor de 34 µg, alrededor de 35 µg, alrededor de 36 µg, alrededor de 37 µg, alrededor de 38 µg, alrededor de 39 µg, alrededor de 40 µg, alrededor de 41 µg, alrededor de 42 µg, alrededor de 43 µg, alrededor de 44 µg, alrededor de 45 µg, alrededor de 46 µg, alrededor de 47 µg, alrededor de 48 µg, alrededor de 49 µg o alrededor de 50 µg de proteína portadora.

204. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-203, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un antígeno de otros patógenos.

205. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-204, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante.

206. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-204, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

207. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-204, en donde la segunda composición inmunógena también comprende fosfato de aluminio como adyuvante.

208. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-204, en donde la segunda composición inmunógena también comprende 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

209. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-204, en donde la segunda composición inmunógena también comprende alrededor de 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

210. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-209, en donde la segunda composición inmunógena también comprende un amortiguador.

211. El kit de acuerdo con el párrafo 210, en donde el amortiguador tiene una pKa de alrededor de 3,5 a alrededor de 7,5.

212. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 210-211, en donde el amortiguador es fosfato, succinato, histidina o citrato.

213. El kit de acuerdo con el párrafo 212, en donde el amortiguador es succinato en una concentración final de alrededor de 5,0 mM.

214. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-213, en donde la segunda composición inmunógena también comprende una sal.

215. El kit de acuerdo con el párrafo 214, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y una combinación de estos.

216. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-215, en donde la segunda composición inmunógena comprende cloruro de sodio en una concentración final de 150 mM.

217. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-216, en donde la segunda composición inmunógena también comprende un tensioactivo.

218. El kit de acuerdo con el párrafo 217, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

219. El kit de acuerdo con el párrafo 218, en donde la concentración final de polisorbato 80 es de 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 % (p/p).

220. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-219, en donde la segunda composición inmunógena tiene un pH de 5,8 a 6,0.

221. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-220, en donde la primera composición inmunógena y la segunda composición inmunógena están en recipientes separados.

222. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-221, en donde la primera y segunda composiciones inmunógenas se formulan en forma líquida.

223. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-221, en donde la primera y segunda composiciones inmunógenas se formulan en forma liofilizada.

224. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-221, en donde la primera composición inmunógena está en forma líquida, y la segunda composición inmunógena está en forma liofilizada.

225. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-221, en donde la primera composición inmunógena está en forma liofilizada, y la segunda composición inmunógena está en forma líquida.

226. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165, en donde la composición inmunógena se administra en forma simultánea, concurrente, concomitante o secuencial con una segunda composición inmunógena.

227. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165, para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial con una segunda composición inmunógena.

228. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial con cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas en la sección 3 anterior.

229. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-228, en donde la segunda composición inmunógena comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

230. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

231. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

232. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

233. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

234. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 22F.

235. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 33F.

236. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 22F y 23F.

237. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F.

238. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F.

239. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 229, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F.

240. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-239, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇.

241. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-240, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F se conjugan con CRM₁₉₇.

242. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-241, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 6A y 19A se conjugan con CRM₁₉₇.

243. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-242, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 3 se conjuga con CRM₁₉₇.

244. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-243, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇.

245. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-244, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇.

246. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-246, en donde todos los glucoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

247. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-239, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F se conjugan individualmente con PD.

248. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-239 o 247, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT.

249. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-239 o 247-248, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se

conjuga con DT.

250. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-239 o 247-249, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.

251. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 247-250, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F se conjuga con CRM₁₉₇.

252. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 247-251, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F se conjuga con CRM₁₉₇.

253. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-252, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

254. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-253, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

255. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-254, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, 14 o 15.

256. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-255, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 13.

257. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-254, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇.

258. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-254, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 11, en donde los 11 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados

individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

259. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-254, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 12, en donde los 12 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F conjugados individualmente con PD, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C conjugado con TT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F conjugado con DT, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F conjugado con CRM₁₉₇ y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F conjugado con CRM₁₉₇.

260. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-256, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, en donde los 13 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

261. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-255, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 22F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

262. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-255, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 14, en donde los 14 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

263. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-255, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 15, en donde los 15 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

264. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-263, en donde todos los glucoconjugados de la segunda composición inmunógena se conjugan con la proteína portadora mediante aminación reductora.

265. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

229-264, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende 1 µg a 10 µg de polisacárido de cada serotipo.

266. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-265, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende 10 µg a 150 µg de proteína portadora.

267. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-266, en donde cada dosis de la segunda composición inmunógena comprende alrededor de 15 µg, alrededor de 16 µg, alrededor de 17 µg, alrededor de 18 µg, alrededor de 19 µg, alrededor de 20 µg, alrededor de 21 µg, alrededor de 22 µg, alrededor de 23 µg, alrededor de 24 µg, alrededor de 25 µg, alrededor de 26 µg, alrededor de 27 µg, alrededor de 28 µg, alrededor de 29 µg, alrededor de 30 µg, alrededor de 31 µg, alrededor de 32 µg, alrededor de 33 µg, alrededor de 34 µg, alrededor de 35 µg, alrededor de 36 µg, alrededor de 37 µg, alrededor de 38 µg, alrededor de 39 µg, alrededor de 40 µg, alrededor de 41 µg, alrededor de 42 µg, alrededor de 43 µg, alrededor de 44 µg, alrededor de 45 µg, alrededor de 46 µg, alrededor de 47 µg, alrededor de 48 µg, alrededor de 49 µg o alrededor de 50 µg de proteína portadora.

268. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-267, en donde la segunda composición inmunógena también comprende antígenos de otros patógenos.

269. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-268, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante.

270. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-268, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

271. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-268, en donde la segunda composición inmunógena también comprende fosfato de aluminio como adyuvante.

272. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-268, en donde la segunda composición inmunógena también comprende 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

273. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos

229-268, en donde la segunda composición inmunógena también comprende alrededor de 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante.

274. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-273, en donde la segunda composición inmunógena también comprende un amortiguador.

275. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-274, en donde la segunda composición inmunógena comprende un amortiguador que tiene una pKa de alrededor de 3,5 a alrededor de 7,5.

276. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 274-275, en donde el amortiguador de la segunda composición inmunógena es fosfato, succinato, histidina o citrato.

277. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 274-276, en donde el amortiguador de la segunda composición inmunógena es succinato en una concentración final de alrededor de 5,0 mM.

278. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-277, en donde la segunda composición inmunógena también comprende una sal.

279. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-278, en donde la sal de la segunda composición inmunógena se selecciona del grupo que consiste en cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y una combinación de estos.

280. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-179, en donde la segunda composición inmunógena comprende cloruro de sodio en una concentración final de 150 mM.

281. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-280, en donde la segunda composición inmunógena también comprende un tensioactivo.

282. La composición inmunógena de acuerdo con el párrafo 281, en donde el tensioactivo de la segunda composición inmunógena es polisorbato 80.

283. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 281-282, en donde la concentración final de polisorbato 80 en la segunda composición inmunógena es de 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,1 % (p/p).

284. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 229-283, en donde la segunda composición inmunógena tiene un pH de 5,8 a 6,0.

285. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación es un programa de dosis única.

286. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación es un programa de dosis múltiple.

287. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

288. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses.

289. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

290. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

291. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 6 meses.

292. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

293. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

294. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

295. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 o 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

296. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

297. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en 4 dosis de vacuna administradas a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

298. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 para usar en la vacunación, en donde el programa de vacunación consiste en una primera dosis administrada el Día 0, y una o más dosis de refuerzo administradas en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas.

299. El kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

300. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-284 o el kit de acuerdo con el párrafo 299 para usar en un método de administración simultánea de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

301. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 300, en donde el programa de vacunación de la administración simultánea es de dosis única.

302. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 300, en donde el programa de vacunación de la administración simultánea es un programa de dosis múltiple.

303. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por

un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

304. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

305. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

306. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

307. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

308. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

309. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

310. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

311. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna administradas a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

312. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una primera dosis administrada el Día 0, y una o más dosis de refuerzo administradas en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas, preferentemente, con un intervalo de dosis de 4-8

semanas.

313. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 302, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una primera dosis administrada el Día 0 y una dosis de refuerzo administrada alrededor de 3 meses después.

314. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-284 o el kit de acuerdo con el párrafo 299 para usar en un método de administración concomitante de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

315. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 314, en donde el programa de vacunación de la administración concomitante es de dosis única.

316. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 314, en donde el programa de vacunación de la administración concomitante es un programa de dosis múltiple.

317. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-284 o el kit de acuerdo con el párrafo 299 para usar en un método de administración concurrente de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

318. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 317, en donde el programa de vacunación de la administración concurrente es de dosis única.

319. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 317, en donde el programa de vacunación de la administración concurrente es un programa de dosis múltiple.

320. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

321. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

322. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 315 o 318, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

323. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

324. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis

separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

325. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

326. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

327. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

328. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 4 dosis de vacuna administradas a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

329. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una primera dosis administrada el Día 0, y una o más dosis de refuerzo administradas en intervalos que varían de alrededor de 2 a alrededor de 24 semanas, preferentemente, con un intervalo de dosis de 4-8 semanas.

330. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 316 o 319, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una primera dosis administrada el Día 0 y una dosis de refuerzo administrada alrededor de 3 meses después.

331. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 226-284 o el kit de acuerdo con el párrafo 299 para usar en un método de administración secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas.

332. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 331, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una

serie de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 dosis.

333. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 331 o 332, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2, 3 o 4 dosis.

334. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-333, en donde la primera composición inmunógena se administra en primer lugar, y la segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar.

335. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-333, en donde la segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la primera composición inmunógena se administra en segundo lugar.

336. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-335, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

337. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-335, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

338. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-338, en donde la primera y segunda dosis se administran en el primer año de vida.

339. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-338, en donde la primera dosis se administra en el primer año de vida, y la segunda dosis se administra cuando el niño es pequeño.

340. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 339, en donde la dosis cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida.

341. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 332 o 333, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 3 dosis.

342. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 341, en donde el programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

343. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 341, en donde el programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

344. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-343, en donde la primera y segunda dosis se administran en el primer

año de vida, y la tercera dosis se administra cuando el niño es pequeño.

345. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-344, en donde la primera y segunda dosis están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y la tercera dosis se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

346. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

347. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

348. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

349. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis.

350. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis.

351. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 341-345, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis.

352. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 332 o 333, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 4 dosis.

353. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 352, en donde la primera, segunda y tercera dosis están separadas por un intervalo de

alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego la cuarta dosis se administra alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

354. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con los párrafos 352 o 353, en donde la primera, segunda y tercera dosis están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego la cuarta dosis se administra alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

355. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-354, en donde la primera, segunda y tercera dosis se administran en el primer año de vida, y la cuarta dosis se administra cuando el niño es pequeño.

356. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-355, en donde la primera, segunda y tercera dosis están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre dosis), en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y la cuarta dosis se administra cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

357. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera, segunda y tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

358. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda y tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

359. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

360. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

361. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

362. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

363. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la segunda, tercera y cuarta dosis.

364. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la segunda, tercera y cuarta dosis.

365. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

366. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

367. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

368. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

369. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la primera composición inmunógena se administra como

la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

370. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 352-356, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

371. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-332, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 5 dosis.

372. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 371, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 4 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego una quinta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

373. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 371-372, en donde la primera, segunda, tercera y cuarta dosis se administran en el primer año de vida, y la quinta dosis se administra cuando el niño es pequeño.

374. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 371-372, en donde la primera composición inmunógena (1ª IC) y la segunda composición inmunógena (2ª IC) se administran de acuerdo con cualquiera de los siguientes programas:

Dosis				
1	2	3	4	5
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC

2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC

375. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-332, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 6 dosis.

376. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 375, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 5 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

377. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 375-376, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta dosis se administran en el primer año de vida, y la sexta dosis se administra cuando el niño es pequeño.

378. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 375-377, en donde la primera composición inmunógena y la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas del párrafo 374, y luego una sexta dosis.

379. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 378, en

donde la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la sexta dosis.

380. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 378, en donde la segunda composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la sexta dosis.

381. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-332, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 7 dosis.

382. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 381, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 6 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

383. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 381-382, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta dosis se administran en el primer año de vida, y la séptima dosis se administra cuando el niño es pequeño.

384. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 381-383, en donde la primera composición inmunógena y la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de los párrafos 379 o 380, y luego una séptima dosis.

385. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 384, en donde la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la séptima dosis.

386. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 384, en donde la segunda composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la séptima dosis.

387. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-332, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 8 dosis.

388. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 387, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 7 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

389. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 387-388, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y

séptima dosis se administran en el primer año de vida, y la séptima dosis se administra cuando el niño es pequeño.

390. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 387-389, en donde la primera composición inmunógena y la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de los párrafos 385 o 386, y luego una octava dosis.

391. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 390, en donde la primera composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la octava dosis.

392. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 390, en donde la segunda composición inmunógena de acuerdo con la invención se administra como la octava dosis.

393. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-333, en donde el programa de vacunación consiste en la administración secuencial de:

- (a) la primera composición inmunógena y
- (b) la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena.

394. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones.

395. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 393-395, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

396. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 393-396, en donde la primera composición inmunógena se administra en primer lugar, y la administración concomitante o concurrente se administra en segundo lugar.

397. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 393-396, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en primer lugar, y la primera composición inmunógena se administra en segundo lugar.

398. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 393-398, en donde la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida.

399. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 393-398, en donde la primera administración se administra en el primer año de vida, y la segunda administración se administra cuando el niño es pequeño.

400. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 399, en donde la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida.

401. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 administraciones.

402. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 401, en donde el programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

403. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-402, en donde la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño.

404. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-403, en donde la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración es una administración cuando el niño es pequeño a los 12-18 meses de edad.

405. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-404, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración.

406. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-404, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, y la primera composición inmunógena se administra en la tercera administración.

407. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-404, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, y la primera composición inmunógena se administra en la tercera administración.

408. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los

párrafos 401-404, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración.

409. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-404, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda y tercera administraciones.

410. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 401-404, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, y la primera composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones.

411. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 4 administraciones.

412. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 411, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego la cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

413. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 411, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego la cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

414. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-413, en donde la primera, segunda y tercera administraciones se administran en el primer año de vida, y la cuarta administración se administra cuando el niño es pequeño.

415. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-414, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la cuarta administración es una administración cuando el niño es pequeño a los 12-18 meses de edad.

416. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los

párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

417. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la primera composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

418. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera y cuarta administraciones.

419. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, y la primera composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

420. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración, y la primera composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

421. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, la primera composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

422. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

423. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, y la primera composición inmunógena se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

424. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la

primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, la primera composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

425. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena se administra en la segunda administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración, y la primera composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

426. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, y la primera composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

427. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera y cuarta administraciones.

428. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la primera composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda y tercera administraciones, y la primera composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

429. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 411-415, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la primera composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

430. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 5 administraciones.

431. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 430, en donde el programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego

una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

432. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 430-431, en donde la primera, segunda, tercera y cuarta administraciones se administran en el primer año de vida, y la quinta administración se administra cuando el niño es pequeño.

433. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 430-432, en donde la primera composición inmunógena (1^a IC) y la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena (1^a IC/2^a IC) se administran de acuerdo con cualquiera de los siguientes programas:

Dosis				
1	2	3	4	5
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC

1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

434. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 6 administraciones.

435. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 434, en donde el programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

436. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 434-435, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta administraciones se administran en el primer año de vida, y la sexta administración se administra cuando el niño es pequeño.

437. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 434-436, en donde la primera composición inmunógena y la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de acuerdo con el párrafo 433, y luego una sexta administración.

438. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 437, en donde la primera composición inmunógena se administra como la sexta administración.

439. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 437, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra en la sexta administración.

440. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 7 administraciones.

441. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 440, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

442. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 440-441, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño.

443. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 440-442, en donde la primera composición inmunógena y la administración concomitante de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de acuerdo con los párrafos 438 o 439, y luego una séptima administración.

444. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 443, en donde la primera composición inmunógena se administra como la séptima administración.

445. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 443, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra como la séptima administración.

446. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 393, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 8 administraciones.

447. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 446, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

448. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 446-447, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño.

449. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 446-448, en donde la primera composición inmunógena y la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda

composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de los párrafos 444 o 445, y luego una octava administración.

450. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 449, en donde la primera composición inmunógena se administra como la octava administración.

451. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 449, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra como la octava administración.

452. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-333, en donde el programa de vacunación consiste en la administración secuencial de:

(a) la segunda composición inmunógena y

(b) la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena

453. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 452, en donde el programa es cualquiera de los programas de acuerdo con los párrafos 394-451, en donde la administración de la segunda composición inmunógena de (a) reemplaza la administración de la primera composición inmunógena de (a) en dichos párrafos.

454. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como medicamento.

455. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como vacuna.

456. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar en un método para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto.

457. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar en un método para prevenir una infección, enfermedad o afección bacterianas en un sujeto.

458. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar en un

método para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección neumocócica, mediante la administración de tales composiciones inmunógenas a través de una vía sistémica o mucosa.

459. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 458, en donde las composiciones inmunógenas se administran por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea.

460. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como vacuna, en donde el sujeto que se debe vacunar es un ser humano menor de 1 año de edad.

461. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como vacuna, en donde el sujeto que se debe vacunar es un ser humano menor de 2 años de edad.

462. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como vacuna, en donde el sujeto que se debe vacunar es un adulto humano de 50 años de edad o mayor.

463. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar como vacuna, en donde el sujeto que se debe vacunar es un ser humano inmunodeprimido.

464. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar en un programa de dosis única.

465. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-165 o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 166-225 para usar en un programa de dosis múltiple.

466. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

467. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses.

468. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por

un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis.

469. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.

470. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiple consiste en una serie de 2 o 3 dosis separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, y luego una dosis cuando el niño es pequeño, a los 12-18 meses de vida.

471. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 465, en donde el programa de dosis múltiple consiste en series de 4 dosis de vacuna administradas a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de vida.

472. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 331-333, en donde el programa de vacunación consiste en la administración secuencial de:

(a) la segunda composición inmunógena y

(b) la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena.

473. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones.

474. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 472-473, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 2 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

475. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 472-474, en donde la segunda composición inmunógena se administra en primer lugar, y la administración concomitante o concurrente se administra en segundo lugar.

476. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 472-474, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en primer lugar, y la segunda composición inmunógena se administra en segundo lugar.

477. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 472-476, en donde la primera y segunda administraciones se administran en

el primer año de vida.

478. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 472-476, en donde la primera administración se administra en el primer año de vida, y la segunda administración se administra cuando el niño es pequeño.

479. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 478, en donde la administración cuando el niño es pequeño se administra a los 12-18 meses de vida.

480. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 3 administraciones.

481. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 480, en donde el programa consiste en una serie de 3 administraciones separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 12 meses.

482. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-481, en donde la primera y segunda administraciones se administran en el primer año de vida, y la tercera administración se administra cuando el niño es pequeño.

483. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-482, en donde la primera y segunda administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la tercera administración es una administración cuando el niño es pequeño a los 12-18 meses de edad.

484. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración.

485. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, y la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración.

486. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración.

487. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración.

488. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda y tercera administraciones.

489. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 480-483, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones.

490. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 4 administraciones.

491. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 490, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 4 meses, y luego la cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

492. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 490, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego la cuarta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

493. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-492, en donde la primera, segunda y tercera administraciones se administran en el primer año de vida, y la cuarta administración se administra cuando el niño es pequeño.

494. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-493, en donde la primera, segunda y tercera administraciones están separadas por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses (por ejemplo, 28-56 días entre administraciones), en donde la primera administración se administra a los 2 meses de vida, y la cuarta administración es una administración cuando el niño es pequeño a los 12-18 meses de edad.

495. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

496. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera, segunda y tercera administraciones, y la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

497. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera y cuarta administraciones.

498. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, y la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

499. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera y segunda administraciones, la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

500. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera y segunda administraciones, la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

501. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

502. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la segunda, tercera y cuarta administraciones.

503. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los

párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, la segunda composición inmunógena se administra en la tercera administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

504. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

505. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda administración, y la segunda composición inmunógena se administra en la tercera y cuarta administraciones.

506. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena se administra en la segunda administración, y la administración concomitante o concurrente se administra en la tercera y cuarta administraciones.

507. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la segunda composición inmunógena se administra en la primera administración, la administración concomitante o concurrente se administra en la segunda y tercera administraciones, y la segunda composición inmunógena se administra en la cuarta administración.

508. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 490-494, en donde la administración concomitante o concurrente se administra en la primera administración, la segunda composición inmunógena se administra en la segunda y tercera administraciones, y la administración concomitante o concurrente se administra en la cuarta administración.

509. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 5 administraciones.

510. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 509, en donde el programa consiste en una serie de 4 administraciones, en donde cada dosis

está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 3 meses, y luego una quinta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

511. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 509-510, en donde la primera, segunda, tercera y cuarta administraciones se administran en el primer año de vida, y la quinta administración se administra cuando el niño es pequeño.

512. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 509-511, en donde la segunda composición inmunógena (2^a IC) y la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena (1^a IC/2^a IC) se administran de acuerdo con cualquiera de los siguientes programas:

Dosis				
1	2	3	4	5
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC/2. ^a IC

513. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 6 administraciones.

514. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 513, en donde el programa consiste en una serie de 5 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una sexta administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

515. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 513-514, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta administraciones se administran en el primer año de vida, y la sexta administración se administra cuando el niño es pequeño.

516. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 513-515, en donde la segunda composición inmunógena y la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de acuerdo con el párrafo 512, y luego una sexta administración.

517. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 516, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la sexta administración.

518. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 516, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra en la sexta administración.

519. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en

donde el programa de vacunación consiste en una serie de 7 administraciones.

520. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 519, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 6 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una séptima administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

521. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 519-520, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño.

522. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 519-521, en donde la segunda composición inmunógena y la administración concomitante de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de acuerdo con los párrafos 517 o 518, y luego una séptima administración.

523. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 522, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la séptima administración.

524. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 522, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra como la séptima administración.

525. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 472, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 8 administraciones.

526. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 525, en donde el programa de vacunación consiste en una serie de 7 administraciones, en donde cada administración está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes, y luego una octava administración alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera administración.

527. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 525-526, en donde la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima administraciones se administran en el primer año de vida, y la séptima administración se administra cuando el niño es pequeño.

528. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 525-527, en donde la segunda composición inmunógena y la administración

concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administran de acuerdo con cualquiera de los programas de los párrafos 523 o 524, y luego una octava administración.

529. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 528, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la octava administración.

530. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 528, en donde la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena se administra como la octava administración.

531. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 352, en donde la primera y segunda dosis se administran en el primer año de vida, y la tercera y cuarta dosis se administran cuando el niño es pequeño.

532. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 352, en donde el programa consiste en una serie de 2 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una tercera dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, y una cuarta dosis alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses después de la tercera dosis.

533. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera, segunda y tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

534. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera, segunda y tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

535. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

536. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

537. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

538. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera y segunda dosis, la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

539. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la segunda, tercera y cuarta dosis.

540. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la segunda, tercera y cuarta dosis.

541. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, la primera composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

542. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

543. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

544. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como

la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la tercera y cuarta dosis.

545. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la primera composición inmunógena se administra como la primera dosis, la segunda composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis, y la primera composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

546. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 531-532, en donde la segunda composición inmunógena se administra como la primera dosis, la primera composición inmunógena se administra como la segunda y tercera dosis, y la segunda composición inmunógena se administra como la cuarta dosis.

547. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 371, en donde la primera, segunda y tercera dosis se administran en el primer año de vida, y la cuarta y quinta dosis se administran cuando el niño es pequeño.

548. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con el párrafo 371, en donde el programa consiste en una serie de 3 dosis, en donde cada dosis está separada por un intervalo de alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses, y luego una cuarta dosis alrededor de 10 meses a alrededor de 13 meses después de la primera dosis, y una quinta dosis alrededor de 1 mes a alrededor de 2 meses después de la cuarta dosis.

549. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 547-548, en donde la primera composición inmunógena (1ª IC) y la segunda composición inmunógena (2ª IC) se administran de acuerdo con cualquiera de los siguientes programas:

Dosis				
1	2	3	4	5
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC

2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC

550. La composición inmunógena o el kit de acuerdo con cualquiera de los párrafos 547-548, en donde la primera composición inmunógena (1^a IC) y la segunda composición inmunógena (2^a IC) se administran de acuerdo con cualquiera de los siguientes programas:

Dosis				
1	2	3	4	5
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC
2. ^a IC	2. ^a IC	2. ^a IC	1. ^a IC	2. ^a IC

Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" significa dentro de un

rango de valores significativo en términos estadísticos, tal como un determinado rango de concentración, marco temporal, peso molecular, temperatura o pH. Este rango puede estar en un orden de magnitud, en general, dentro del 20 %, más en general, aun dentro del 10 % y, aun más en general, dentro del 5 % o dentro de 1 % de un valor o rango determinados. En ocasiones, el rango se puede encontrar dentro del error experimental típico de los métodos estándares que se usan para medir y/o determinar un valor o rango determinados. La variación admisible comprendida por la expresión "alrededor de" dependerá del sistema particular que se estudie y podrá ser determinada con facilidad por una persona del oficio de nivel medio. Cuando se indique un rango en la presente solicitud, cada número entero dentro del rango también se contempla como una forma de realización de la descripción.

En la presente, las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende", según son utilizadas por los inventores, se pueden sustituir opcionalmente con las expresiones "que consiste esencialmente en", "consisten esencialmente en", "consiste esencialmente en", "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

Una "cantidad inmunógena", una "cantidad inmunológicamente eficaz", una "cantidad terapéuticamente eficaz", una "cantidad profilácticamente eficaz" o "dosis", cada una de las cuales se usa de manera indistinta en la presente, en general, se refieren a la cantidad de antígeno o composición inmunógena suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, ya sea una respuesta celular (linfocito T) o humoral (linfocito B o anticuerpo), o ambas, como se mide mediante ensayos estándares conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro de la memoria descriptiva de esta patente se incorporan por referencia en la presente.

La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas estándares, que son conocidas y rutinarias para las personas del oficio de nivel medio, excepto cuando se describa de otro modo en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

EJEMPLO

Ejemplo 1. Proceso general para la preparación de glucoconjugado ligado a eTEC

Activación de sacárido y tiolación con diclorhidrato de cistamina

El sacárido se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido

de humedad de la solución se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajustó para alcanzar un contenido de humedad de 0,1 % a 0,4 %, generalmente, de 0,2 %.

Para comenzar la activación, se preparó una solución de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activó con diversas cantidades de CDT/CDI (1 – 10 equivalentes molares), y la reacción continuó durante 1 hora a 23 ± 2 °C. El nivel de activación se pudo determinar mediante HPLC. El diclorhidrato de cistamina se preparó en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. El sacárido activado se hizo reaccionar con 1 equivalente molar (mol. eq.) de diclorhidrato de cistamina. De manera alternativa, el sacárido activado se hizo reaccionar con 1 mol. eq. de clorhidrato de cisteamina. La reacción de tiolación continuó durante 21 ± 2 horas a 23 ± 2 °C, a fin de producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determinó mediante la cantidad agregada de CDT/CDI.

El CDT/CDI residual en la solución de reacción de activación se inactivó mediante la adición de 100 mM de solución de tetraborato de sodio, pH 9,0. Se realizaron cálculos para determinar la cantidad agregada de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final a 1-2 % del contenido acuoso total.

Reducción y purificación de sacárido tiolado activado

La mezcla de reacción de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición de 5 mM de succinato de sodio previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 μ m. La diafiltración del sacárido tiolado se realizó contra un diavolumen de WFI de 40 veces. Se agregó al retentato una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 mol eq., después de la dilución mediante un volumen de 10 % de amortiguador de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0. Esta reacción de reducción continuó durante 20 ± 2 horas a 5 ± 3 °C. La purificación del sacárido tiolado activado se realizó, preferentemente, mediante ultrafiltración/diafiltración de 10 mM de fosfato de sodio monobásico previamente enfriado, pH 4,3. De manera alternativa, el sacárido tiolado se purificó mediante procedimientos de cromatografía de exclusión por tamaño estándar (SEC) o métodos de cromatografía de intercambio iónico. Se retiró una alícuota de retentato de sacárido tiolado activado para determinar los ensayos (Ellman) de la concentración de sacáridos y el contenido de tiol.

Reducción y purificación alternativas de sacárido tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, el sacárido tiolado activado también se purificó como se describe a continuación.

A la mezcla de reacción de sacárido tiolado, se agregó una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 - 10 mol. eq., y continuó durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla de reacción se diluyó luego 5 veces mediante la adición a 5 mM de succinato de sodio previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 μ m. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de 10 mM de fosfato de sodio monobásico, pH 4,3. Se retiró una alícuota de retentato de sacárido tiolado activado para determinar los ensayos (Ellman) de la concentración de sacáridos y el contenido de tiol.

Activación y purificación de proteína portadora bromoacetilada

Se bromoacetilaron grupos amino libres de la proteína portadora mediante la reacción con un agente de bromoacetilación, tal como N-hidroxisuccinimidéster del ácido bromoacético (BAANS), bromoacetilbromuro u otro reactivo adecuado.

La proteína portadora (en fosfato de sodio 0,1 M, pH $8,0 \pm 0,2$) se mantuvo primero a 8 ± 3 °C, a un pH aproximado de 7, antes de la activación. A la solución de proteínas, se agregó el N-hidroxisuccinimidéster del ácido bromoacético (BAANS) como una solución de reserva de dimetilsulfóxido (DMSO) (20 mg/ml) en una relación de 0,25–0,5 BAANS: proteína (p/p). La reacción se mezcló suavemente a 5 ± 3 °C durante 30 – 60 minutos. La proteína bromoacetilada resultante (activada) se purificó, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración usando 10 kDa de membrana MWCO con 10 mM de amortiguador de fosfato (pH 7,0). Después de la purificación, la concentración proteica de la proteína portadora bromoacetilada se calculó mediante el ensayo proteico de Lowry.

El alcance de activación se determinó mediante un ensayo de bromuro total mediante cromatografía de líquidos de intercambio iónico acoplada a la detección de conductividad suprimida (cromatografía iónica). El bromuro unido a la proteína bromoacetilada activada se escindió de la proteína en la preparación de la muestra de ensayo y se cuantificó junto con cualquier bromuro libre que pudiera estar presente. Cualquier bromuro restante ligado de manera covalente a la proteína se liberó mediante conversión en bromuro iónico calentando la muestra en 2-mercaptoetanol alcalino.

Activación y purificación de CRM₁₉₇ bromoacetilada

Se diluyó CRM₁₉₇ hasta obtener 5 mg/ml con 10 mM de NaCl al 0,9 % amortiguado con fosfato, pH 7 (PBS) y luego se preparó NaHCO₃ 0,1 M, pH 7,0, usando solución de reserva 1 M. Se agregó BAANS en una relación CRM₁₉₇ : BAANS de 1 : 0,35 (p:p) usando una solución de reserva BAANS de 20 mg/ml de DMSO. La

mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 3 °C a 11 °C durante 30 min-1 hora, luego se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración usando una membrana MWCO de 10 K y 10 mM de fosfato de sodio/NaCl al 0,9 %, pH 7,0. La CRM₁₉₇ activada purificada se analizó mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración proteica y luego se diluyó con PBS a 5 mg/ml. Se agregó sacarosa a 5 % p/vol como un crioprotector, y la proteína activada se congeló y se almacenó a 25 °C hasta que se necesitó para la conjugación.

La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM₁₉₇ fue muy consistente, lo cual produjo la activación de 15 a 25 lisinas de 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Conjugación de sacárido tiolado activado con proteína portadora bromoacetilada

Antes de comenzar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfriaron previamente a 5 °C. Posteriormente, se agregaron la proteína portadora bromoacetilada y el sacárido tiolado activado y se mezclaron a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación inicial de sacárido/proteína fue de $0,9 \pm 0,1$. El pH de la reacción se ajustó a $8,0 \pm 0,1$ con solución de NaOH 1 M. La reacción de conjugación continuó a 5 °C durante 20 ± 2 horas.

Bloqueo de grupos funcionales reactivos residuales

Los residuos bromoacetilados sin reaccionar en la proteína portadora se inactivaron haciéndolos reaccionar con 2 mol. eq. de N-acetil-L-cisteína como reactivo bloqueante durante 3 horas a 5 °C. Los grupos sulfhidrilo libres residuales se bloquearon con 4 mol. eq. de iodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 °C.

Purificación de glucoconjugado ligado a eTEC

La mezcla de reacción de conjugación (después del bloqueo con IAA) se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La ultrafiltración/diafiltración del glucoconjugado se realizó contra 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 %, pH 6,0. El retentato de glucoconjugado luego se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se retiró una alícuota de glucoconjugado para los ensayos. El glucoconjugado restante se almacenó a 5 °C.

Ejemplo 2. Preparación de conjugados Pn-33F eTEC

Proceso de activación

Activación del polisacárido Pn-33F

El polisacárido Pn-33F se conformó con 500 mM de 1,2,4-triazol (en WFI) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se enfrió de manera rotacional en un baño de hielo seco-etanol y luego se liofilizó hasta secarla. El

polisacárido 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución de 33F/DMSO liofilizada se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó mediante la adición de WFI a la solución de 33F/DMSO, a fin de lograr un contenido de humedad de 0,2 %.

Para comenzar la activación, se preparó 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) como 100 mg/ml en una solución de DMSO. El polisacárido Pn33F se activó con varias cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación de CDT se realizó a 23 ± 2 °C durante 1 h. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se agregó una solución de tetraborato de sodio, 100 mM, pH 9,0, para inactivar cualquier resto de CDT en la solución de reacción de activación. Se realizaron cálculos para determinar la cantidad agregada de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final fuera 1,2 % del contenido acuoso total. La reacción continuó durante 1 h a 23 ± 2 °C.

Tiolación del polisacárido Pn-33F activado

Se preparó diclorhidrato de cistamina en DMSO anhidro, y se agregó 1 mol. eq. de diclorhidrato de cistamina a la solución de reacción del polisacárido activado. La reacción continuó durante 21 ± 3 h a 23 ± 2 °C. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces agregándola a 5 mM de succinato de sodio previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-33F tiolado se realizó con casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 100K, usando agua para la inyección (WFI).

Reducción y purificación del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Al retentato, se agregó una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 mol. eq., después de la dilución mediante 10 % en volumen de amortiguador de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0. Esta reacción de reducción continuó durante 2 ± 1 h a 23 ± 2 °C. La diafiltración del polisacárido 33F tiolado se realizó con casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 100K. La diafiltración se realizó contra 10 mM de fosfato de sodio previamente enfriado, pH 4,3. El retentato del polisacárido 33F tiolado se utilizó para los ensayos de tiol y concentración de sacáridos (Ellman).

Reducción y purificación alternativas del polisacárido Pn-33F tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, el sacárido 33F tiolado activado también se purificó como se describe a continuación.

A la mezcla de reacción de sacárido tiolado, se agregó una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 mol. eq., y continuó durante 3 ± 1 horas a 23 ± 2 °C. La

mezcla de reacción se diluyó luego 5 veces mediante la adición a 5 mM de succinato de sodio previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de 10 mM de fosfato de sodio monobásico, pH 4,3, con casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 100K. El retentato del polisacárido 33F tiolado se utilizó para los ensayos de tiol y concentración de sacáridos (Ellman). En la Figura 8(A), se proporciona un diagrama de flujo del proceso de activación.

Proceso de conjugación

Conjugación del polisacárido Pn33F tiolado con CRM₁₉₇ bromoacetilada

La proteína portadora CRM₁₉₇ se activó por separado mediante bromoacetilación, como se describe en el Ejemplo 1, y luego se hizo reaccionar con el polisacárido Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de reacción se enfrió previamente hasta 5 °C. Se mezclaron CRM₁₉₇ bromoacetilada y polisacárido 33F tiolado en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación inicial de sacárido/proteína fue de $0,9 \pm 0,1$. El pH de reacción se ajustó a 8,0-9,0. La reacción de conjugación continuó a 5 °C durante 20 ± 2 h.

Bloqueo de los grupos reactivos en CRM₁₉₇ bromoacetilada y polisacárido Pn33F tiolado

Los residuos bromoacetilados sin reaccionar en las proteínas CRM₁₉₇ se bloquearon haciéndolos reaccionar con 2 mol. eq. de N-acetil-L-cisteína durante 3 h a 5°C, y luego se bloquearon los grupos de sulfhidrilo libre residuales del polisacárido 33F tiolado con 4 mol. eq. de iodoacetamida (IAA) durante 20 h a 5 °C.

Purificación del glucoconjugado Pn-33F ligado a eTEC

La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se realizó con casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 300K. La diafiltración se realizó contra 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 %, pH 6,0. Luego el retentato del glucoconjugado Pn-33F de 300K se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 5 °C. Un diagrama de flujo del proceso de conjugación se proporciona en la Figura 8(B).

Resultados

Los parámetros de reacción y los datos de caracterización de varios lotes de glucoconjugados Pn-33F eTEC se indican en la Tabla 1. La activación-tiolación de CDT con diclorhidrato de cistamina generó glucoconjugados con un rendimiento de sacáridos de 63 % a 90 % y de <1 % a 13 % de sacáridos libres.

Tabla 1. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados Pn-33F eTEC

Lote de conjugados	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,21	0,13	0,164	0,103	0,183	0,22	0,19
Nivel de activación (% de tiol)	21	13	16,4	10,3	18,3	22	19
Relación (inicial) sacárido/proteína	0,75	1,0	0,75	1,0	1,0	0,75	0,80
Rendimiento del sacárido (%)	69%	63%	71%	63%	69%	82%	90%
Relación sacárido/proteína	1,3	1,7	1,2	1,9	1,6	1,1	1,5
Sacárido libre	12,9%	7,7%	4,4%	7,2%	7,3%	< 4%	< 4 %
MW mediante SEC-MALLS (kDa)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14,4/0	13,4/0	6,8/1,9	2,7/0,6	5,9/0,6	8,2/0	11,4/0,6
%K _d (≤ 0,3)	N/A	85%	88%	75%	68%	67%	76%
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,89	1,16	0,99	0,85	0,81	0,85	1,01

N/A= no disponible

Títulos OPA de los glucoconjugados Pn-33F eTEC con CRM₁₉₇

Los títulos OPA de Pn-33F en ratones se determinaron en condiciones estándares (similares a los procedimientos de OPA descritos a continuación para los conjugados 10A y 22F). Los títulos OPA (GMT con 95 % de CI) a las 4 y 7 semanas se indican en la Tabla 2, lo cual demuestra que el glucoconjugado Pn, serotipo 33F provocó títulos OPA en un modelo de inmunogenicidad murina.

Tabla 2. Títulos OPA de Pn-33F (GMT con 95 % de CI)

Conjugado de 33F Pn	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
---------------------	----------	---------	--------

semana 4	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
semana 7	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

Ejemplo 3. Preparación de conjugados Pn-33F eTEC adicionales

Los conjugados Pn-33F eTEC adicionales se generaron usando el proceso descrito en el Ejemplo 2. Los parámetros de reacción y los datos de caracterización de estos lotes adicionales de glucoconjugados Pn-33F eTEC se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros experimentales y datos de caracterización de otros conjugados Pn-33F eTEC

Lote de conjugados	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,22	0,11	0,11	0,13	0,14	0,13	0,06	0,13	0,11
Relación (inicial) sacárido/proteína	0,75	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Rendimiento del sacárido (%)	78%	88%	89%	67%	69%	86%	81%	91%	88%
Relación sacárido/proteína	1,0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,4	2,2	1,9	1,9
Sacárido libre	< 1%	6,8%	5,9%	2,3 %	3,6%	LOQ	8,2%	3,6%	6,6 %
MW mediante SEC-MALLS (kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/CMC	6,6/ LOQ	14,2/ 2,1	15,4/ 2,1	5,5/ 1	5,4/ 1,1	NA/ LOQ	1,7/ 1,2	4,1/ 2,2	2,2/ 1,2
%K_d (≤ 0,3)	69%	N/A	N/A	N/A	N/A	88%	87%	87%	85%
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,86	0,93	0,87	1,01	0,99	0,71	0,78	0,8	0,82

LOQ=límite de cuantificación ; N/A= no disponible.

Como se mostró anteriormente y en la Tabla 3, se obtuvieron varios conjugados Pn-33F usando la conjugación eTEC anterior. La química eTEC permitió la preparación de conjugados con mayor rendimiento, bajo % de sacárido libre y un alto grado de conjugación (lisinas conjugadas). Adicionalmente, fue posible conservar más del 80 % de la funcionalidad de acetilo usando el proceso de conjugación eTEC.

Ejemplo 4. Evaluación de la estabilidad de glucoconjugados eTEC Tendencias de % de sacárido libre

Se colocaron alícuotas del lote de conjugado 33F-2B (véase la Tabla 1) en tubos de polipropileno y se almacenaron a 4°C, 25°C y 37°C, respectivamente, y se monitorearon para determinar las tendencias en % de sacárido libre. Los datos (% de sacárido libre) se muestran en la Tabla 4. Como se muestra en esta Tabla, no hubo cambios importantes en el % de sacárido libre.

Tabla 4. Estabilidad de % de sacárido libre para el glucoconjugado Pn-33F eTEC a 4 °C, 25 °C y 37 °C

N.º de lote	Sacárido libre (%)						
	Tiempo						
33F-2B	0	1 sem	3 sem	1M	2M	3M	6M
	4 °C						
	7,7	N/A	8,3	N/A	9,7	11,2	13
	25 °C						
	7,7	N/A	10,8	N/A	11,8	N/A	N/A
	37 °C						
	7,7	12,1	N/A	13,4	N/A	N/A	N/A

sem= semana; M=mes ; N/A= no disponible.

La estabilidad acelerada de otro lote de conjugado (lote 33F-3C) también se llevó a cabo a 37°C hasta 1 mes. Como se muestra en la Tabla 5, no hubo un cambio importante en el % de sacárido libre a 37 °C, hasta 1 mes.

Tabla 5. Estabilidad de % de sacárido libre para el glucoconjugado Pn-33F eTEC a 37 °C

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
33F-3C	0	1 día	1 sem	2 sem	1M
	37 °C				
	4,4	5,9	6,4	7,1	7,2

Para confirmar adicionalmente la estabilidad de conjugados eTEC, los lotes de conjugados adicionales (33F-3C y 33F-5E (véase la Tabla 1)) almacenados a 4 °C se

monitorearon hasta aproximadamente un año, para determinar las posibles tendencias en % de sacárido libre. Como se muestra en la Tabla 6, no hubo cambios importantes en los niveles de % de sacárido libre para los conjugados almacenados a 4 °C durante un período extendido de hasta aproximadamente un año.

Tabla 6. Estabilidad de % de sacárido libre para glucoconjugados Pn-33F eTEC a 4°C

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
	0	3M	4M	12M	14M
4 °C					
33F-3C	4,4	N/A	5,3	N/A	7,6
33F-5E	7,3	6,3	N/A	7,4	N/A

M=mes; N/A= no disponible

Se demostró que los conjugados de serotipo 33F generados mediante la química 33F eTEC son estables sin degradación perceptible cuando se monitorearon mediante las tendencias de sacárido libre a distintas temperaturas (tiempo real y acelerado).

Ejemplo 5. Preparación de conjugados de Pn-8 con CRM₁₉₇

Preparación de glucoconjugados de Pn-8 mediante RAC/DMSO

El polisacárido congelado se descongeló y se transfirió al recipiente de reacción. Se agregaron ácido acético 2 M y WFI (agua para inyección) a la solución de polisacárido para lograr una concentración final de polisacárido de alrededor de 2,5 g/l y una concentración final de ácido acético de 0,2 M.

Hidrólisis del polisacárido

El polisacárido nativo se hidrolizó químicamente antes de la activación. La solución de polisacárido diluido se calentó hasta 70 °C, y luego se mantuvo esta temperatura durante 3,5 horas.

Oxidación del polisacárido

La oxidación del polisacárido se inició mediante la adición de solución de periodato de sodio, y la reacción continuó durante 20 h a 23 °C.

Purificación del polisacárido activado

El polisacárido activado se concentró usando casetes de ultrafiltración. La diafiltración se llevó a cabo contra diavolumenes de WFI de 20 veces.

Liofilización

Se formuló un compuesto con polisacárido activado y sacarosa en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Las botellas que contenían el sacárido activado y la sacarosa se congelaron superficialmente en baños de etanol y se liofilizaron.

Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó a 2 mg/ml en DMSO. Se agregó DMSO a CRM₁₉₇ liofilizada para la reconstitución. Se agregó CRM₁₉₇ reconstituida al polisacárido activado reconstituido. La conjugación luego se inició agregando cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 24 horas. La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de bloqueo continuó durante 3 h a 23 °C.

Purificación del conjugado

Luego la solución de conjugado se diluyó en 5 mM de succinato enfriado-solución salina al 0,9 % (pH 6,0), se filtró, se concentró hasta 2 - 4 g/l usando 300K de membranas de celulosa, y una diafiltración de primera etapa se realizó contra 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Una etapa de purificación final se llevó a cabo mediante diafiltración con 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 %, amortiguador de pH 6,0. Después de que se completó la diafiltración, el conjugado purificado se transfirió a un tanque de recolección a través de un filtro de 0,22 µm.

Dilución del volumen de conjugado monovalente

El conjugado se diluyó adicionalmente con 5 mM de succinato / solución salina al 0,9 % (pH 6), en una concentración de sacárido diana de 0,5 mg/ml. La etapa de filtración final de 0,22 µm se completó para preparar el volumen de producto de conjugado monovalente (MBC) para la formulación.

Se obtuvieron varios conjugados usando el proceso descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación inicial sacárido-proteína, la concentración de la reacción y Meq de cianoborohidruro de sodio). La caracterización de glucoconjugados de Pn-8 representativos con CRM₁₉₇ se proporciona en la Tabla 7.

Tabla 7. Caracterización de conjugados Pn8-CRM₁₉₇

Muestra N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MW de sacárido activado mediante MALLS (kDa)	267	270	352	65	233	340	113	250	230
Relación sacárido/proteína	0,81	0,84	0,5	2,7	1,15	1,0	0,81	0,64	0,42

MW mediante SEC-MALLS (kDa)	12200	8670	3460	3379	4748	4255	5470	9924	6787
------------------------------------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados serotipo 8-CRM₁₉₇ en ratones se determinaron en ratones en condiciones estándares (similares a los procedimientos de OPA descritos a continuación para los conjugados 10A y 22F). Los títulos OPA (título de la media geométrica (GMT) con 95 % de intervalo de confianza (CI)) a las cuatros semanas en diferentes dosis se muestran en las Tablas 8 y 9 (dos experimentos diferentes), y demuestran que el conjugado de serotipo 8 (muestras 1-9; véase también la Tabla 7 para los datos de caracterización de estos conjugados) provocó títulos OPA en un modelo murino de inmunogenicidad.

Como se muestra en la Tabla 8, se demostró que los conjugados de serotipo 8 tenían títulos de anticuerpo considerablemente más altos, en comparación con el polisacárido no conjugado de control que tenía títulos de anticuerpo deficientes.

Tabla 8. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 8-CRM₁₉₇

Muestra N.º	GMT de OPA (95 % de CI)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
1	17 (10, 30)	88 (47, 165)	1344 (896, 2016)
2	7 (4, 11)	184 (87, 387)	1934 (1313, 2847)
3	4 (4, 4)	17 (9, 30)	779 (345, 1757)
4	5 (4, 7)	74 (41, 136)	558 (311, 1001)
PS sin conjugar			13 (3, 55)

Tabla 9. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 8-CRM₁₉₇

Muestra N.º	GMT de OPA (95 % de CI)	
	0,001 µg	0,01 µg
5	8 (5, 12)	322 (208, 498)
6	12 (8, 19)	264 (129, 537)
7	12 (7, 21)	521 (366, 743)
8	19 (10, 38)	404 (238, 687)
9	33 (14, 80)	686 (380, 1237)

2	13 (7, 23)	177 (94, 336)
---	------------	---------------

Los datos totales generados de conjugados preparados mediante el proceso de aminación reductora anteriores demostraron que permitieron preparar los conjugados con buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre y buena estabilidad. De manera adicional, los conjugados preparados provocaron buenos títulos OPA en un modelo de inmunogenicidad murina.

Ejemplo 6. Preparación de conjugado polisacárido de serotipo 10A – CRM₁₉₇

Preparación de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 10A aislado

Los polisacáridos capsulares de serotipo 10A se pueden obtener directamente de bacterias mediante procedimientos de aislamiento conocidos por una persona del oficio de nivel medio (véase, por ejemplo, los métodos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses N.^{os} 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, y 2008/0102498 y WO 2008/118752). *Streptococcus pneumoniae* serotipo 10A se cultivó en una botella de siembra y luego se transfirió a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, las células se transfirieron a un fermentador de producción. La fermentación se cultivó y se inactivó agregando N-lauroil sarcosina y se purificó mediante ultrafiltración y diafiltración.

Oxidación de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 10A aislado

Un volumen calculado de amortiguador de fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,0) y agua para inyección (WFI) se agregó a la solución de polisacárido para alcanzar una concentración final de polisacárido de 2,5 g/l y una concentración final de 25 mM de amortiguador de fosfato de potasio, si el pH necesario se ajustó a 6,0, aproximadamente. El polisacárido diluido luego se enfrió hasta 5 °C. La oxidación se inició mediante la adición de 0,25 equivalentes molares (MEq) de solución de periodato de sodio. La reacción de oxidación fue de aproximadamente 4 h a 5 °C. La reacción de oxidación se inactivó con 1 MEq de 2,3-butandiol en agitación continua a 5 °C durante 1-2 h.

Después de alcanzar el tiempo de reacción pretendido, el polisacárido activado se concentró usando casetes de ultrafiltración de 30K MWCO Millipore. La diafiltración luego se llevó a cabo contra un diavolumen de WFI de 20 veces. El polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, entre otros, mediante (i) peso molecular mediante SEC-MALLS y (ii) grado de

oxidación.

Conjugación de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 10A activado con CRM₁₉₇

El proceso de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Formulación de un compuesto con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM₁₉₇;
- c. Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo; y
- d. Purificación del conjugado
 - a. Formulación de un compuesto con sacarosa

Se formuló un compuesto con polisacárido activado y sacarosa en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Luego, la botella de la mezcla de compuesto se liofilizó. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 °C.

- b. Reconstitución de polisacárido activado liofilizado y proteína CRM₁₉₇

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en sulfóxido de dimetilo anhidro (DMSO). Después de la disolución completa del polisacárido, la misma cantidad de DMSO se agregó a la CRM₁₉₇ calculada para la reconstitución.

- c. Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo

La CRM₁₉₇ reconstituida (en DMSO) se agregó al polisacárido activado reconstituido en el reactor de conjugación. La concentración final de polisacárido es 1 g/l. La conjugación se realizó mediante la adición de 1,2 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción. La reacción se incubó a 23 °C durante 24 h. La terminación de la reacción de conjugación se realizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción de bloqueo se incubó a 23 °C durante 3 h.

La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de bloqueo continuó durante 3 h a 23 °C.

- d. Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó luego en 5 x (en volumen) de 5 mM de succinato enfriado-solución salina al 0,9 % (pH 6,0), y una diafiltración 20X se llevó a cabo usando 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Después de que la diafiltración inicial se había completado, el retentato de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22 µm. El conjugado se diluyó adicionalmente con 5 mM de succinato / solución salina al 0,9 % (pH 6), y después de la etapa final de 0,22 µm se almacenó a una temperatura de 2-8 °C.

Se obtuvieron varios conjugados usando el proceso descrito anteriormente

variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación inicial de sacárido-proteína, la concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). La química anterior permitió generar conjugados de serotipo 10A que demostraron ser estables sin una degradación visible, según se monitoreó mediante las tendencias de sacárido libre a distintas temperaturas (tiempo real y aceleradas). La caracterización de glucoconjugados de Pn-10A representativos con CRM₁₉₇ se proporciona en la Tabla 10.

Tabla 10. Caracterización de conjugados Pn-10A-CRM₁₉₇

Conjugado N.º	1	2	3	4	5	6
DO	12,2	19,5	5,2	10,3	10,8	10,5
MW del sacárido activado, kDa	191	240	80	170	170	170
Relación inicial	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1
% de rendimiento	56	28,5	65	82	73	66
% de sacárido libre	6,8	10,0	6,7	6,8	6,4	9,7
MW del conjugado, kDa	3838	5810	4630	4034	3463	5540
Relación sacárido/proteína	0,82	0,88	0,85	1,1	1,2	1,0
Modificación de Lys AAA	7,4	3,7	13,1	6,9	6,7	6,1

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados serotipo 10A-CRM₁₉₇ en ratones se determinaron en condiciones estándares. Se inmunizaron grupos de 30 ratones hembra Swiss Webster de 6-7 semanas de vida con 0,001 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de prueba por vía subcutánea en la semana 0. Los ratones recibieron un refuerzo con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 4.

Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usaron para medir los anticuerpos funcionales en suero murino específicos contra *S. pneumonia* serotipo 10A. El suero de prueba se preparó en reacciones de ensayo que medían la capacidad de la inmunoglobulina específica contra el polisacárido capsular de opsonizar bacterias, estimular el depósito del complemento y, por lo tanto, facilitar la

fagocitosis e inactivar las bacterias por medio de los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El título OPA se interpoló de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en métodos descritos en Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol12(2):287–295 con las siguientes modificaciones. El suero de prueba se diluyó en serie 2,5 veces y se agregó a placas de microtitulación del ensayo. Las cepas bacterianas diana de serotipo 10A vivas se agregaron a las cavidades, y las placas se agitaron a 37 °C durante 30 minutos. Se agregaron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de vida, PEL-FREEZ®, 12,5 % de concentración final) a las cavidades, y las placas se agitaron a 37 °C durante 60 minutos. Para finalizar la reacción, se agregaron 80 µl de NaCl al 0,9 % a las cavidades, se mezclaron, y se transfirió una alícuota de 10 µl a las cavidades de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró líquido a través de las placas al vacío, y se agregaron 150 µl de medio HYSOY® a cada cavidad y se filtraron. Las placas de filtro luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con solución decolorante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Las colonias se sometieron a diagnóstico por imágenes y se enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH). Se usaron recuentos de colonias sin procesar para representar curvas de inactivación y calcular títulos OPA.

Los títulos OPA (título de la media geométrica (GMT) con 95 % de intervalo de confianza (CI)) a las cuatros semanas en diferentes dosis se muestran en la Tabla 11 y demuestran que el conjugado de serotipo 10A (muestras 1-3; véase también la Tabla 10 para los datos de caracterización de estos conjugados) provocó títulos OPA en un modelo murino de inmunogenicidad. Como se muestra en la Tabla 11, se demostró que los conjugados de serotipo 10A son títulos OPA considerablemente más altos, en comparación con el polisacárido no conjugado de control que tenía una respuesta OPA deficiente.

Tabla 11. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 10A-CRM₁₉₇

	GMT de OPA (95 % de CI)		
Muestra N.º	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg

1	858 (556, 1324)	1015 (610, 1691)	4461 (3065, 6494)
2	1411 (737, 2703)	796 (460, 1378)	2873 (1768, 4842)
3	322 (180, 574)	1062 (528, 2135)	2618 (1415, 4842)
PS sin conjugar			602 (193, 1882)

Ejemplo 7. Conjugación de Pn serotipo-12F mediante el uso de TEMPO/NCS

A fin de mejorar la estabilidad de los glucoconjugados serotipo 12F-CRM₁₉₇, se exploraron químicas alternativas mediante el uso del radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante para oxidar alcoholes primarios a grupos aldehído. El análisis GC/MS mostró que los sitios de oxidación fueron diferentes del de la oxidación mediada por periodato. En el caso de la oxidación con TEMPO-NCS, se oxidaron α -D-Glcp y 2-Glcp, mientras que α -D-Galp fue el sitio principal de oxidación cuando se usó periodato (véase la Figura 4). Como se describe con más detalle en la presente, se usó TEMPO en cantidades catalíticas ($\leq 0,1$ equivalentes molares), y el grado deseado de oxidación (DO) se alcanzó variando las cantidades de NCS utilizada. Posteriormente, varios conjugados se sintetizaron y se caracterizaron. En general, la producción de glucoconjugados de serotipo 12F se llevó a cabo en distintas fases, de la siguiente manera:

- Hidrólisis de polisacárido de serotipo 12F a pesos moleculares de 50 kDa a 500 kDa
- Activación del polisacárido de serotipo 12F con TEMPO/NCS;
- Purificación del polisacárido activado;
- Conjugación del serotipo 12F activado con la proteína CRM₁₉₇; y
- Purificación de conjugados de serotipo 12F – CRM₁₉₇.

Hidrólisis y oxidación de serotipo 12F

En general, la hidrólisis del polisacárido se realizó en condiciones ácidas con calentamiento para obtener un peso molecular promedio en el rango deseado de 100 kDa a 350 kDa. A continuación se describe un experimento típico.

Hidrólisis

La solución de polisacárido de serotipo 12F se agregó a un recipiente de reacción encamisado. A esto, se agregó el volumen necesario de ácido acético 0,30 M y agua para inyección (WFI) para mantener una concentración de ácido acético $\sim 0,1$ M. El pH de la solución se ajustó a $3,2 \pm 0,3$ usando NaOH 1 N o ácido acético glacial. La temperatura de la mezcla de reacción aumentó hasta 70 ± 5 °C. La mezcla de reacción se agitó a 70 ± 5 °C durante 90 -120 minutos. La mezcla de reacción se enfrió

hasta 23 ± 2 °C y se neutralizó (pH 7,0) mediante la adición de solución de NaOH 1 M. El polisacárido hidrolizado se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración contra WFI usando membranas de 30K MWCO. La solución se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m y se almacenó a una temperatura de 2 a 8 °C hasta la oxidación. El peso molecular del polisacárido hidrolizado se analizó mediante SEC-MALLS para asegurar que el peso molecular alcanzara el rango pretendido de 100 kDa a 350 kDa.

Oxidación parcial

En un experimento, el polisacárido de serotipo 12F se dimensionó mecánicamente mediante homogeneización de presión usando microfluidizador para reducir el peso molecular hasta aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. El polisacárido dimensionado se agregó a un recipiente de reacción a una concentración de 4,0 mg/ml y se mezcló con amortiguador de bicarbonato/carbonato (amortiguador de NaHCO_3 0,5 M/ Na_2CO_3 0,05 M, pH 8,6) en una relación de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se agregó $\leq 0,1$ equivalente molar de TEMPO. La reacción se inició mediante la adición de 0,6 a 1,0 equivalente mol de NCS. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual el polisacárido activado se purificó mediante diafiltración con WFI, usando una membrana de ultrafiltración de 30K. El polisacárido purificado se recolectó, y el grado de oxidación (DO) se determinó mediante mediciones cuantitativas de aldehído (usando un ensayo de 3-metil-2-benotiazolinona hidrazona (MBTH)) y polisacárido (usando un ensayo de antrona).

En otro experimento, el polisacárido de serotipo 12F se hidrolizó para reducir el peso molecular hasta un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. El polisacárido de serotipo 12F se agregó a un recipiente de reacción y se mezcló con amortiguador de NaHCO_3 0,5 M/ Na_2CO_3 0,05 M (pH 8,6) en una relación de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se agregaron 0,6 a 1,0 equivalentes molares de NCS disueltos en WFI. La activación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,1 equivalentes molares de TEMPO disuelto en WFI. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual el polisacárido activado se purificó mediante diafiltración con WFI, usando una membrana de ultrafiltración de 30K. El polisacárido activado purificado se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m y se almacenó a 4 °C antes de usar.

Las oxidaciones mediadas por TEMPO/NCS también se llevaron a cabo con éxito en amortiguadores de fosfato de sodio de pH 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0. En algunos experimentos de activación, se usó un alcohol primario, tal como n-propanol, para inactivar los reactivos a fin de evitar la sobreoxidación de sacáridos. En otro conjunto

de experimentos, el polisacárido hidrolizado químicamente se sometió directamente a oxidación, sin la etapa de purificación mediante ultrafiltración/diafiltración.

Conjugación de polisacárido de serotipo 12F oxidado

En un experimento, el polisacárido de serotipo 12F oxidado purificado se agregó a un recipiente de reacción, y luego se agregó amortiguador de fosfato de sodio 0,5 M (pH 6,5) hasta obtener una concentración final de amortiguador de 0,1 M. A esta solución, se agregó CRM₁₉₇ previamente liofilizada y se mezcló exhaustivamente a fin de obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1 N. Después de esto, se agregaron 1,5 equivalentes molares de NaCNBH₃. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C) y durante 2,5 días a 37 °C. La mezcla de reacción luego se diluyó con 1X solución salina al 0,9 %, y los grupos aldehído sin reaccionar se “bloquearon” con 2 equivalentes molares de borohidruro de sodio. La reacción de bloqueo duró 3 horas.

En otro experimento, el serotipo 12F activado purificado se agregó a un recipiente de reacción, y luego se agregó amortiguador de fosfato de sodio 0,5 M (pH 6,5) hasta obtener una concentración final de amortiguador de 0,1 M. A esta solución, se agregó CRM₁₉₇ previamente liofilizada y se mezcló exhaustivamente para obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1 N. Después de esto, se agregaron 3 equivalentes molares de NaCNBH₃. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a 23 °C y durante 48 h a 37 °C. La mezcla de reacción luego se diluyó con 1X solución salina al 0,9 % mientras se agitaba, y los grupos aldehído sin reaccionar se “bloquearon” con 1 equivalente molar de borohidruro de sodio NaBH₄. La reacción de bloqueo duró 3 horas.

En otro experimento, el serotipo 12F activado purificado se agregó a un recipiente de reacción y se mezcló con solución de CRM₁₉₇. La mezcla se liofilizó, y el polvo se disolvió en amortiguador de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8) hasta obtener una concentración final de sacárido de 5 mg/ml. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1N. Después de esto, se agregaron 3 equivalentes molares de NaCNBH₃. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a 23 °C y durante 48 h a 37 °C. La mezcla de reacción luego se diluyó con 1X solución salina al 0,9 %, y los grupos aldehído sin reaccionar se “bloquearon” con 1 equivalente molar de borohidruro de sodio NaBH₄. La reacción de bloqueo duró 3 horas.

Purificación del conjugado

La mezcla de reacción bloqueada se filtró usando un filtro de 5 µm y luego se purificó usando membranas de ultrafiltración de 100K MWCO. Primero, el conjugado se sometió a diafiltración usando 10 mM de amortiguador de succinato/solución salina al 0,9 %, pH 6,0. El conjugado purificado luego se filtró a través de filtros de 0,45/0,22 µm para obtener el volumen de conjugado.

Grado de oxidación

El éxito en la oxidación de alcoholes primarios en el polisacárido de serotipo 12F se alcanzó usando el sistema TEMPO/NCS. Los polisacáridos de serotipo 12F hidrolizados se oxidaron a distintos grados de niveles de oxidación (DO) ajustando la cantidad de cooxidante NCS. El efecto sobre DO al variar las cantidades de NCS usando diferentes lotes de polisacárido y pesos moleculares se muestra en la Figura 9. Generalmente, la reacción de oxidación se completa en 2 horas, ya que no se observó un cambio considerable en los DO después de 2 horas.

Distintos conjugados de serotipo 12F se generaron y se caracterizaron usando el polisacárido oxidado TEMPO/NCS. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Conjugados neumocócicos serotipo 12F-CRM₁₉₇

Lote de conjugados	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Tiempo de oxidación (h)	2	2	4	2	2	2
Grado de oxidación (DO)	12,0	6,0	9,6	12,0	11,5	11,5
% de rendimiento de sacárido activado	80	71	70	89	86	86
MW de sacárido activado mediante MALLS (kDa)	137	155	170	190	240	240
Proceso de conjugación	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
Resultados de conjugado						
Rendimiento del sacárido (%)	51,6	76,8	53,6	76,3	65,8	40,7
Relación sacárido/proteína	1,2	0,9	1,0	1,1	1,4	0,9
% de sacárido libre	24	10	17	20	23	14
MW mediante SEC-MALLS	2050	3000	3600	1500	2400	2100

(kDa)						
-------	--	--	--	--	--	--

Ejemplo 8. Inmunogenicidad de conjugados Pn, serotipo 12F-CRM₁₉₇ mediante el uso del método de oxidación con TEMPO/NCS

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados serotipo 12F-CRM₁₉₇ en ratones se determinaron en ratones en condiciones estándares. Los títulos OPA (media del título geométrico (GMT) con intervalo de confianza de 95 % (CI)) a las cuatro y siete semanas se muestran en la Tabla 13, lo que demuestra que el conjugado serotipo 12F-CRM₁₉₇ (Lote 12F-97B; véase también la Tabla 12 para consultar los datos de caracterización de este conjugado) provocó títulos OPA en un modelo de inmunogenicidad murino. El conjugado generado por TEMPO-NCS fue más inmunógeno que el conjugado de control (171B) generado de la oxidación de periodato.

Tabla 13. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 12F-CRM₁₉₇

Muestra de conjugado/Dosis	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
Control de oxidación de periodato (171B)	4	16	172
Oxidación con TEMPO/NCS (12F-97B)	40	417	880

Ejemplo 9. Evaluación de estabilidad de glucoconjugados Pn-12F

La comparación de la estabilidad (a 25 °C) de los conjugados generados por oxidación de periodato en comparación con la oxidación con TEMPO/NCS (véase la Figura 10) demostró que el conjugado generado por la oxidación de los polisacáridos Pn-12F fue relativamente más estable. Como se muestra en la Figura 10, se observó, con el tiempo, un aumento en el sacárido libre para el glucoconjugado generado por la oxidación de periodato del polisacárido Pn-12F a 25 °C. Por lo contrario, el glucoconjugado preparado usando oxidación de TEMPO/NCS del polisacárido Pn-12F no mostró tendencias considerables para el sacárido libre en condiciones similares.

Ejemplo 10. Preparación de conjugado polisacárido de serotipo 15B – CRM₁₉₇

Preparación de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 15B aislado

Los polisacáridos capsulares de serotipo 15B se pueden obtener directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por las personas del oficio de nivel medio. El *S. pneumoniae* serotipo 15B se cultivó en una botella de siembra y luego se transfirió a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad

óptica diana, las células se transfirieron a un fermentador de producción. La fermentación se cultivó y se inactivó agregando N-lauroil sarcosina y se purificó mediante ultrafiltración y diafiltración.

El polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 15B purificado se dimensionó luego mediante homogeneización de alta presión usando un homogeneizador PANDA 2K® (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) para producir el polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 15B aislado.

Preferentemente, el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B aislado obtenido mediante el proceso anterior comprende, al menos, 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B y tiene un peso molecular de 50 kDa a 500 kDa, preferentemente, de 150 kDa a 350 kDa.

Oxidación de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 15B aislado

La oxidación del polisacárido se realizó en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) mediante la adición secuencial de la cantidad calculada de 500 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) y WFI para obtener la concentración de polisacárido final de 2,0 g/l. Si se requiere, el pH de reacción se ajustó a pH 6,0, aproximadamente. Después del ajuste de pH, la temperatura de reacción se ajustó a 23°C. La oxidación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,25 equivalentes molares de periodato de sodio. La reacción de oxidación se realizó a 23 °C durante 16 h, aproximadamente.

La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo usando casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 10K. La diafiltración se llevó a cabo contra diavolumenes de WFI de 20 veces. El polisacárido activado purificado luego se almacenó a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, *inter alia*, mediante (i) concentración de sacárido mediante ensayo colorimétrico; (ii) concentración de aldehído mediante ensayo colorimétrico; (iii) grado de oxidación; (iv) peso molecular mediante SEC-MALLS y (v) presencia de O-acetil y glicerol.

SEC-MALLS se usó para la determinación del peso molecular de polisacáridos y conjugados polisacárido-proteína. SEC se usó para separar los polisacáridos por volumen hidrodinámico. Los detectores de índice refractario (RI) y dispersión de luz láser multiángulo (MALLS) se usaron para la determinación del peso molecular. Cuando la luz interactúa con la materia, se dispersa, y la cantidad de luz dispersada se relaciona con la concentración, el cuadrado de dn/dc (los incrementos específicos del índice refractario) y la masa molar de la materia. La medición del peso molecular se

calculó en función de las lecturas de la señal de luz dispersada del detector de MALLS y la señal de concentración del detector de RI.

El grado de oxidación (DO = moles de unidades de repetición de azúcar / moles de aldehído) del polisacárido activado se determinó de la siguiente manera:

Los moles de la unidad de repetición de azúcar se determinaron mediante diversos métodos colorimétricos, por ejemplo, mediante el método de antrona. El polisacárido primero se descompone en monosacáridos mediante la acción del ácido sulfúrico y el calor. El reactivo antrona reacciona con las hexosas para formar un complejo de color amarillo-verde cuya absorbancia se leyó espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del rango del ensayo, la absorbancia fue directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente.

Los moles de aldehído también se determinaron simultáneamente, usando el método colorimétrico de MBTH. El ensayo de MBTH incluye la formación de un compuesto de azina haciendo reaccionar grupos aldehído (de una muestra determinada) con una 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona (reactivo del ensayo de MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona se oxidó para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina se hicieron reaccionar para formar un cromóforo azul. El cromóforo formado luego se leyó espectroscópicamente a 650 nm.

Preferentemente, el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B activado obtenido mediante el proceso anterior comprende, al menos, 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B y tiene un peso molecular de 50 kDa a 500 kDa, preferentemente, de 150 kDa a 350 kDa.

Conjugación de polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B activado con CRM₁₉₇

El proceso de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a) Formulación de un compuesto con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b) Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y CRM₁₉₇;
- c) Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo; y
- d) Purificación del conjugado

- a) Formulación de un compuesto con excipiente de sacarosa, y liofilización

Se formuló un compuesto con polisacárido activado y sacarosa en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Luego, la botella de la mezcla de compuesto se liofilizó. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20°C. La cantidad calculada de proteína CRM₁₉₇ se congeló superficialmente y se liofilizó por separado. La CRM₁₉₇

liofilizada se almacenó a -20°C.

b) Reconstitución de polisacárido activado liofilizado y proteína CRM₁₉₇

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en sulfóxido de dimetilo anhidro (DMSO). Después de la disolución completa del polisacárido, una cantidad igual de DMSO anhidro se agregó a CRM₁₉₇ liofilizada para la reconstitución.

c) Conjugación y bloqueo

El polisacárido activado reconstituido se combinó con la CRM₁₉₇ reconstituida en el recipiente de reacción (relación inicial: 0.8:1), y luego se mezcló exhaustivamente para obtener una solución transparente antes de iniciar la conjugación con cianoborohidruro de sodio. La concentración de polisacárido final en la solución de reacción fue de aproximadamente 1 g/l. La conjugación se inició agregando 1,0 – 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 40-48 h. La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio (NaBH₄) para bloquear aldehídos sin reaccionar. Esta reacción de bloqueo continuó a 23 °C durante 3 h

d) Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó 1:10 con 5 mM de succinato enfriado-solución salina al 0,9 % (pH 6,0) en la preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial usando membranas MWCO de 100-300K. La solución de conjugado diluida se hizo pasar a través de un filtro de 5 µm, y la diafiltración se llevó a cabo usando 5 mM de succinato-solución salina al 0,9 % (pH 6,0) como medio. Después de que la diafiltración se había completado, el retentato de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22 µm.

El conjugado se diluyó adicionalmente con 5 mM de succinato / solución salina al 0,9 % (pH 6), en una concentración de sacárido diana de aproximadamente 0,5 mg/ml. La etapa de filtración final de 0,22 µm se completó para obtener el glucoconjugado.

Preferentemente, el conjugado obtenido mediante el proceso anterior comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular de serotipo 15B, tiene un peso molecular de 3000 kDa a 20.000 kDa y tiene un grado de conjugación de 2 a 6.

Ejemplo 11. Caracterización de glucoconjugado que comprende polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B ligado de manera covalente a una CRM₁₉₇

El conjugado 1 se preparó mediante el proceso del Ejemplo 10. Los conjugados

2 y 3 se prepararon mediante un proceso similar usando diferentes cantidades de agente oxidante. El conjugado 4 se preparó mediante un proceso similar, excepto porque el polisacárido capsular de serotipo 15B purificado no se dimensionó y se activó hasta un nivel de DO más bajo (nivel de oxidación más alto), y la conjugación se realizó en un medio acuoso. El conjugado 5 se preparó mediante un proceso similar, excepto porque el polisacárido capsular de serotipo 15B purificado se dimensionó mediante hidrólisis química, y la conjugación se realizó en un medio acuoso. Los conjugados 6 y 7 se prepararon mediante un proceso similar, excepto porque el polisacárido capsular de serotipo 15B purificado no se dimensionó.

Los conjugados obtenidos se caracterizaron, y los resultados se resumieron en la Tabla 14.

Tabla 14. Conjugados polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 15B-CRM₁₉₇

Conjugado	1	2	3	4	5	6	7
Polisacárido	Dimen- sionado	Dimen- sionado	Dimen- sionado	Nativo	Hidrolizado	Nativo	Nativo
O-acetilo; polisacárido activado (μmol de acetato/μmol de poli)	0,69	0,69	0,69	1,01	0,66	0,76	N/A
Medio solvente	DMSO	DMSO	DMSO	Acuoso	Acuoso	DMSO	DMSO
DO del polisacárido activado	11,4	5,8	9,7	4,8	8,8	5	12
MW del polisacárido activado	196 KDa	218 KDa	235 KDa	435 KDa	270 KDa	431 KDa	460 KDa
Rendimiento (%)	87,2	64	63,7	96,2	78,8	24,2	26,2
Relación sacárido/proteína	0,68	0,65	0,71	1,22	1,29	0,9	1,5
Sacárido libre (%)	< 5	< 5	6,1	18,1	14,2	8,8	18
MW del conjugado, SEC- MALLS (kDa)	6190	7090	7937	1766	1029	6293	4466
O-acetilación, conjugado (μmol de acetato/μmol de poli)	0,68	0,7	0,68	0,61	0,44	0,85	N/A
< 0,3 K _d (%), SEC	N/A	73	N/A	N/A	62	N/A	N/A
Grado de conj. (AAA); Lys modificada	3,7	3,9	4,1	N/A	3,4	N/A	N/A
% de O-acetilo retenido en conjugado	99%	100%	99,5%	60%	67%	100%	N/A

N/A= no disponible

El porcentaje de polisacárido libre se midió mediante un procedimiento que utiliza gel de hidróxido de aluminio para fijar la proteína y el sacárido unido de manera

covalente para la eliminación mediante centrifugación. Las muestras se mezclaron con gel de hidróxido de aluminio amortiguado con fosfato y se centrifugaron. El sacárido unido se convirtió en pelets con el gel, y el sacárido libre permaneció en el sobrenadante. El sobrenadante resultante y las muestras de control se cuantificaron mediante los ensayos colorimétricos adecuados para determinar el porcentaje de sacárido libre y confirmar la eliminación de proteína y la recuperación de sacárido suficientes.

Para el análisis de aminoácidos, la muestra de polisacárido-proteína se hidrolizó primero en sus componentes individuales como aminoácidos libres, usando hidrólisis de ácido clorhídrico (HCl) 6 N en condiciones de vacío y calor (160 °C durante 15 minutos). Después de la hidrólisis, las muestras se analizaron usando un analizador de aminoácidos. Cada aminoácido se separó a través de una cromatografía de intercambio de iones usando un gradiente por pasos de amortiguador de citrato de sodio con cambios de temperatura y de velocidad de flujo. Después de la separación, la cantidad de cada residuo de aminoácido se determinó cuantitativamente usando un sistema de detección de acoplamiento de ninhidrina poscolumna. En este sistema, la ninhidrina se mezcló con el eluato de la columna en el sistema de reactor poscolumna, y la mezcla se pasó al fotómetro. La reacción de ninhidrina con los aminoácidos eluidos produjo un compuesto púrpura que se absorbió de manera óptima a 570 nm. Esta absorbancia es una respuesta lineal (función) de la cantidad de grupos α -amino presentes, y esta reacción proporcionó un ensayo colorimétrico cuantitativo para todos los compuestos orgánicos con grupos α -amino. En la reacción con iminoácidos, tales como prolina e hidroxilprolina, que no tienen un grupo amino libre, se generó un compuesto amarillo brillante y se monitoreó a 440 nm. Las áreas pico para cada aminoácido se calcularon usando resultados de longitud de onda de 570 nm y 440 nm.

El rendimiento se calculó de la siguiente manera: (Cantidad de polisacárido en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado.

Los conjugados (4 y 5) generados mediante el uso de un medio acuoso demostraron una disminución considerable de los niveles de O-acetilo. Los conjugados generados en solvente DMSO, mediante el uso de polisacárido nativo sin dimensionamiento MW (6 y 7) no demostraron una disminución en los niveles de O-acetilo. Sin embargo, los rendimientos de conjugado, al igual que las características de filtrabilidad, fueron muy deficientes. Los conjugados generados en DMSO mediante el uso de polisacáridos que se dimensionaron mediante homogeneización de alta presión (1, 2 y 3) tuvieron alto rendimiento y mejores características de filtrabilidad con

conservación considerable de los niveles de O-acetilo. Estos conjugados también tuvieron niveles muy bajos de polisacáridos libres.

Ejemplo 12. Ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA) mediante el uso de conjugados Pn, serotipo 15B-CRM₁₉₇

La inmunogenicidad de los conjugados de *S. pneumoniae* serotipo 15B de la invención se puede evaluar usando el ensayo OPA que se describe más adelante.

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de vida con 0,001 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de prueba por vía subcutánea en la semana 0. Los ratones recibieron un refuerzo con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 4.

Los OPA se usan para medir anticuerpos funcionales en suero murino específicos contra *S. pneumoniae* serotipo 15B. El suero de prueba se preparó en reacciones de ensayo que medían la capacidad de la inmunoglobulina específica contra el polisacárido capsular de opsonizar bacterias, estimular el depósito del complemento y, por lo tanto, facilitar la fagocitosis e inactivar las bacterias por medio de los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El título OPA se interpoló de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en métodos descritos en Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol12(2):287–295 con las siguientes modificaciones. El suero de prueba se diluyó en serie 2,5 veces y se agregó a placas de microtitulación del ensayo. Las bacterias diana de serotipo 15B vivas se agregaron a las cavidades, y las placas se agitaron a 37°C durante 30 minutos. Se agregaron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de vida, PEL-FREEZ®, 6,25% de concentración final) a las cavidades, y las placas se agitaron a 37 °C durante 45 minutos. Para finalizar la reacción, se agregaron 80 µl de NaCl al 0,9 % a las cavidades, se mezclaron, y se transfirió una alícuota de 10 µl a las cavidades de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró líquido a través de las placas al vacío, y se agregaron 150 µl de medio HYSOY® a cada cavidad y se filtraron. Las placas de filtro luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con solución decolorante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Las colonias se sometieron a diagnóstico por imágenes y se

enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH). Se usaron recuentos de colonias sin procesar para representar curvas de inactivación y calcular títulos OPA.

La inmunogenicidad de los conjugados 1 y 2 se evaluó de acuerdo con el ensayo mencionado anteriormente. También se evaluaron en el mismo ensayo un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B nativo conjugado adicional y uno no conjugado (PS no conjugado):

El conjugado 9 se preparó mediante la conjugación de un polisacárido capsular de serotipo 15B nativo (es decir, no dimensionado) con CRM₁₉₇ mediante aminación reductora en solución acuosa.

Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Títulos OPA de pruebas en animales mediante el uso de conjugados serotipo 15B-CRM₁₉₇

	GMT de OPA (95 % de CI)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
Conjugado 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
Conjugado 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
Conjugado 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
PS sin conjugar	-	-	698 (466, 1045)

Como se mostró anteriormente en la Tabla 15, los conjugados 1 y 2, cuando se administraron a ratones, generaron anticuerpos capaces de opsonizar *S. pneumoniae* serotipo 15B, desencadenar el depósito del complemento, y así facilitar la fagocitosis e inactivar las bacterias mediante fagocitos. Además, a pesar de su peso molecular más bajo, también exhiben un nivel similar de inmunogenicidad en comparación con el conjugado 9, que no se dimensionó.

Ejemplo 13. Preparación de conjugado polisacárido de serotipo 22F – CRM₁₉₇

Preparación de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 22F aislado

El *S. pneumoniae* serotipo 22F se cultivó en una botella de siembra y luego se transfirió a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, las células se transfirieron a un fermentador de producción. La fermentación se cultivó y se inactivó agregando N-lauroil sarcosina y se purificó mediante ultrafiltración y diafiltración.

El polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 22F purificado se dimensionó mediante homogeneización de alta presión usando un homogeneizador PANDA 2K® (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) para producir el polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 22F aislado.

Oxidación de polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 22F aislado

La oxidación del polisacárido se realizó en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 5,8) obtenido mediante la adición secuencial de la cantidad calculada de 500 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 5,8) y WFI para obtener la concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. Si se requiere, el pH de reacción se ajustó a 5,8, aproximadamente. Después del ajuste de pH, la temperatura de reacción se redujo a 5°C. La oxidación se inició mediante la adición de 0,10 equivalentes molares (MEq) de periodato de sodio. El tiempo de reacción de oxidación diana es de

16 h a 5 °C.

La reacción de oxidación se inactivó con 2 MEq de 2,3-butandiol en agitación continua a 5 °C durante 1-2 h.

La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo usando casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 100K. La diafiltración se llevó a cabo contra diavolumen de WFI de 35 veces. El polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, entre otros, por (i) peso molecular mediante SEC-MALLS (ii) presencia de O-acetilo y (iii) grado de oxidación.

SEC-MALLS se usó para la determinación del peso molecular de polisacáridos y conjugados polisacárido-proteína. SEC se usó para separar los polisacáridos por volumen hidrodinámico. Los detectores de índice refractario (RI) y dispersión de luz láser multiángulo (MALLS) se usaron para la determinación del peso molecular. Cuando la luz interactúa con la materia, se dispersa, y la cantidad de luz dispersada se relaciona con la concentración, el cuadrado de dn/dc (los incrementos específicos del índice refractario) y la masa molar de la materia. La medición del peso molecular se calculó en función de las lecturas de la señal de luz dispersada del detector de MALLS y la señal de concentración del detector de RI.

El grado de oxidación (DO = moles de unidades de repetición de azúcar / moles de aldehído) del polisacárido activado se determinó de la siguiente manera:

Los moles de la unidad de repetición de azúcar se determinaron mediante diversos métodos colorimétricos, por ejemplo, mediante el método de antrona. El polisacárido primero se descompuso en monosacáridos mediante la acción del ácido sulfúrico y el calor. El reactivo antrona reaccionó con las hexosas para formar un complejo de color amarillo-verde cuya absorbancia se leyó espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del rango del ensayo, la absorbancia fue directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente.

Los moles de aldehído también se determinaron simultáneamente, usando el método colorimétrico de MBTH. El ensayo de MBTH incluye la formación de un compuesto de azina haciendo reaccionar grupos aldehído (de una muestra determinada) con una 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona (reactivo del ensayo de MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona se oxidó para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina se hicieron reaccionar para formar un cromóforo azul. El cromóforo formado luego se leyó espectroscópicamente a 650 nm.

Conjugación de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 22F activado con

CRM₁₉₇

El proceso de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Formulación de un compuesto con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM₁₉₇;
- c. Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo; y
- d. Purificación del conjugado
 - a. Formulación de un compuesto con sacarosa y liofilización

Se formuló un compuesto con polisacárido activado y sacarosa (50 % p/v en WFI) en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Luego, la botella de la mezcla de compuesto se liofilizó. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 °C. La cantidad calculada de proteína CRM₁₉₇ (relación inicial S/P diana = 1) se congeló superficialmente y se liofilizó por separado. La CRM₁₉₇ liofilizada se almacenó a -20 °C.

- b. Reconstitución de polisacárido activado liofilizado y proteína CRM₁₉₇

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en sulfóxido de dimetilo anhidro (DMSO). Después de la disolución completa del polisacárido, una cantidad igual de DMSO anhidro se agregó a CRM₁₉₇ liofilizada para la reconstitución.

- c. Conjugación de polisacárido activado con CRM₁₉₇ y bloqueo

La CRM₁₉₇ reconstituida (en DMSO) se combinó en el recipiente de reacción de conjugación con el polisacárido activado reconstituido. La concentración final de polisacárido en la solución de reacción fue de 1 g/l. La conjugación se inició agregando 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción, y la reacción se incubó a 23 °C durante 20 h. La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción de bloqueo se incubó a 23 °C durante 3 h.

- d. Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó 1:5 con 5 mM de succinato enfriado-0,9 % de solución salina (pH 6,0) en la preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial usando membranas MWCO de 100K, y se realizó una diafiltración 20X usando 5 mM de succinato-0,9 % de solución salina (pH 6,0) como medio. Después de que la diafiltración se completó, el retentato de conjugado también se diluyó, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 2-8 °C.

Se obtuvieron varios conjugados usando el proceso descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación inicial sacárido-proteína, la concentración de la reacción y Meq de cianoborohidruro de sodio). La caracterización

de glucoconjugados de Pn-22F representativos con CRM₁₉₇ se proporciona en la Tabla 16

Tabla 16. Conjugados neumocócicos serotipo 22F-CRM₁₉₇

Lote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Grado de oxidación (D.O)	12,6	19,5	17,2	14,0	12,4	14,9	11,1	14,6	14,4	13,7
MW de sacárido activado mediante MALLS (kDa)	540	697	864	92	866	631	614	639	709	416
Resultados de conjugado										
Relación sacárido/proteína	0,75	0,87	2	0,8	0,8	0,4	1,9	0,8	0,65	1,0
O-Ac (%)	105	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% de sacárido libre	<5	2	15,5	35	<5	<5	33	<5	<5	8
MW mediante SEC-MALLS (kDa)	2787	1668	2194	1419	5039	10450	1577	3911	3734	4453

N/A= no disponible

El % de nivel de O-acetilo (conservado) en el conjugado final se calculó de la relación del contenido de O-acetilo del conjugado (μmol de O-acetilo por μmol de la unidad de repetición de sacárido de serotipo 22F) con respecto al contenido de O-acetilo del polisacárido (μmol de O-acetilo por μmol de la unidad de repetición de sacárido de serotipo 22F).

La inmunogenicidad de los conjugados obtenidos anteriormente se evaluó usando el ensayo opsonofagocítico (OPA) descrito más adelante.

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de vida con 0,001 μg , 0,005 μg o 0,01 μg de conjugados de prueba por vía subcutánea en la semana 0. Los ratones recibieron un refuerzo con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 4.

Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usaron para medir los anticuerpos funcionales en suero murino específicos contra *S. pneumonia* serotipo

22F. El suero de prueba se preparó en reacciones de ensayo que medían la capacidad de la inmunoglobulina específica contra el polisacárido capsular de opsonizar bacterias, estimular el depósito del complemento y, por lo tanto, facilitar la fagocitosis e inactivar las bacterias por medio de los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El título OPA se interpoló de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en métodos descritos en Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol12(2):287–295 con las siguientes modificaciones. El suero de prueba se diluyó en serie 2,5 veces y se agregó a placas de microtitulación del ensayo. Las cepas bacterianas diana de serotipo 22F vivas se agregaron a las cavidades, y las placas se agitaron a 25 °C durante 30 minutos. Se agregaron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de vida, PEL-FREEZ®, 12,5 % de concentración final) a las cavidades, y las placas se agitaron a 37 °C durante 45 minutos. Para finalizar la reacción, se agregaron 80 µl de NaCl al 0,9 % a las cavidades, se mezclaron, y se transfirió una alícuota de 10 µl a las cavidades de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró líquido a través de las placas al vacío, y se agregaron 150 µl de medio HYSOY® a cada cavidad y se filtraron. Las placas de filtro luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con solución decolorante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Las colonias se sometieron a diagnóstico por imágenes y se enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH). Se usaron recuentos de colonias sin procesar para representar curvas de inactivación y calcular títulos OPA.

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados serotipo 22F-CRM₁₉₇ se determinaron como se mencionó anteriormente. Los títulos OPA (título de la media geométrica (GMT) con 95 % de intervalo de confianza (CI)) a las cuatros semanas en diferentes dosis se muestran en las Tablas 17 y 18, (dos experimentos diferentes) y demuestran que el conjugado de serotipo 22F (lotes 1-7; véase también la Tabla 16 para los datos de caracterización de estos conjugados) provocó títulos OPA en un modelo murino de inmunogenicidad.

Tabla 17. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 22F-CRM₁₉₇

	GMT de OPA (95 % de CI)
--	--------------------------------

Muestra N.º	0,001 µg	0,005 µg	0,01 µg
1	86 (45, 165)	597 (285, 1252)	2519 (1409, 4504)
2	98 (51, 191)	782 (410, 1492)	2236 (1319, 3790)
3	35 (18, 69)	250 (122, 512)	509 (273, 950)

Tabla 18. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 22F-CRM₁₉₇

	GMT de OPA (95 % de CI)	
Muestra N.º	0,001 µg	0,01 µg
4	37 (18, 76)	3383 (1911, 5987)
5	45 (20, 103)	1773 (1072, 2931)
6	235 (108, 513)	4335 (3018, 6226)
7	10 (7, 13)	252 (138, 457)

Ejemplo 14. Preparación de conjugados de Pn-11A con CRM₁₉₇

Preparación de glucoconjugados de Pn-11A mediante RAC

El polisacárido dimensionado congelado almacenado en agua desionizada o 25 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) se descongeló a 5 °C.

Oxidación del polisacárido

La oxidación del polisacárido se realizó en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) mediante la adición de 500 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) y WFI para obtener la concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. La reacción de oxidación se realizó a 23 °C. La oxidación se inició mediante la adición de periodato de sodio. La velocidad de agitación varió de 100 - 140 rpm.

Purificación del polisacárido de 11A activado

La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo usando casetes de ultrafiltración. La diafiltración se llevó a cabo contra diavolumenes de WFI de 20 veces. Después de una filtración de 0,22 µm, el polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C.

Descripción del proceso de conjugación

El proceso de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Congelación superficial y liofilización de la proteína CRM₁₉₇;
- b. Reconstitución del polisacárido activado y CRM₁₉₇;
- c. Conjugación del polisacárido activado con CRM₁₉₇, y
- d. Purificación y dilución del conjugado
 - a. Congelación superficial y liofilización de la proteína CRM₁₉₇

La proteína CRM₁₉₇ se congeló superficialmente y se liofilizó.

b. Reconstitución del polisacárido activado y la proteína CRM₁₉₇

La solución de polisacárido activado (~10 g/l) se cargó en un reactor, y luego se agregó una cantidad calculada de amortiguador de fosfato de sodio 0,5 N (pH 7,2). Mientras se agitaba, se agregó CRM₁₉₇ liofilizada, y la mezcla de reacción se agitó durante 2 - 4 horas para lograr la disolución completa de CRM₁₉₇.

c. Conjugación y bloqueo

La conjugación se inició mediante la adición de cianoborohidruro. La mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 72 - 96 h. La reacción de conjugación se finalizó agregando 0,5 X de WFI y luego 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción de bloqueo se mantuvo a 23 °C durante 3 - 4 h.

d. Dilución y purificación inicial del conjugado

La solución de conjugado se diluyó 1:5 (volumen de reacción) con amortiguador de fosfato de sodio 0,15 N (pH 8,0) en la preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial (TFF). El conjugado diluido se mezcló en el recipiente de dilución y luego se pasó a través de un filtro de 5 µm. La solución de conjugado filtrada luego se concentró de manera descendente hasta obtener 1 - 2 g/l. Se realizó un proceso de diafiltración de dos etapas. En la primera etapa, la TFF se realizó usando 30X (volumen de diafiltración) de amortiguador de fosfato de sodio 0,15 N (pH 8,0) y luego 20X de 5mM de succinato-0,9 % de NaCl (pH 6,0). Después de que la diafiltración inicial se había completado, el retentato de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,45 µm a un tanque de recolección.

Diafiltración final del conjugado

La etapa de purificación final fue 20X de diafiltración con medio de 5 mM de succinato-0,9 % de NaCl, pH 6,0, usando membranas de celulosa regenerada.

Dilución del volumen de conjugado monovalente (MBC)

El conjugado se diluyó adicionalmente con 5 mM de succinato / 0,9 % de NaCl, pH 6, en una concentración de sacárido diana de 0,5 mg/ml. La etapa de filtración final de 0,22 µm se completó para preparar el volumen de producto de conjugado monovalente (MBC) para la formulación.

Se obtuvieron varios conjugados usando el proceso descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación inicial sacárido-proteína, la concentración de la reacción y Meq de cianoborohidruro de sodio). La caracterización de glucoconjugados de Pn-11A representativos con CRM₁₉₇ se proporciona en la Tabla 19 (lotes 1 a 5).

Preparación de glucoconjugados de Pn-11A mediante el uso de RAC/DMSO

El polisacárido oxidado se preparó y se purificó como se describió anteriormente (véase la preparación de glucoconjugados de Pn-11A mediante RAC).

Conjugación mediante aminación reductora en DMSO (RAC/DMSO)

La conjugación de 11A mediante RAC/DMSO consistió en las siguientes etapas:

- a. Formulación de un compuesto con sacarosa, congelación superficial y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM₁₉₇;
- c. Conjugación del polisacárido activado con CRM₁₉₇, y
- d. Purificación y dilución del conjugado
 - a. Formulación de un compuesto con sacarosa, congelación superficial y liofilización

Se formuló un compuesto con el polisacárido activado preparado del polisacárido dimensionado y sacarosa (50 % p/v en WFI) en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Los componentes se mezclaron, y luego la botella congelada superficialmente de la mezcla de compuesto se liofilizó. La proteína CRM₁₉₇ se congeló superficialmente y se liofilizó por separado.

- b. Reconstitución de polisacárido activado liofilizado y proteína CRM₁₉₇

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en DMSO en una concentración de 2 mg/ml. Después de la disolución completa del polisacárido, se agregó DMSO a CRM₁₉₇ liofilizada para la reconstitución.

- c. Conjugación y bloqueo

La CRM₁₉₇ reconstituida (en DMSO) se combinó en el recipiente de reacción de conjugación con el polisacárido activado reconstituido. La concentración final de polisacárido en la solución de reacción fue de 1 g/l. La conjugación se inició mediante la adición de cianoborohidruro a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 22 horas. La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción de bloqueo se mantuvo a 23 °C durante 3 - 4 h.

- d. Purificación y dilución del conjugado

La solución de conjugado se purificó y se diluyó usando un proceso similar como se describió anteriormente.

Se obtuvieron varios conjugados usando el proceso descrito anteriormente variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación inicial sacárido-proteína, la concentración de la reacción y Meq de cianoborohidruro de sodio). La caracterización de glucoconjugados de Pn-11A representativos con CRM₁₉₇ obtenidos mediante el

proceso anterior se proporciona en la Tabla 19 (lotes 6 a 8).

Tabla 19. Conjugados neumocócicos serotipo 11A-CRM₁₉₇

Lote	1	2	3	4	5	6	7	8
MW de sacárido activado mediante MALLS (kDa)	207	129	103	199	183	232	113	113
Resultados de conjugado								
Relación sacárido/proteína	1,24	1,09	1,32	1,47	1,31	1	0,78	0,68
Acetato (mol/mol de PS)	2,72	2,89	2,72	3,2	3,13	N/A	N/A	N/A
Glicerol (mol/mol de PS)*	0,62	0,68	0,75	0,51	0,41	N/A	N/A	N/A
MW mediante SEC-MALLS (kDa)	3224	837	623	827	994	12200	6543	15730

N/A= no disponible

*El glicerol se cuantificó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) después de su liberación del polisacárido mediante ácido fluorhídrico (HF).

Los datos totales generados de conjugados preparados mediante los procesos de aminación reductora anteriores demostraron que permitieron preparar los conjugados con buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre y buena estabilidad.

La inmunogenicidad de los conjugados obtenidos anteriormente se evaluó usando el ensayo opsonofagocítico (OPA) descrito más adelante.

Se inmunizaron grupos de 30 ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de vida con 0,001 µg, 0,005 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de prueba por vía subcutánea en la semana 0. Los ratones recibieron un refuerzo con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 4.

Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usaron para medir los anticuerpos funcionales en suero murino específicos contra *S. pneumonia* serotipo 11A. El suero de prueba se preparó en reacciones de ensayo que medían la capacidad de la inmunoglobulina específica contra el polisacárido capsular de opsonizar bacterias, estimular el depósito del complemento y, por lo tanto, facilitar la fagocitosis e inactivar las bacterias por medio de los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El

título OPA se interpoló de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en métodos descritos en Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol12(2):287–295 con las siguientes modificaciones. El suero de prueba se diluyó en serie 2,5 veces y se agregó a placas de microtitulación del ensayo. Las cepas bacterianas diana de serotipo 22F vivas se agregaron a las cavidades, y las placas se agitaron a 25 °C durante 30 minutos. Se agregaron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de vida, PEL-FREEZ®, 12,5 % de concentración final) a las cavidades, y las placas se agitaron a 37 °C durante 60 minutos. Para finalizar la reacción, se agregaron 80 µl de NaCl al 0,9 % a las cavidades, se mezclaron, y se transfirió una alícuota de 10 µl a las cavidades de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró líquido a través de las placas al vacío, y se agregaron 150 µl de medio HYSOY® a cada cavidad y se filtraron. Las placas de filtro luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con solución decolorante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Las colonias se sometieron a diagnóstico por imágenes y se enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH). Se usaron recuentos de colonias sin procesar para representar curvas de inactivación y calcular títulos OPA.

Los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados serotipo 11A-CRM₁₉₇ en ratones se determinaron como se mencionó anteriormente. Los títulos OPA (título de la media geométrica (GMT) con 95 % de intervalo de confianza (CI)) a las cuatros semanas en diferentes dosis se muestran en la Tabla 20, y demuestran que el conjugado de serotipo 11A (lotes 2-4 y 8; véase también la Tabla 19 para los datos de caracterización de estos conjugados) provocó títulos OPA en un modelo murino de inmunogenicidad.

Tabla 20. Inmunogenicidad de conjugados serotipo 11A-CRM₁₉₇

	GMT de OPA (95 % de CI)		
Lote N.º	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
2	326 (260, 408)	1391 (794, 2437)	4366 (3063, 6223)
3	389 (316, 478)	1113 (690, 1795)	5527 (3698, 8260)
4	192 (149, 248)	926 (661, 1298)	2800 (1975, 3970)

8	303 (224, 411)	1099 (624, 1935)	3861 (2629, 5669)
---	----------------	------------------	-------------------

Ejemplo 15. Formulación de una vacuna neumocócica conjugada de valencia 16

Se formuló una composición conjugada de valencia 16 que comprendía glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (16vPnC), todos conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 15B, 22F y 33F se produjeron como se describió anteriormente, y los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se produjeron como se describe en WO 2006/110381.

Los volúmenes requeridos de los concentrados se calcularon en función del volumen de lote y los volúmenes de las concentraciones de sacárido. El volumen de la vacuna formulada se preparó agregando el volumen requerido de amortiguador de NaCl / succinato (pH 5,8) para obtener una concentración final de amortiguador diana de 5,0 mM de succinato y 150 mM de NaCl. Se agregó polisorbato 80 hasta obtener una concentración final de 0,02 %, y luego se agregaron los 16 conjugados neumocócicos. La preparación se filtró a través de una membrana PES Millipore de 0,2 µm, y luego se agregó AlPO₄. La formulación se mezcló para permitir la fijación y lograr homogeneidad.

La formulación luego se colocó en jeringas de vidrio para proporcionar un volumen de dosis de 0,5 ml.

La forma de dosis final consistió en 2,2 µg de cada uno de los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇, 4,4 µg de glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 6B, 5 mM de amortiguador de succinato pH 5,8, 0,02 % (p/p) de PS80, 150 mM de NaCl y 0,25 mg/ml de aluminio como AlPO₄ para una dosis de 0,5 ml. El contenido de CRM₁₉₇ fue de alrededor de 38 µg para una dosis de 0,5 ml.

Ejemplo 16. Formulación de una vacuna neumocócica conjugada de valencia 20

Se formuló una composición conjugada de valencia 20 que comprendía glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (20vPnC), todos conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F se produjeron como se describió anteriormente, y los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se

produjeron como se describe en WO 2006/110381.

Los volúmenes requeridos de los concentrados se calcularon en función del volumen de lote y los volúmenes de las concentraciones de sacárido. El volumen de la vacuna formulada se preparó agregando el volumen requerido de amortiguador de NaCl / succinato (pH 5,8) para obtener una concentración final de amortiguador diana de 5,0 mM de succinato y 150 mM de NaCl. Se agregó polisorbato 80 hasta obtener una concentración final de 0,02 %, y luego se agregaron los 20 conjugados neumocócicos. La preparación se filtró a través de una membrana PES Millipore de 0,2 µm, y luego se agregó AlPO_4 . La formulación se mezcló bien para obtener la fijación máxima de los conjugados al aluminio.

La formulación luego se colocó en jeringas de vidrio para proporcionar un volumen de dosis de 0,5 ml.

La forma de dosis final consistió en 2,2 µg de cada uno de los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇, 4,4 µg de glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 6B, 5 mM de amortiguador de succinato pH 5,8, 0,02 % (p/p) de PS80, 150 mM de NaCl y 0,25 mg/ml de aluminio como AlPO_4 para una dosis de 0,5 ml. El contenido de CRM₁₉₇ fue de alrededor de 46 µg para una dosis de 0,5 ml.

Ejemplo 17. Inmunogenicidad de una composición inmunógena de valencia 16

La inmunogenicidad de la composición inmunógena de valencia 16 (véase el Ejemplo 15) se evaluó en conejos usando inmunoensayos Luminex directos multiplexados (dLIA) para medir concentraciones de IgG específicas contra el serotipo en sueros y OPA específicos de serotipo.

Se inmunizaron grupos de 10 conejos blancos hembra de Nueva Zelanda de 2,5 kg a 3,5 kg con la dosis clínica humana propuesta (2,2 µg de conjugado excepto el serotipo 6B que fue de 4,4 µg; más 0,1 mg de aluminio como AlPO_4) mediante la vía intramuscular en la semana 0. Los conejos recibieron un refuerzo con la misma dosis de vacuna conjugada en la semana 2 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los dLIA y OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 0 y la semana 4.

A fin de cuantificar el anticuerpo de fijación al polisacárido total (IgG) específico contra cada polisacárido neumocócico (PnPS), se evaluaron sueros de conejo en dos inmunoensayos Luminex directos (dLIA; dLIA de 13 plex, serotipos de PREVNAR 13® y dLIA de 7 plex, serotipos adicionales). El ensayo de 13 plex midió los anticuerpos

anti-PnPS específicos contra los 13 serotipos incluidos en la vacuna neumocócica conjugada (PnC) de valencia 13 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F), y el ensayo de 7 plex midió los anticuerpos anti-PnPS contra los serotipos adicionales (15B, 22F, 33F). Cada ensayo contenía una combinación de 13 o 7 microesferas magnéticas espectralmente diferentes acopladas a conjugados de PnPS (conjugados PnPS-PLL: PnPS conjugado con poli-L-lisina).

En síntesis, los controles estándares de referencia y los sueros de prueba primero se absorbieron previamente con dos absorbentes de Pn; CWPS1 (polisacárido de la pared celular de PnA que contenía polisacárido C) y CWPS2 (CWP de *S. pneumoniae* serotipo 2 acapsular) para evitar que los anticuerpos no específicos se fijan al antígeno de recubrimiento de PnPS. Luego de la adsorción previa, las microesferas acopladas a PnPS se incubaron con controles de suero estándares de referencia o sueros de prueba de conejo adecuadamente diluidos. Después de la incubación, cada mezcla se lavó, y se agregó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo de cabra conjugado con r-ficoeritrina. Las señales fluorescentes (expresadas como mediana de las intensidades de fluorescencia (MFI)) se midieron usando un lector Bio-Plex y se correlacionaron con la cantidad de IgG específica contra PnPS unida. Los valores para los sueros de prueba se informaron como (unidades/ml, U/ml).

Los OPA específicos de serotipo se realizaron como se describió anteriormente. El título OPA es el valor recíproco de la mayor dilución de suero que produce 50 % de reducción en la cantidad de unidades formadoras de colonias bacterianas (CFU) en comparación con el control sin suero (denominado CFU de fondo). El título se interpoló de las dos diluciones que abarcaban este recorte de inactivación de 50 %.

Tabla 21. Concentraciones de IgG total y títulos OPA de 16vPnC

Sero tipo	IgG total (dLIA de Pn)				Anticuerpo opsonofagocítico (OPA)			
	Sem0 GMC (µg/ml)	Sem4 GMC (µg/ml)	Sem4 95 % de CI (LCI - UCI)	GMC de IgG Relación Sem4: Sem0	Sem 0 GMT	Sem 4 GMT	Sem4 95 % de CI (LCI - UCI)	GMT de OPA Relación Sem4: Sem0
1	0,08	28	17 - 44	369	4	87	55 - 139	22
3	0,08	88	60 - 128	1062	4	214	151 - 304	54
4	0,08	30	14 - 67	402	4	934	551 - 1583	233

Tabla 21. Concentraciones de IgG total y títulos OPA de 16vPnC

Sero tipo	IgG total (dLIA de Pn)				Anticuerpo opsonofagocítico (OPA)			
	Sem0 GMC (µg/ml)	Sem4 GMC (µg/ml)	Sem4 95 % de CI (LCI – UCI)	GMC de IgG Relación Sem4: Sem0	Sem 0 GMT	Sem 4 GMT	Sem4 95 % de CI (LCI – UCI)	GMT de OPA Relación Sem4: Sem0
5	0,08	34	18 - 64	449	4	368	232 - 584	87
6A	0,03	46	15 - 142	1835	4	3026	1607 - 5696	756
6B	0,08	89	33 - 241	1182	4	6156	3043 - 12453	1539
7F	0,01	50	31 - 78	3969	6	2917	2013 - 4227	528
9V	0,03	24	15 - 38	881	5	613	426 - 883	112
14	0,08	28	20 - 39	368	19	449	331 - 610	24
18C	0,05	79	45 - 139	1587	4	1847	1003 - 3401	462
19A	0,08	120	71 - 205	1605	4	1410	851 - 2336	352
19F	0,08	156	96 - 255	2083	4	3207	1783 - 5771	802
23F	0,05	33	13 - 84	668	4	997	487 - 2042	249
15B	0,05	54	40 - 71	1073	6	741	514 - 1069	116
22F	0,08	158	95 - 262	2103	5	1078	661 - 1756	211
33F	0,10	11	6 - 20	115	49	1337	829 - 2154	27

Abreviaturas: GMC, media geométrica de concentración; CI, intervalo de confianza; LCI, intervalo de confianza inferior; UCI, intervalo de confianza superior.

Los resultados muestran un aumento considerable en IgG específica contra el serotipo y las respuestas del anticuerpo OPA funcional después de dos inmunizaciones con 16vPnC (Tabla 21). Los niveles de IgG en suero aumentaron más de 2 log sobre el valor inicial. De manera similar, se produjo una respuesta fuerte del anticuerpo OPA funcional con un mínimo de aumento de 22 veces en GMT de OPA sobre el valor inicial. Los sueros preinmunitarios (sem 0) mostraron niveles indetectables de IgG específica contra PnPS y de anticuerpo OPA funcional para la mayoría de los serotipos 16v Pn a excepción de los serotipos 14 y 33F. Se presentaron niveles bajos de títulos OPA para estos serotipos, pero estas respuestas iniciales no afectaron negativamente la respuesta del anticuerpo después de la vacunación.

Ejemplo 18. Inmunogenicidad de una composición inmunógena de valencia 20

La inmunogenicidad de la composición inmunógena de valencia 20 (como se preparó en el Ejemplo 16) se evaluó en conejos usando inmunoensayos Luminex directos multiplexados (dLIA) para medir concentraciones de IgG específicas contra el serotipo en sueros y OPA específicos de serotipo.

Se inmunizaron grupos de 10 conejos blancos hembra de Nueva Zelanda de 2,5 kg a 3,5 kg con la dosis clínica humana propuesta (2,2 µg de conjugado excepto el serotipo 6B que fue de 4,4 µg; más 0,1 mg de aluminio como AlPO_4) mediante la vía intramuscular en la semana 0. Los conejos recibieron un refuerzo con la misma dosis de vacuna conjugada en la semana 2 y luego se les extrajo sangre en la semana 4. Los dLIA y OPA específicos de serotipo se realizaron en las muestras séricas de la semana 0 y la semana 4.

A fin de cuantificar el anticuerpo de fijación al polisacárido total (IgG) específico contra cada polisacárido neumocócico (PnPS), se evaluaron sueros de conejo en dos inmunoensayos Luminex directos (dLIA; dLIA de 13 plex, serotipos de PREVNAR 13[®] y dLIA de 7 plex, serotipos adicionales). El ensayo de 13 plex midió los anticuerpos anti-PnPS específicos contra los 13 serotipos incluidos en la vacuna neumocócica conjugada (PnC) de valencia 13 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F), y el ensayo de 7 plex midió los anticuerpos anti-PnPS contra los serotipos adicionales (15B, 22F, 33F). Cada ensayo contenía una combinación de 13 o 7 microesferas magnéticas espectralmente diferentes acopladas a conjugados de PnPS (conjugados PnPS-PLL: PnPS conjugado con poli-L-lisina).

En síntesis, los controles estándares de referencia y los sueros de prueba primero se absorbieron previamente con dos absorbentes de Pn; CWPS1 (polisacárido de la pared celular de PnA que contenía polisacárido C) y CWPS2 (CWP de *S. pneumoniae* serotipo 2 acapsular) para evitar que los anticuerpos no específicos se fijen al antígeno de recubrimiento de PnPS. Luego de la adsorción previa, las microesferas acopladas a PnPS se incubaron con controles de suero estándares de referencia o sueros de prueba de conejo adecuadamente diluidos. Después de la incubación, cada mezcla se lavó, y se agregó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo de cabra conjugado con r-ficoeritrina. Las señales fluorescentes (expresadas como mediana de las intensidades de fluorescencia (MFI)) se midieron usando un lector Bio-Plex y se correlacionaron con la cantidad de IgG específica contra PnPS unida. Los valores para los sueros de prueba se informaron como (unidades/ml, U/ml).

Los OPA específicos de serotipo se realizaron como se describió anteriormente. El título OPA es el valor recíproco de la mayor dilución de suero que

produce 50 % de reducción en la cantidad de unidades formadoras de colonias bacterianas (CFU) en comparación con el control sin suero (denominado CFU de fondo). El título se interpoló de las dos diluciones que abarcaban este recorte de inactivación de 50 %.

Los conejos inmunizados con 20vPnC también mostraron aumentos considerables de IgG total y títulos de anticuerpo OPA funcional contra serotipos en común entre las formulaciones 16v y 20v, además de los cuatro serotipos adicionales (8, 10A, 11A y 12F) (Tabla 22). Se indujo un aumento de 2 log en los niveles de IgG en suero en los 20 serotipos después de dos inmunizaciones. Los GMT de OPA que se produjeron con la vacuna fueron al menos 27 veces por encima del valor inicial. Se observaron niveles bajos similares de títulos OPA en sueros preinmunitarios para los serotipos 14 y 33F después de la vacunación con 20vPnC, pero, nuevamente, no alteraron la fuerza de las respuestas del anticuerpo después de la vacunación.

Las formulaciones 16vPnC y 20vPnC produjeron una respuesta humoral fuerte que fue específica contra polisacáridos neumocócicos y asociada a la inactivación funcional de la bacteria (véanse las Tablas 21 y 22). En conclusión, los estudios que se muestran en los Ejemplos 17 y 18 demostraron buena inmunogenicidad de las formulaciones 16vPnC y 20vPnC.

Tabla 22. Concentraciones de IgG total y títulos OPA de 20vPnC

Sero tipo	IgG total (dLIA de Pn)				Anticuerpo opsonofagocítico (OPA)			
	Sem0 GMC (µg/ml)	Sem4 GMC (µg/ml)	Sem4 95 % de CI (LCI – UCI)	GMC de IgG Relación Sem4: Sem0	Sem 0 GMT	Sem4 GMT	Sem4 95 % de CI (LCI – UCI)	GMT de OPA Relación Sem4: Sem0
1	0,08	28	19 - 43	379	4	106	69 - 164	27
3	0,08	116	76 - 176	1542	4	286	193 - 425	72
4	0,08	62	39 - 97	821	4	1477	954 - 2287	369
5	0,08	49	33 - 71	648	4	509	350 - 742	127
6A	0,03	30	14 - 66	1209	4	3682	2743 - 4944	849
6B	0,08	58	36 - 94	775	4	4469	3002 - 6653	1117
7F	0,02	62	39 - 101	3681	6	3226	2226 - 4675	500
9V	0,05	30	19 - 48	644	6	956	634 - 1442	150
14	0,08	34	20 - 60	457	12	506	348 - 736	42
18C	0,05	106	67 - 166	2115	4	1942	1263 - 2986	485

Tabla 22. Concentraciones de IgG total y títulos OPA de 20vPnC

19A	0,08	112	73 - 171	1493	4	1580	1071 - 2332	395
19F	0,08	178	119 - 266	2372	4	3392	2085 - 5519	848
23F	0,05	48	23 - 103	960	4	1514	889 - 2577	378
15B	0,05	70	51 - 98	1410	6	1332	949 - 1869	210
22F	0,10	172	118 - 250	1811	5	1304	1000 - 1700	279
33F	0,12	14	10 - 20	120	54	1490	1117 - 1989	28
8	0,13	144	100 - 207	1149	4	1388	988 - 1949	333
10A	0,13	54	31 - 94	433	5	1129	732 - 1741	236
11A	0,13	178	125 - 254	1423	7	10483	6373 - 17241	1434
12F	0,08	31	15 - 63	408	4	828	608 - 1127	191

Abreviaturas: GMC, media geométrica de concentración; CI, intervalo de confianza; LCI, intervalo de confianza inferior; UCI, intervalo de confianza superior.

Ejemplo 19. Evaluación de respuestas inmunitarias opsonofagocíticas de reactividad cruzada dentro del serogrupo 9 de *Streptococcus pneumoniae*

El ensayo opsonofagocítico neumocócico (OPA), que mide la inactivación de células de *S. pneumoniae* mediante células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpo funcional y complemento, se considera un sustituto importante para evaluar la eficacia de las vacunas neumocócicas.

Materiales y métodos

Dos subconjuntos seleccionados en forma aleatoria de sueros inmunitarios de adultos vacunados con una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (13v PnC) se evaluaron en ensayos OPA para los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Los sueros se recolectaron de los ensayos clínicos estadounidenses 6115A1-004 (N=59, después de la vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, coincidente previo y posterior a la vacunación), respectivamente.

El estudio 6115A1-3005 (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00546572) fue un ensayo de doble ciego, de fase 3, aleatorizado, de control activo y modificado que evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de PREVNAR 13® en comparación con una vacuna neumocócica de polisacáridos de valencia 23 (23vPS) en individuos mayores ambulatorios de 70 años o más que recibieron 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes de iniciar el estudio (véase: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546572>; acceso: 31 de marzo de 2014).

El estudio 6115A1-004 (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00427895) fue un ensayo de doble ciego, de fase 3, aleatorizado, de control activo y modificado que

evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de una vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (13vPnC) en comparación con una vacuna neumocócica de polisacáridos de valencia 23 (23vPS) en adultos de 60 a 64 años de edad sin tratamiento previo con 23vPS y la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de 13vPnC en adultos de 18 a 59 años de edad sin tratamiento previo con 23vPS (véase: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>; acceso: el 31 de marzo de 2014).

La vacuna neumocócica conjugada de valencia 13 (13vPnC) evaluada en estos estudios contenía conjugados de los serotipos neumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente con la proteína portadora de material de reactividad cruzada 197 (CRM₁₉₇) de difteria.

Los OPA se usan para medir anticuerpos funcionales en sueros humanos contra *S. pneumoniae* serotipos 9V, 9N, 9A y/o 9L. El suero de prueba se preparó en reacciones de ensayo que medían la capacidad de la inmunoglobulina específica contra el polisacárido capsular de opsonizar bacterias, estimular el depósito del complemento y, por lo tanto, facilitar la fagocitosis e inactivar las bacterias por medio de los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano con respecto a las cavidades de control sin suero de prueba. El título OPA se interpoló de las dos diluciones que abarcan este recorte de inactivación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en métodos descritos en Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol122):287–295. El suero termoinactivado de prueba se diluyó en serie 2,5 veces, se agregó junto con las bacterias diana a placas de ensayo y se incubó durante 30 minutos con agitación. Luego se agregaron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de vida, PEL-FREEZ®, Arkansas, 12,5 % de concentración final) a las cavidades, en una relación aproximada de efectoras con respecto a dianas de 200:1, y se incubaron a 37 °C con agitación. Para finalizar la reacción, se agregaron 80 µl de NaCl al 0,9 % a las cavidades, se mezclaron, y se transfirió una alícuota de 10 µl a las cavidades de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró líquido a través de las placas al vacío, y se agregaron 150 µl de medio HYSOY® a cada cavidad y se filtraron. Las placas de filtro luego se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche y se fijaron con solución decolorante (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Las colonias se sometieron a diagnóstico por imágenes y se enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL)

(Shaker Heights, OH).

Análisis estadístico: Se calcularon correlaciones de dos variables de Pearson.

Resultados - Respuestas de OPA en 9V, 9A, 9L y 9N

La respuesta multifuncional de sueros inmunitarios de adultos inmunizados con 13vPnC contra los serotipos 9A, 9L y 9N se evaluó en los respectivos ensayos opsonofagocíticos de microcolonias (mcOPA), junto con la respuesta funcional homóloga contra el serotipo 9V. Se evaluaron dos subconjuntos seleccionados en forma aleatoria de sueros inmunitarios de adultos vacunados con 13vPnC. Los sueros se recolectaron de los ensayos clínicos estadounidenses 6115A1-004 (N=59, después de la vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, coincidente previo y posterior a la vacunación), respectivamente.

Los sujetos en el estudio 6115A1-004 no recibieron tratamiento previo con ninguna vacuna neumocócica y recibieron una dosis única de 13vPnC como parte del protocolo de estudio. Los sueros inmunitarios del estudio 6115A1-004 muestran un porcentaje similar de respondedores para todos los serogrupos con valores de 98,3 %, 98,3 %, 100 % y 93,2 % para 9V, 9A, 9L y 9N, respectivamente (Figura 11), lo que respalda los resultados de 6115A1-3005 (Figura 12). Se observaron buenas correlaciones relativas de títulos OPA entre los serotipos 9V y 9A (correlación de Pearson $p = 0,5456$, $p < 0,0001$) o 9L ($p = 0,7353$, $p < 0,0001$), pero no con 9N ($p = 0,1217$, $p < 0,3627$).

Los sujetos en el estudio 6115A1-3005 habían recibido previamente 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes de inscribirse en el tratamiento y recibieron una dosis única de 13vPnC como parte del protocolo de estudio. El panel de suero coincidente previo y posterior a la vacunación (N = 66) de adultos inmunizados con 13vPnC (estudio 6115A1-3005) se evaluó en OPA para identificar la respuesta homóloga contra el serotipo 9V y la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-9V contra los serotipos 9A, 9L y 9N. Como se muestra en la Figura 12, se detectó una inmunidad relativamente alta (porcentaje de respondedores) a 9V (84 %), 9A (66 %), 9L (82 %) y 9N (86 %) en el ensayo OPA, probablemente debido a su inmunización previa con 23vPS, que incluye polisacáridos no conjugados de los serotipos 9V y 9N. Sin embargo, el porcentaje de respondedores aumentó a 95 % o más para los cuatro serotipos después de la vacunación con 13vPnC, que solo contiene conjugado serotipo 9V del serogrupo 9. El aumento de los valores de títulos se muestra en la Tabla 23 y es similar entre los serotipos, lo que también sugiere reactividad cruzada.

Tabla 23. Aumento de títulos OPA coincidentes previos y posteriores a la vacunación, 13vPnC

	Títulos OPA							
	9V		9A		9L		9N	
	Previo	Posterior	Previo	Posterior	Previo	Posterior	Previo	Posterior
GMT	221	1323	41	308	165	706	322	693
Aumento	5,9		7,5		4,2		2,1	

Un análisis más abarcativo de la distribución de títulos OPA se muestra en las curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) en las Figuras 13-16. Las RCDC muestran un aumento de la respuesta inmunitaria específica contra el serotipo después de la vacunación para los serotipos 9V, 9A, 9L y, en menor medida, 9N. La correlación del aumento de título de muestras / coincidentes individuales entre 9V 9A, 9V/9L y 9V/9N también se analizó usando correlación de Pearson. Se observaron correlaciones relativamente buenas de aumentos de títulos entre los serotipos 9V y 9A (correlación de Pearson $\rho = 0,8720$, $p < 0,0001$) o 9N ($\rho = 0,5801$, $p < 0,0001$), pero en menor medida con 9L ($\rho = 0,1804$, $p < 0,1640$).

Conclusión

En función de estos datos, la vacuna 13vPnC probablemente proporcione una cobertura de serotipos más amplia al proporcionar protección adicional contra los serotipos 9A, 9L y 9N.

Ejemplo 20: Respuestas OPA multifuncionales entre el serotipo 15B y serotipo 15C

El serogrupo neumocócico 15 incluye cuatro serotipos estructuralmente relacionados: 15A, 15B, 15C y 15F. Los serotipos 15B y 15C no se pueden distinguir mediante técnicas de tipificación genética y tienen una composición de polisacárido capsular (PS) similar, a excepción de que 15B-PS es la variante O-acetilada de 15C-PS. A fin de comprender si los anticuerpos anti-PS capsular para el serotipo 15B reaccionan de manera cruzada funcionalmente con el serotipo 15C, 10 conejos se inmunizaron con vacunas 16vPnC (véase el Ejemplo 15) y 20vPnC (véase el Ejemplo 16), ambas con un conjugado inmunógeno que comprende polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B ligado de manera covalente a CRM₁₉₇ como se describe en la presente como parte de su formulación. Los sueros previos y posteriores a la vacunación se evaluaron en ensayos OPA contra las cepas neumocócicas diana de serotipos 15B y 15C.

De los 10 conejos de cada grupo, 100 % tuvo respuesta OPA contra el serotipo 15B después de la inmunización con un conjugado de serotipo 15B. De estas muestras, 100 % también tuvo respuesta OPA contra el serotipo 15C (Tabla 24 y Tabla 25). Se observaron niveles bajos de títulos OPA en suero previo a la vacunación en OPA 15C. Sin embargo, el aumento de GMT de títulos OPA de más de 10 veces con suero posterior a la vacunación en comparación con aquel previo a la vacunación demostró que los conjugados inmunógenos de la invención inducen la formación de anticuerpos que pueden inactivar *Streptococcus pneumonia* serotipo 15B y 15C en un OPA.

Tabla 24. Títulos OPA contra cepas de serotipos 15B y 15C en sueros de conejo previos y posteriores a la vacunación con 16vPnC

Animal	15B OPA		15C OPA	
	Sem0	Sem4	Sem0	Sem4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

Tabla 25. Títulos OPA contra cepas de serotipos 15B y 15C en sueros de conejo previos y posteriores a la vacunación con 20vPnC

Animal	15B OPA		15C OPA	
	Sem0	Sem4	Sem0	Sem4
1	4	3784	no determinable*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	no determinable*	1316

5	4	2360	4	4665
6	4	1594	no determinable*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	no determinable*	527
10	4	616	no determinable*	545
GMT	4	1917	77	1515

* El título no se puede determinar debido a curvas de inactivación incorrectas

Ejemplo 21. Formulación de una vacuna neumocócica conjugada de valencia 7

Se formuló una composición conjugada de valencia 7 que comprendía glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F (7vPnC), todos conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

Los glucoconjugados de *S. pneumoniae* de serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F se produjeron como se describió anteriormente.

Los volúmenes requeridos de los concentrados se calcularon en función del volumen de lote y los volúmenes de las concentraciones de sacárido. El volumen de la vacuna formulada se preparó agregando el volumen requerido de amortiguador de NaCl / succinato (pH 5,8) para obtener una concentración final de amortiguador diana de 5,0 mM de succinato y 150 mM de NaCl. Se agregó polisorbato 80 hasta obtener una concentración final de 0,02 %, y luego se agregaron los 7 conjugados neumocócicos. La preparación se filtró a través de una membrana PES Millipore de 0,2 µm, y luego se agregó AlPO₄. La formulación se mezcló bien para obtener la fijación máxima de los conjugados al aluminio.

La formulación luego se colocó en jeringas de vidrio para proporcionar un volumen de dosis de 0,5 ml.

La forma de dosis final consistió en 2,2 µg de cada uno de los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F conjugados individualmente con CRM₁₉₇, 5,0 mM de amortiguador de succinato a pH 5,8, 0,02 % (p/p) de PS80, 150 mM de NaCl y 0,25 mg/ml de aluminio como AlPO₄ para una dosis de 0,5 ml.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva indican el nivel de las personas del oficio de nivel medio a la que pertenece la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan en la presente por referencia con el mismo alcance como si se indicara que cada

publicación o solicitud de patente se incorpora de manera específica e individual por referencia.

Si bien la invención que antecede se describió en detalle mediante ilustraciones y ejemplos para una mayor comprensión, ciertos cambios y modificaciones se pueden poner en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende: (a) una primera composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado seleccionado del grupo que consiste en un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, en donde la composición es una composición neumocócica conjugada de valencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y (b) una segunda composición inmunógena que comprende al menos un glucoconjugado de un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, para la administración simultánea, concurrente, concomitante o secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas.
2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera composición inmunógena comprende un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 15B, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 22F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 33F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 12F, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 10A, un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 11A y un glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 8, y en donde la composición es una composición neumocócica conjugada de valencia 7.
3. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde los glucoconjugados de la primera composición inmunógena se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.
4. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la primera composición inmunógena también comprende al menos un adyuvante.
5. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.
6. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 1-4, en donde la segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.
7. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la

segunda composición inmunógena comprende glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

8. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇.
9. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 5 y 7F se conjugan con CRM₁₉₇.
10. El kit de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 3, 6A y 19A se conjugan con CRM₁₉₇.
11. El kit de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se conjugan con CRM₁₉₇.
12. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y 23F se conjugan individualmente con PD.
13. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT.
14. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.
15. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde los glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F se conjugan individualmente con PD, el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 18C se conjuga con TT, y el glucoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 19F se conjuga con DT.
16. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la segunda composición inmunógena es una composición neumocócica conjugada de valencia 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
17. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la segunda composición inmunógena anterior es una composición neumocócica conjugada de valencia 13, en donde los 13 conjugados consisten en glucoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados individualmente con CRM₁₉₇.
18. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la segunda composición inmunógena también comprende al menos un

adyuvante.

19. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para la administración simultánea de la primera y segunda composiciones inmunógenas.
20. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para usar en un método de administración concomitante de la primera y segunda composiciones inmunógenas.
21. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para usar en un método de administración concurrente de la primera y segunda composiciones inmunógenas.
22. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde el programa de vacunación de la administración simultánea, concomitante o concurrente es un programa de dosis múltiple.
23. El kit de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el programa de dosis múltiple consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, y luego al menos una dosis cuando el niño es pequeño.
24. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para usar en un método de administración secuencial de la primera y segunda composiciones inmunógenas.
25. El kit de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el programa de vacunación de la administración secuencial consiste en una serie de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 dosis.
26. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-25, en donde el programa de vacunación consiste en la administración secuencial de:
 - (a) la primera composición inmunógena y
 - (b) la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena.
27. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-25, en donde el programa de vacunación consiste en la administración secuencial de:
 - (a) la segunda composición inmunógena y
 - (b) la administración concomitante o concurrente de la primera composición inmunógena con la segunda composición inmunógena.

RESUMEN

La presente invención se refiere a nuevas composiciones inmunógenas que comprenden antígenos de sacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* conjugados (glucoconjugados), kits que comprenden tales composiciones inmunógenas y sus usos. En general, las composiciones inmunógenas de la presente invención comprenden al menos un glucoconjugado de un serotipo de *S. pneumoniae* no encontrado en PREVNAR®, SYNFLORIX® y/o PREVNAR 13®. La invención también se refiere a la vacunación de sujetos humanos, en particular, niños y personas mayores, contra infecciones neumocócicas usando tales composiciones inmunógenas novedosas.