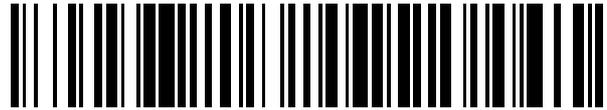


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 190**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11799673 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2651437**

54 Título: **Composición antigénica de micobacterias**

30 Prioridad:

**14.12.2010 US 422723 P**

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

**20.04.2016**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
Rue de l'Institut, 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**GODART, STEPHANE ANDRE GEORGES;  
LAANAN, AMINA y  
LEMOINE, DOMINIQUE INGRID**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 567 190 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición antigénica de micobacterias

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden un antígeno relacionado con M72 y que tienen una fuerza iónica baja. La presente invención también se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden además uno o más inmunoestimulantes.

### Antecedentes de la invención

10 La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica provocada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*. Es una enfermedad importante en países en desarrollo, así como un problema creciente en áreas desarrolladas del mundo. Se cree que más de 2 miles de millones de personas están infectadas con bacilos de la TB, con aproximadamente 9,4 millones de casos nuevos de TB y 1,7 millones de muertes cada año. Un 10 % de los infectados con bacilos de TB desarrollarán TB activa, infectando cada persona con TB activa a un promedio de otras 10 a 15 por año. Aunque las tasas de incidencia anual han alcanzado su nivel máximo globalmente, el número de muertes y casos todavía está aumentando debido al crecimiento de la población (World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010).

15 Los antígenos de proteína Mtb72f y M72 (descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2006/117240), o fragmentos o derivados de los mismos, son antígenos de proteína de un beneficio potencial para el tratamiento o la prevención de la tuberculosis.

20 La formulación de antígenos de proteína es extremadamente importante para asegurar que se mantiene la inmunogenicidad. A veces, se usan inmunoestimulantes para mejorar la respuesta inmunitaria elevada para cualquier antígeno dado. Sin embargo, la inclusión de coadyuvantes en una composición inmunógena incrementa la complejidad de la preparación de los componentes así como la complejidad de la distribución y formulación de la composición. Los formuladores deben considerar la preparación de cada uno de los componentes coadyuvantes así como el componente antigénico. En particular, se debe considerar la compatibilidad del componente antigénico con el componente coadyuvante. En particular, este es el caso en el que se pretende que los antígenos liofilizados o preparaciones antigénicas se reconstituyan con una preparación coadyuvante. En una circunstancia de este tipo, es importante que el tampón de la preparación coadyuvante sea adecuado para el antígeno y que la inmunogenicidad o solubilidad del antígeno no se vea afectada por el coadyuvante.

30 El documento WO2006/117240 divulga procedimientos de prevención de la reactivación de infecciones por *M. tuberculosis* usando una composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión M72 o Mtb72f.

### Sumario de la invención

35 Los presentes inventores han identificado por primera vez que los antígenos relacionados con M72 son particularmente sensibles a la presencia de sales. Sin limitarse por la teoría, se cree que los antígenos relacionados con M72 están afectados negativamente por un fenómeno conocido como "desplazamiento salino" que se puede definir como la precipitación de una proteína de su solución por interacción con sales, tales como cloruro de sodio. Los presentes inventores han encontrado que estos antígenos se agregan y precipitan a una concentración de cloruro de sodio de tan solo 150 mM. En consecuencia, la estabilidad de las composiciones inmunógenas que comprenden antígenos relacionados con M72 se puede mejorar sorprendentemente por una reducción en la concentración de cloruro de sodio.

40 En consecuencia, La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con M72, en el que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID No: 1, en el que la conductividad de la composición es de 5 mS/cm o menor y el pH de la composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0-

### Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1. Curva de actividad lítica de QS21  
 Figura 2. Porcentaje de cada congénere de 3D-MPL en las diferentes formulaciones de ASA  
 Figura 3. DLS de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento  
 50 Figura 4. Nefelometría de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento  
 Figura 5. Estabilidad antigénica de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento  
 Figura 6. Análisis de SEC-HPLC de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento  
 55 Figura 7. Antigenticidad de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después

- del almacenamiento
- Figura 8. Conductividad de soluciones estándar de NaCl
- Figura 9. Inducción de respuestas de linfocitos T CD4 en ratones usando composiciones inmunógenas de la invención
- 5 Figura 10. Inducción de respuestas de linfocitos T CD8 en ratones usando composiciones inmunógenas de la invención
- Figura 11. Nefelometría de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 12. DLS de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- 10 Figura 13. Antigenicidad de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento

**Breve descripción de identificadores de secuencia**

- 15 SEQ ID No: 1 Secuencia de aminoácidos para la proteína de M72
- SEQ ID No: 2 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de M72
- SEQ ID No: 3 Secuencia de aminoácidos para la proteína de M72 con dos restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 4 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de M72 con dos restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 5 Secuencia de aminoácidos para la proteína de Mtb72f
- SEQ ID No: 6 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de Mtb72f
- 20 SEQ ID No: 7 Secuencia de aminoácidos para la proteína de Mtb72f con seis restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 8 Secuencia de nucleótidos que codifican la proteína de Mtb72f con seis restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 9 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 1 (CpG 1826)
- SEQ ID No: 10 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 2 (CpG 1758)
- SEQ ID No: 11 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 3
- 25 SEQ ID No: 12 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 4 (CpG 2006)
- SEQ ID No: 13 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 5 (CpG 1686)

**Descripción detallada de la invención**

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 % con la SEQ ID NO:1, el pH de la composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0 y en la que la conductividad de la composición es de 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor o 3 mS/cm o menor. En una realización particular, la conductividad de la composición inmunógena es de 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor. En otra realización específica, la conductividad de la composición inmunógena es de 1,5 a 2,5 mS/cm.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición inmunógena en la que la concentración de sales de dicha composición es de 40 mM o menor. En una realización particular, la concentración de sales en dicha composición es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor. En otra realización específica, la concentración de sales en dicha composición es de 20 a 40 mM, tal como de 25 a 35 mM.

40 En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor, o 15 mM o menor. En una realización particular, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunógena es de 10 mM o menor, tal como 7,5 mM o menor. De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunógena es de o es inferior a 5 mM. En otra realización específica, la composición inmunógena está esencialmente libre de cloruro de sodio. Por esencialmente libre se quiere decir que la concentración de cloruro de sodio es de o muy próxima a cero mM (tal como 3 mM o menos, 2 mM o menos o 1 mM o menos).

Adecuadamente, la concentración de CaCl<sub>2</sub> en las composiciones inmunógenas será de 30 mM o menor, 20 mM o menor, 15 mM o menor o 10 mM o menor.

Adecuadamente, la concentración de MgSO<sub>4</sub> en las composiciones inmunógenas será de 60 mM o menor, 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor o 10 mM o menor.

50 Adecuadamente, la concentración de los iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> n las composiciones inmunógenas será de 60 mM o menor, 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor o 10 mM o menor.

Las composiciones inmunógenas de la invención serán preparaciones acuosas.

55 La conductividad de una composición inmunógena de la invención se puede medir usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo usando un medidor de conductividad dedicado u otro instrumento con la capacidad para medir la conductividad. Un instrumento adecuado es el Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments (Reino Unido).

El experto puede someter a prueba fácilmente la concentración de ambos iones de sodio (Na<sup>+</sup>) y cloruro (Cl<sup>-</sup>) usando técnicas y kits conocidos. Por ejemplo, el sodio se puede determinar usando un kit tal como el kit de ensayo enzimático de sodio (número de catálogo: BQ011EAEL) de Biosupply. El cloruro se puede determinar usando un kit tal como el kit de ensayo enzimático de cloruro (número de catálogo: BQ006EAEL) de Biosupply.

5 La tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa crónica provocada por infección con *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*. Es una enfermedad importante en países en desarrollo, así como un problema creciente en áreas desarrolladas del mundo. Se cree que más de 2 miles de millones de personas están infectadas con bacilos de TB, con aproximadamente 9,4 millones de casos nuevos de TB y 1,7 millones de muertes cada año. Un 10 % de los infectados con bacilos de TB desarrollarán TB activa, infectando cada persona con TB activa a un promedio de otras 10 a 15 por año. Aunque las tasas de incidencia anual han alcanzado su nivel máximo globalmente, el número de muertes y casos todavía está aumentando debido al crecimiento de la población (World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010).

15 La *Mycobacterium tuberculosis* infecta a individuos a través de la vía respiratoria. Los macrófagos alveolares engullen la bacteria, pero puede sobrevivir y proliferar inhibiendo la fusión de fagosomas con lisosomas ácidos. Sigue una respuesta inmunitaria compleja que implica linfocitos T CD4+ y CD8+, dando como resultado finalmente la formación de un granuloma. Fundamental para el éxito de *Mycobacterium tuberculosis* como patógeno es el hecho de que la bacteria aislada, pero no erradicada, pueda persistir durante periodos largos, dejando al individuo vulnerable al desarrollo tardío de la TB activa.

20 Menos de un 5 % de los individuos infectados desarrollan TB activa en los primeros años después de la infección. El granuloma puede persistir durante décadas y se cree que contiene *Mycobacterium tuberculosis* viva en un estado de letargo, privado de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, se ha sugerido recientemente que la mayoría de las bacterias en el estado de letargo está localizadas en tipos de células no macrófagos repartidas por todo el cuerpo (Locht y col., *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11):1665-1677). El desarrollo de la TB activa se produce cuando el equilibrio entre la inmunidad natural del huésped y el patógeno cambia, por ejemplo como resultado de un acontecimiento inmunosupresor (Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1):7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2):87-95).

25 También se ha propuesto una hipótesis dinámica que describe el equilibrio entre la TB latente y la TB activa (Cardana P-J *Inflammation & Allergy – Drug Targets* 2006 6:27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2):80-86).

30 Aunque una infección puede ser asintomática durante un periodo de tiempo considerable, la enfermedad activa se manifiesta más comúnmente como una inflamación aguda de los pulmones, dando como resultado fatiga, pérdida de peso, fiebre y una tos persistente. Si no se trata, normalmente resulta en complicaciones graves y muerte.

35 En general, la tuberculosis se puede controlar usando tratamiento antibiótico extendido, aunque este tratamiento no es suficiente para evitar que la enfermedad se extienda. Los individuos infectados activamente pueden ser en gran parte asintomáticos, pero contagiosos, durante algún tiempo. Además, aunque el cumplimiento con el régimen de tratamiento es crítico, el comportamiento del paciente es difícil de controlar. Algunos pacientes no completan el curso del tratamiento, lo que conduce a un tratamiento ineficaz y al desarrollo de resistencia al fármaco.

40 La TB multiresistente (MDR-TB) es una forma que no responde a medicaciones de primera línea. Un 3,3 % de todos los casos de TB son MDR-TB, produciéndose 440.000 nuevos casos de MDR-TB cada año. La TB extensamente resistente (XDR-TB) se produce cuando se desarrolla resistencia a medicaciones de segunda línea sobre la resistencia a medicaciones de primera línea. Se ha confirmado la XDR-TB virtualmente no tratable en 58 países (Organización mundial de la salud *Tuberculosis Facts* 2010).

Incluso aunque se complete un curso total de tratamiento de antibiótico, puede que no se erradique la infección con *M. tuberculosis* del individuo infectado y puede permanecer como una infección latente que se puede reactivar. Para controlar la extensión de la tuberculosis, un programa de vacunación y un diagnóstico temprano correcto de la enfermedad son de suma importancia.

45 Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el procedimiento usado más ampliamente para inducir inmunidad protectora. La *Mycobacterium* empleada más comúnmente para este propósito es *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), una cepa no virulenta de *M. bovis* que se desarrolló por primera vez hace unos 60 años. Sin embargo, la seguridad y la eficacia de BCG es una fuente de controversia aunque protege contra la manifestación de la enfermedad grave en niños, BCG no evita el establecimiento de TB latente o la reactivación de enfermedad pulmonar en la vida adulta. Adicionalmente, algunos países, tales como los Estados Unidos, no vacunan a la población con este agente.

55 Varias de las proteínas que se expresan fuertemente durante las etapas tempranas de la infección de *Mycobacterium* han mostrado que proporcionan una eficacia protectora en modelos de vacunación animales. Sin embargo, la vacunación con antígenos que se expresan altamente durante las etapas tempranas de la infección puede no proporcionar una respuesta inmunitaria óptima para tratar etapas tardías de la infección. El control adecuado durante la infección latente puede requerir linfocitos T que sean específicos para los antígenos particulares que se expresan en ese momento. Las vacunas post-exposición que se dirigen directamente a las bacterias persistentes en letargo pueden ayudar en la protección contra la reactivación de la TB, potenciando de este modo el control de la TB, o incluso permitiendo la desaparición de la infección. Por lo tanto, una vacuna dirigida

a TB latente podría reducir significativa y económicamente las tasas de infección de TB globales.

También se pueden utilizar vacunas subunitarias basadas en antígenos de estadio tardío en combinación con antígenos de estadio temprano para proporcionar una vacuna multifase. De forma alternativa, se pueden usar antígenos de estadio temprano y/o tardío para complementar y mejorar la vacunación de BCG (aumentando la respuesta de BCG o bien a través del desarrollo de cepas de BCG recombinantes).

Los antígenos de proteínas Mtb72f y M72 con antígenos de proteínas de beneficio potencial para el tratamiento o la prevención de tuberculosis. Se ha demostrado que Mtb72f proporciona protección en varios modelos animales (véase, por ejemplo: Brandt y col. *Infect. Immun.* 2004 72(11):6622-6632; Skeiky y col. *J. Immunol.* 2004 172:7618-7628; Tsenova y col. *Infect. Immun.* 2006 74(4):2392-2401; Reed y col. PNAS 2009 106(7):2301-2306). Mtb72f también ha sido el objeto de investigaciones clínicas (Von Eschen y col. 2009 *Human Vaccines* 5(7):475-482). M72 es un antígeno mejorado que incorpora una única mutación de serina a alanina con relación a Mtb72f, dando como resultado características de estabilidad mejoradas. Los antígenos relacionados con M72 también han demostrado ser válidos en el modelo de TB latente (solicitud de patente internacional WO2006/117240).

Como se usa en el presente documento, "antígeno relacionado con M72" se refiere a la proteína de M72 proporcionada en la SEQ ID No: 1 o un derivado inmunógeno de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a un antígeno que está modificado con relación a la secuencia de referencia. Los derivados inmunógenos son suficientemente similares a la secuencia de referencia como para retener las propiedades inmunógenas de la secuencia de referencia y seguir permitiendo que se eleve una respuesta inmunitaria contra la secuencia de referencia. Por ejemplo, un derivado puede comprender una versión modificada de la secuencia de referencia o alternativamente puede consistir en una versión modificada de la secuencia de referencia.

El antígeno relacionado de M72 puede contener, por ejemplo, menos de 1.500 restos de aminoácidos, tal como menos de 1.200 restos de aminoácidos, en particular menos de 1.000 restos de aminoácidos, especialmente menos de 800 restos de aminoácidos.

Los epítomos de linfocitos T son tramos contiguos cortos de aminoácidos que se reconocen por linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+ o CD8+). Se puede lograr la identificación de epítomos de linfocitos T a través de experimentos de mapeo que son conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243-247 (1993); Beißbarth y col. *Bioinformatics* 2005 21(Supl. 1):i29-i37). En una población exogámica, tal como de seres humanos, diferentes tipos de HLA significa que puede que no se reconozcan los epítomos particulares por todos los miembros de la población. Como resultado de la implicación crucial de la respuesta de linfocitos T en la tuberculosis, para maximizar el nivel de reconocimiento y la escala de respuesta inmunitaria, es deseable un derivado inmunógeno de M72 que contenga la mayoría (o de forma adecuada todos) los epítomos de linfocitos T intactos.

El experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a la proteína de M72 proteína que altera, añade o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos es un "derivado inmunógeno" en el que la(s) alteración/alteraciones da(n) como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido funcionalmente similar o la sustitución/delección/adición de restos que no imparten sustancialmente la función inmunógena.

Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. En general, estas sustituciones conservadoras caerán dentro de una de las agrupaciones de aminoácidos especificados a continuación, aunque en algunas circunstancias pueden ser posibles otras sustituciones sin afectar sustancialmente las propiedades inmunógenas del antígeno. Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son normalmente sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
  - 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
  - 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
  - 4) Arginina (R), lisina (K);
  - 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
  - 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
  - 7) Serina (S), treonina (T); y
  - 8) Cisteína (C), metionina (M)
- (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* 1984).

De forma adecuada, estas sustituciones no se producen en la región de un epítopo, y por lo tanto no tienen un impacto significativo sobre las propiedades inmunógenas del antígeno.

Los derivados inmunógenos también pueden incluir aquellos en los que se insertan aminoácidos adicionales en comparación con la secuencia de referencia. De forma adecuada, estas inserciones no se producen en la región de un epítopo, y por lo tanto no tienen un impacto significativo en las propiedades inmunógenas del antígeno. Un ejemplo de inserciones incluye tramo corto de restos de histidina (por ejemplo, 2-6 restos) para ayudar en la

expresión y/o purificación del antígeno en cuestión.

Los derivados inmunógenos incluyen aquellos en los que se han eliminado aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia. De forma adecuada, estas deleciones no se producen en la región de un epítipo, y por lo tanto no tienen un impacto significativo en las propiedades inmunógenas del antígeno.

- 5 El experto reconocerá que un derivado inmunógeno particular puede comprender sustituciones, deleciones y adiciones (o cualquier combinación de las mismas).

Los términos "idéntico" o "identidad" en porcentaje, en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos que es el mismo (es decir, un 70 % de identidad, opcionalmente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad sobre una región especificada), cuando se comparan y se alinean para determinar la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es al menos de 500 aminoácidos en longitud, tal como 600 aminoácidos o 700 aminoácidos. De forma adecuada, la comparación se realiza sobre una ventana correspondiente con la longitud entera de la secuencia de referencia (al contrario que la secuencia derivada).

Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa como la secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar parámetros de programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencia calcula las identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se hayan alineado de forma óptica las dos secuencias. Los procedimientos de alineación de las secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de las secuencias para su comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por el procedimiento de búsqueda por semejanza de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds. 1995 supl.)).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por parejas, para mostrar la relación y la identidad de secuencia en porcentaje. También representa un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresivo de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987). El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple empieza con el alineamiento por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Después, se alinea este grupo con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Se alinean dos grupos de secuencias por una extensión sencilla de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se logra por una serie de alineaciones progresivas, por parejas. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos para regiones de comparación de secuencia y designando los parámetros de programa. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar la relación de identidad de secuencia en porcentaje usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10), y huecos terminales pesados. PILEUP se puede obtener a partir del paquete de software de análisis de secuencias de GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux y col., *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la semejanza de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El software para llevar a cabo análisis de BLAST está públicamente disponible por el National Center for Biotechnology Information (página web en [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que pueden coincidir o satisfacer alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col., *supra*). Estos aciertos de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HPS más

largas que las contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que se pueda incrementar la alineación acumulable. Las puntuaciones acumulables se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos emparejados; siempre  $> 0$ ) y N (puntuación de penalización para restos mal emparejados; siempre  $< 0$ ). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulable. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulable baja a la cantidad X desde su máximo valor logrado; la puntuación acumulable baja hasta cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros de algoritmo de BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo de BLAST también realiza un análisis estadístico de la semejanza entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de semejanza proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,2, más preferentemente de menos de aproximadamente 0,01 y más preferentemente de menos de aproximadamente 0,001.

En cualquier acontecimiento, los derivados inmunógenos de una secuencia de polipéptidos tendrán esencialmente la misma actividad que la secuencia de referencia. Por esencialmente la misma actividad se quiere decir al menos un 50 %, de forma adecuada al menos un 75 % y especialmente al menos un 90 % de actividad de la secuencia de referencia en un ensayo de reestimulación *in vitro* de PBMC o de sangre completa con antígenos específicos (por ejemplo, reestimulación durante un periodo de entre varias horas a hasta dos semanas, tal como hasta un día, de 1 día a 1 semana o de 1 a 2 semanas) que mide la activación de las células por medio de linfoproliferación, la producción de citocinas en el sobrenadante del cultivo (medida por ELISA, CBA, etc.) o la caracterización de respuestas de linfocitos T y B por tinción intra y extracelular (por ejemplo, usando anticuerpos específicos para marcadores inmunitarios, tales como CD3, CD4, CD8, IL2, TNF-alfa, IFN-gamma, CD40L, CD69, etc) seguido por el análisis con un citómetro de flujo. De forma adecuada, por esencialmente la misma actividad se quiere decir al menos un 50 %, de forma adecuada al menos un 75 % y especialmente al menos un 90 % de actividad de la secuencia de referencia en una proliferación de linfocitos T y/o ensayo de producción de IFN-gamma.

Los derivados particulares de la proteína de M72 incluyen aquellos con restos de His adicionales en el extremo N terminal (por ejemplo, dos restos de His, como se proporciona en la SEQ ID No: 3; o una marca de polihistidina de cinco o en particular seis restos de His, que se pueden usar para la purificación de afinidad del níquel). Mtb72f (SEQ ID No: 5) que contiene el residuo de serina original que se ha mutado en M72, es otro derivado de M72, ya que son proteínas de Mtb72f con restos de His adicionales en el extremo N terminal (por ejemplo, dos restos de His; o una marca de polihistidina de cinco o en particular seis restos de His, que se pueden usar para la purificación de afinidad del níquel).

De forma adecuada, un antígeno relacionado con M72 comprenderá, tal como que consistirá en, una secuencia que tiene al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 99 % con la SEQ ID No.1. Opcionalmente, un antígeno relacionado con M72 comprenderá, tal como que consistirá, una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID No.1.

Los antígenos relacionados con M72 típicos comprenderán, tal como que consistirán en, un derivado inmunógeno de la SEQ ID No 1 o 3, que tiene un número pequeño de delecciones, inserciones y/o sustituciones. Los ejemplos son los que tienen delecciones de hasta 5 restos en 0-5 localizaciones, inserciones de hasta 5 restos en 0-5 cinco localizaciones y sustituciones de hasta 20 restos.

Otros derivados inmunógenos de M72 son los que comprenden, tal como que consisten en, un fragmento de la SEQ ID No: 1 o 3, que tiene al menos 500 aminoácidos en longitud, tal como al menos 600 aminoácidos en longitud o al menos 700 aminoácidos en longitud.

Los antígenos relacionados con M72 se pueden preparar por los procedimientos descritos anteriormente (documento WO2006/117240), los proporcionados en los ejemplos, o los procedimientos análogos a ellos.

Las composiciones inmunógenas pueden comprender uno o más componentes antigénicos adicionales. Estos componentes antigénicos adicionales no tienen por qué ser sensibles a la presencia de sales en la composición.

Se pueden destinar los componentes antigénicos adicionales para fortalecer o complementar las respuestas inmunitarias solicitadas por el antígeno relacionado con M72 en el campo de la prevención o del tratamiento de la

tuberculosis o se podrían asociar antígenos adicionales con otros patógenos y se destinan para su administración con el antígeno relacionado con M72 por razones de conveniencia. Cuando están presentes varios componentes antigénicos dentro de la formulación, éstos se pueden proporcionar en forma de polipéptidos individuales o proteínas de fusión. En algunas circunstancias, se pueden proporcionar componentes antigénicos adicionales como un polinucleótido (o polinucleótidos).

Es muy conocido que para las soluciones de administración parenteral tendría que haber una osmolalidad farmacéuticamente aceptable para evitar la distorsión o la lisis celular. En general, una osmolalidad farmacéuticamente aceptable significará que las soluciones tendrán una osmolalidad que es aproximadamente isotónica o un poco hipertónica. De forma adecuada, las composiciones inmunógenas de la presente invención tendrán una osmolalidad en el intervalo de 250 a 750 mOsm/kg, por ejemplo, el osmolalidad puede estar en el intervalo de 250 a 550 mOsm/kg, tal como en el intervalo de 280 a 500 mOsm/kg.

Se puede medir la osmolalidad de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica, tales como por el uso de un osmómetro comercialmente disponible, por ejemplo el Modelo 2020 Advanced® disponible de Advanced Instruments Inc. (EE.UU.).

Un "agente de isotonicidad" es un compuesto que se tolera fisiológicamente e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para evitar el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación.

En general, se usa cloruro de sodio (NaCl) como agente de tonicidad. los presentes inventores han demostrado por primera vez que esos antígenos relacionados con M72 son particularmente sensibles al "desplazamiento salino", un proceso en el que las proteínas en solución se juntan o coagulan cuando están en soluciones que contienen altas concentraciones de sal. En consecuencia, se proporcionan medios alternativos para asegurar que las composiciones inmunógenas de la invención tengan una osmolalidad farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, se proporcionan composiciones inmunógenas que comprenden además un agente de tonicidad no iónico. Un agente de tonicidad no iónico para su uso en una composición inmunógena necesitará el mismo ser farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, adecuado para su uso en seres humanos, así como ser compatible con el antígeno relacionado con M72 y compatible además con otros componentes tales como el/los inmunoestimulante(s).

En una realización de la presente invención, los agentes de tonicidad no iónicos adecuados son polioles, azúcares (en particular, sacarosa, fructosa, dextrosa o glucosa) o aminoácidos tales como glicina. En una realización, el poliol es un alcohol de azúcar, especialmente un alcohol de azúcar C3-6. Los alcoholes de azúcar ejemplares incluyen glicerol, eritritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, sorbitol, manitol, dulcitol e iditol. En un ejemplo específico de esta realización, un agente de tonicidad no iónico adecuado es sorbitol. El experto reconocerá que se puede conseguir una osmolalidad apropiada a través del uso de una mezcla de diferentes agentes de tonicidad. En una realización particular de la invención, el agente de tonicidad no iónico en las composiciones de la invención incorpora sacarosa y/o sorbitol.

En una realización, una concentración adecuada de poliol dentro de la composición inmunógena es de entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 15 % (p/v), en particular de entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 10 % (p/v), por ejemplo, entre aproximadamente un 3 y aproximadamente un 7 % (p/v), tal como entre aproximadamente un 4 y aproximadamente un 6 % (p/v). En un ejemplo específico de esta realización, el poliol es sorbitol.

En otra realización, la composición inmunógena comprende sacarosa y sorbitol. En estas circunstancias, la composición inmunógena puede contener de forma adecuada entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 15 % (p/v) de sacarosa y entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 15 % (p/v) de sorbitol, en particular entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 10 % (p/v) de sacarosa y entre aproximadamente un 2,5 y aproximadamente un 10 % (p/v) de sorbitol, por ejemplo, entre aproximadamente un 3 y aproximadamente un 7 % (p/v) de sacarosa y entre aproximadamente un 3 y aproximadamente un 7 % (p/v) de sorbitol, tal como entre aproximadamente un 4 y aproximadamente un 6 % (p/v) de sacarosa y entre aproximadamente un 4 y aproximadamente un 6 % (p/v) de sorbitol.

El pH de las composiciones inmunógenas debería ser adecuado para la administración parenteral. Normalmente, el pH estará en el intervalo de 6,0 a 9,0. De forma adecuada, El pH estará en el intervalo de 7,0 a 9,0, especialmente de 7,25 a 8,75, tal como de 7,5 a 8,5, en particular un pH de 7,75 a 8,25. Es de particular interés un pH de aproximadamente 8,0.

Se puede controlar el pH por el uso de tampones, incluyendo, por ejemplo, tampones Tris o de fosfato.

En una realización particular de la invención, la composición inmunógena comprende uno o más inmunoestimulantes.

En una realización, el inmunoestimulante puede ser una saponina. Una saponina particularmente adecuada para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina y se describió en primer lugar por Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p243-254) por tener actividad

5 coadyuvante. Se han aislado fracciones purificadas de Quil A por HPLC que retiene la actividad coadyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento WO88/09336), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). La QS21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, células TH1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante. QS21 es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

10 En una forma adecuada de la presente invención, el coadyuvante de saponina dentro de la composición inmunógena es un derivado de Quil A de *saponaria* Molina, en particular, una fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS17 o QS21, adecuadamente QS21.

De forma deseable, QS21 se proporciona en una composición menos reactógena en la que se desactiva con un esteroil exógeno, tal como colesterol, por ejemplo. Existen varias formas concretas de composiciones menos reactógenas en las que QS21 se desactiva con un colesterol. En una realización específica, la saponina/esteroil está en forma de una estructura de liposoma (tal como la descrita en el documento WO 96/33739, ejemplo 1). En esta realización, los liposomas contienen de forma adecuada un lípido neutro, por ejemplo, fosfatidilcolina, que de forma adecuada es no cristalino a temperatura ambiente, por ejemplo, fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido cargado es de forma adecuada de un 1-20 % p/p, tal como de un 5-10 %. La proporción de esteroil con respecto a fosfolípido es de un 1-50 % (mol/mol), de forma adecuada de un 20-25 %.

15  
20

Los esteroides adecuados incluyen  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular, la composición inmunógena comprende colesterol como esteroil. Estos esteroides son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se da a conocer en el Índice de Merck, 11<sup>a</sup> Ed., página 341, como un esteroil natural que se encuentra en la grasa animal.

25

Cuando la fracción de saponina activa es QS21, la proporción de QS21:esteroil será normalmente del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), de forma adecuada de entre 1:10 a 1:1 (p/p), y especialmente de 1:5 a 1:1 (p/p). De forma adecuada, está presente esteroil en exceso, siendo la proporción QS21:esteroil al menos de 1:2 (p/p). En una realización, la proporción QS21:esteroil es de 1:5 (p/p). De forma adecuada, el esteroil es colesterol.

30

En otra realización, la composición inmunógena comprende un inmunoestimulante que es un agonista del receptor similar a Toll 4 (TLR4). Por "agonista de TLR" se quiere decir un componente que puede provocar una respuesta de señalización a través de un camino de señalización de TLR, como un ligando directo o bien indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col., J Immunol 2003 p1630-5). Un agonista de TLR4 puede provocar una respuesta de señalización a través de un camino de señalización de TLR-4. Un ejemplo adecuado de un agonista de TLR4 es un lipopolisacárido, de forma adecuada, un derivado no tóxico de lípido A, en particular, monofosforil lípido A o más en particular monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL).

35

3D-MPL se comercializa con el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y en la memoria descriptiva se denomina MPL o 3D-MPL, véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. 3D-MPL promueve principalmente las respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo de IFN-gamma (Th1). 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el documento GB2220211A. Químicamente es una mezcla de un monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención se puede usar 3D-MPL de partícula pequeña para preparar la composición inmunógena. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar de forma estéril a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m. Estas preparaciones se describen en el documento WO94/21292. De forma adecuada, se usa 3D-MPL en polvo para preparar las composiciones inmunógenas de la presente invención.

40  
45

Otros antagonistas de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los dados a conocer en el documento WO98/50399 o en la patente de los EE.UU. 6.303.347 (también se dan a conocer procesos para la preparación de AGP), de forma adecuada RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se dan a conocer en la patente de los EE.UU. N.º 6.764.840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4.

50

Otros agonistas de TLR4 adecuados son los descritos en el documento WO2003/011223 y en el documento WO2003/099195, tales como compuesto I, compuesto II y compuesto III dados a conocer en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y en particular los compuestos dados a conocer en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764. Por ejemplo, un agonista de TLR-4 adecuado es ER804057.

55

En una realización particular, la composición inmunógena comprende tanto una saponina como un agonista de TLR4. En un ejemplo específico, la composición inmunógena comprende QS21 y 3D-MPL.

5 Un agonista de TLR-4, tal como un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, se puede usar en cantidades de entre 1 y 100 ug por dosis humana de la composición inmunógena. Se puede usar 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 50 ug, por ejemplo de entre 40 a 60 ug, de forma adecuada de entre 45 a 55 ug o de entre 49 y 51 ug o de 50 ug. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunógena comprende 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 25 ug, por ejemplo, de entre 20 a 30 ug, de forma adecuada de entre 21 a 29 ug o de entre 22 a 28 ug o de entre 23 y 27 ug o de entre 24 y 26 ug, o de 25 ug.

10 Una saponina, tal como QS21, se puede usar en cantidades de entre 1 y 100 ug por dosis humana de la composición inmunógena. Se puede usar QS21 en un nivel de aproximadamente 50 ug, por ejemplo de entre 40 a 60 ug, de forma adecuada de entre 45 a 55 ug o de entre 49 y 51 ug o de 50 ug. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunógena comprende QS21 en un nivel de aproximadamente 25 ug, por ejemplo, de entre 20 a 30 ug, de forma adecuada de entre 21 a 29 ug o de entre 22 a 28 ug o de entre 23 y 27 ug o de entre 24 y 26 ug, o de 25 ug.

15 Cuando tanto un agonista de TLR4 como saponina están presentes en la composición inmunógena, entonces la proporción en peso de agonista de TLR4 con respecto a saponina es de forma adecuada de entre 1:5 a 5:1, de forma adecuada de entre 1:2 a 2:1, tal como aproximadamente 1:1. Por ejemplo, cuando 3D-MPL está presente en una cantidad de 50 ug o 25 ug, entonces QS21 también puede estar presente de forma adecuada en una cantidad de 50 ug o 25 ug, respectivamente, por dosis humana de la composición inmunógena. Determinadas composiciones  
20 inmunógenas de la presente invención comprenden QS21 y 3D-MPL, en una cantidad de entre 1 y 100 ug de cada por dosis humana, tales como en una cantidad de entre 10 y 75 ug de cada por dosis humana. Las composiciones inmunógenas de la presente invención pueden comprender de forma adecuada QS21 y 3D-MPL, en una cantidad de entre 15 y 35 ug de cada por dosis humana, tales como en una cantidad de entre 20 y 30 ug de cada por dosis humana.

25 En una realización, el inmunoestimulante es un agonista de TLR9, por ejemplo como se establece en el documento WO2008/142133. En un ejemplo específico, este agonista de TLR9 es un oligonucleótido inmunoestimulador, en particular un oligonucleótido que contiene un motivo CpG no metilado. Estos oligonucleótidos son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO96/02555, WO99/33488 y US5.865.462. Los agonistas de TLR9 adecuados para su uso en las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento son CpG que  
30 contienen oligonucleótidos, que contienen opcionalmente dos o más motivos CpG dinucleótidos separados por al menos tres, de forma adecuada al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina.

35 En una realización, el enlace internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o posiblemente un enlace fosfortioato, aunque también se pueden usar enlaces de fosfodiéster y otros internucleótidos, incluyendo oligonucleótidos con uniones de internucleótidos mezclados. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosfortioato o fosforoditioato se describen en el documento US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204. Se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes uniones internucleótidos, por ejemplo, fosfodiésteres de fosfortioato mezclados. Se pueden usar otros enlaces internucleótidos que estabilicen el oligonucleótido.

40 Los ejemplos de oligonucleótidos CpG adecuados para su inclusión en las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento tienen las siguientes secuencias. En una realización, estas secuencias contienen uniones internucleótidas modificadas de fosfortioato.

45 OLIGO 1 (SEQ ID No: 9): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)  
OLIGO 2 (SEQ ID No: 10): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)  
OLIGO 3 (SEQ ID No: 11): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG  
OLIGO 4 (SEQ ID No: 12): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)  
OLIGO 5 (SEQ ID No: 13): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores ya que tienen deleciones o adiciones inconsecuentes de las mismas.

50 En una realización, el inmunoestimulante es un tocol. En la técnica se conocen bien los tocoles y se describen en el documento EP0382271. En una realización particular, el tocol es alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E).

55 Las composiciones inmunógenas de acuerdo con la invención se pueden usar en medicina, en particular para la profilaxis, el tratamiento o la mejora de infección por micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En general, las composiciones inmunógenas se proporcionarán por administración a seres humanos, aunque también pueden ser de valor en medicina veterinaria, tal como para su administración a bovinos.

Se proporciona el uso de una composición inmunógena de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento, en particular un medicamento para la profilaxis, el tratamiento o la mejora de infección por

micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium la tuberculosis*.

La composición inmunógena se puede proporcionar para el propósito de:

- tratar tuberculosis activa;
- profilaxis de tuberculosis activa, tal como administrar a un sujeto que está infectado, o alternativamente a un sujeto que tiene infección latente;
- tratar tuberculosis latente;
- profilaxis de tuberculosis latente, tal como administrar a un sujeto que no está infectado; o
- evitar o retrasar la reactivación de la tuberculosis, especialmente el retraso de la reactivación de TB, por ejemplo, durante un periodo de meses, años o incluso indefinidamente.

El término "infección activa" se refiere a una infección, por ejemplo, infección por *M. Tuberculosis*, con síntomas de enfermedad manifestada y/o lesiones, de forma adecuada con síntomas de enfermedad manifestada.

Los términos "infección inactiva", "infección en letargo" o "infección latente" se refieren a una infección, por ejemplo, infección por *M. Tuberculosis*, sin síntomas de enfermedad y/o lesiones manifestados, de forma adecuada sin síntomas de enfermedad manifestados. De forma adecuada, un sujeto con infección latente será uno que se evalúe como positivo para infección, por ejemplo, por ensayos basados en linfocitos T o PPD, pero que no haya demostrado los síntomas de enfermedad y/o lesiones que están asociados con una infección activa.

El término "tuberculosis primaria" se refiere a enfermedad clínica, por ejemplo, manifestación de síntomas de enfermedad, seguido directamente de infección, por ejemplo, infección por *M. tuberculosis*. Véase, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, capítulo 150, páginas 953-966 (16ª ed., Braunwald, y col., eds., 2005).

Los términos "tuberculosis secundaria" o "tuberculosis posprimaria" se refieren a la reactivación de una infección en letargo, inactiva o latente, por ejemplo, infección por *M. tuberculosis*. Véase, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, capítulo 150, páginas 953-966 (16ª ed., Braunwald, y col., eds., 2005).

El término "reactivación de tuberculosis" se refiere a la manifestación más tardía de síntomas de enfermedad en un individuo que se evalúa como positivo para una prueba de infección (por ejemplo, en una prueba cutánea para tuberculina, de forma adecuada en un ensayo basado en linfocitos T *in vitro*) pero no tiene síntomas de enfermedad aparentes. De forma adecuada, el individuo no se habrá vuelto a exponer a la infección. La prueba de diagnóstico positiva indica que el individuo está infectado, sin embargo, el individuo puede o no haber manifestado previamente síntomas de enfermedad activa que se hayan tratado suficientemente como para llevar la tuberculosis a un estado inactivo o latente.

De forma adecuada, se administra una composición inmunógena a un sujeto que no está infectado o que tiene una infección latente por micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

El volumen de la composición inmunógena administrada puede variar dependiendo de otros diversos factores, tales como la vía de administración específica, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intradérmica. Normalmente, el volumen administrado en una única inyección (la dosis unitaria) para un ser humano estará en el intervalo de 50 ul a 1 ml, tal como de 100 ul a 750 ul, especialmente de 400 a 600 ul, por ejemplo de aproximadamente 500 ul.

La cantidad de antígeno relacionado con M72 contenido dentro de una única dosis es dependiente de las necesidades clínicas pero una única dosis estará normalmente en el intervalo de 1 a 100 ug, tal como de 5 a 50 ug, por ejemplo de 5 a 20 ug. Una única dosis humana puede contener aproximadamente 10 ug de antígeno relacionado con M72.

De forma adecuada, las composiciones de la invención serán estables, lo que significa que durante el almacenamiento a 25 °C durante un periodo de 24 horas la antigenicidad, como se mide por las técnicas descritas en el presente documento, permanece al menos en un 80 % de la antigenicidad antes de su almacenamiento. De forma deseable, la antigenicidad permanecerá al menos en un 85 %, tal como al menos un 90 % y en particular al menos un 95 % después de su almacenamiento a 25 °C durante un periodo de 24 horas.

La presente invención se describirá ahora por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Preparación de composición coadyuvante ASA (sorbitol)**

Se preparó una composición coadyuvante que comprendía monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y QS21 en una formulación liposomal usando sorbitol como agente de tonicidad. Ésta se preparó como sigue:

#### **50 A. Procedimiento de preparación de liposomas:**

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado en un disolvente orgánico a vacío. Después, se añadió una solución acuosa (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 100 mM, fosfato 50

mM pH 6,1) y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Después, se prehomogeneizó esta suspensión con un mezclador de alto cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm ± 10 nm medido por DLS. Después, se filtraron de forma estéril los liposomas.

5 **B. Formulación ASA:**

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió tampón de fosfato Na<sub>2</sub>/K 100 mM pH 6,1, diluido 10 veces, a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de tampón de fosfato de 10 mM en la formulación final. Después se añadió un 30 % (p/v) de solución de sorbitol en agua para inyección (WFI) hasta alcanzar una concentración de un 4,7 % en la formulación final, esto se agitó durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

Después, se añadieron los liposomas concentrados (preparados de DOPC, colesterol y 3D-MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml y 2 mg/ml respectivamente) a la mezcla hasta alcanzar una concentración de 100 ug/ml de 3D-MPL en la formulación final.

Posteriormente, se agitó la mezcla durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

15 Etapa 2: Adición de QS21

Usando una bomba peristáltica, se añadieron existencias a granel de QS21 a los liposomas diluidos bajo agitación magnética hasta alcanzar una concentración de 100 ug/ml en la formulación final. Se agitó la mezcla durante de 15 a 45 minutos.

La formulación final ASA (sorbitol) contenía 2 mg de DOPC, 500 ug de colesterol, 100 ug de 3D-MPL/ml y 100 ug de QS21/ml, un 4,7 % de sorbitol y cloruro de sodio 5 mM y fosfato 10 mM.

Etapa 3: Se comprobó que el PH era 6,1 ± 0,1

Etapa 4: Filtración estéril

Se realizó la filtración estéril usando un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

Etapa 5: Almacenamiento a de +2 °C a +8 °C.

25 La composición coadyuvante obtenida, que comprendía MPL 3-des-O-acilado y QS21 en una formulación liposomal y que contenía sorbitol como agente de tonicidad (designado ASA (sorbitol)), se almacenó después a 4 °C.

**Ejemplo 2: Preparación de composición coadyuvante ASA (NaCl 150 mM)**

Se preparó una composición coadyuvante que comprendía monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y QS21 en una formulación liposomal usando cloruro de sodio como agente de tonicidad.

30 **A. Procedimiento de preparación de liposomas:**

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) en un disolvente orgánico a vacío. Después, se añadió solución salina tamponada con fosfato (NaCl 100 mM, fosfato 50 mM pH 6,1) y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Después, se prehomogeneizó esta suspensión con un mezclador de alto cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm ± 10 nm medido por DLS. Después se filtraron de forma estéril los liposomas sobre una membrana de PES de 0,22 um.

**B. Formulación ASA:**

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

40 Se añadió tampón de fosfato Na<sub>2</sub>/K 100 mM pH 6,45, diluido 10 veces y NaCl 1,5 M, a agua para inyección hasta alcanzar respectivamente concentraciones de fosfato 10 mM y NaCl 150 mM en la formulación final. Se agitó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron los liposomas concentrados (preparados de DOPC, colesterol y 3D-MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml y 2 mg/ml respectivamente) a la mezcla hasta alcanzar una concentración de 100 ug/ml de 3D-MPL en la formulación final. Posteriormente, se agitó la mezcla durante de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.

45 Etapa 2: Adición de QS21

Se añadieron existencias a granel de QS21 a los liposomas diluidos bajo agitación magnética hasta alcanzar una concentración de 100 ug/ml en la formulación final. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente.

Etapa 3: Se comprobó el pH para que fuera de 6,1 ± 0,1

Etapa 4: Filtración estéril

Se realizó la filtración estéril usando un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

Etapa 5: Almacenamiento a de +2 °C a +8 °C.

- 5 La composición final de ASA (NaCl 150 mM) era de 2 mg de DOPC, 500 ug de colesterol, 100 ug de MPL 3-des-O-acilado, 100 ug de QS21 por 1 ml, con fosfato 10 mM y NaCl 150 mM.

**Ejemplo 3: Actividad lítica de QS21**

10 Se sabe que QS21 lisa los glóbulos rojos (RBC). Se sometió a prueba la composición coadyuvante ASA (sorbitol) preparada como en el ejemplo 1 para asegurar que se desactivaba la actividad lítica de QS21 de la misma manera que se observó con la composición coadyuvante equivalente que comprendía NaCl 150 mM (ASA (NaCl 150 mM)).

15 Se midió la actividad lítica de QS21 por un ensayo de hemólisis usando glóbulos rojos de pollo (RBC). Se centrifugaron los RBC a 550 g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió cuidadosamente el sedimento en tampón PBS hasta alcanzar el volumen inicial y se repitió la misma operación hasta que el sobrenadante dejó de ser rojo (en general 3 veces). Se almacenó el sedimento a 4 °C durante de 3 a 4 días como máximo si no se usó directamente (y se lavó de nuevo el día que se usó) o se diluyó alrededor de 10 veces en el tampón si se usó el mismo día.

20 Se preparó una curva de intervalo de dosis de QS21 en un tampón ASA (en sal o en tampón de sorbitol seguido de la muestra ASA sometida a prueba) de forma extemporánea y se prepararon muestras de coadyuvante (que contenían un equivalente de 50 ug o 90 ug de QS21 es decir el equivalente de 500 ul o 900 ul de ASA). Se ajustó el volumen final hasta 900 ul en los estándares y las muestras con tampón adecuado (que contenían o no sorbitol como función del tampón de la muestra sometida a prueba). Debido a su opalescencia, ASA interfiere con la densidad óptica (DO). Los "blancos" de ASA se prepararon de este modo y se restó su DO de la DO de las muestras sometidas a prueba de ASA. Esos blancos correspondieron al mismo volumen de ASA que el volumen sometido a prueba en las muestras, pero ajustado a 1 ml con tampón. No se añadió RBC a estos blancos. Después, se incubaron los estándares y las muestras con RBC (100 ul de RBC diluido añadió a 900 ul de estándares y muestras) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Después, se centrifugaron las muestras 5 minutos a 900 g. Se midió la densidad óptica a 540 nm después de la centrifugación.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad lítica con una prueba límite.

1. Se definió el límite de detección (LDD) como la concentración más baja de QS21 que conduce a una DO:

- 30
- Mayor que el nivel de base (DO>0,1)
  - Alrededor de tres veces mayor que el tampón de DO (el "0 ug" de QS21)
  - En la parte ascendente de la curva
  - Determinado para cada prueba.

35 2. Se consideró que la actividad lítica de QS21 era positiva en las muestras coadyuvantes si la DO para la muestra coadyuvante era mayor que la DO<sub>LDD</sub>.

Curva de QS21 de ejemplo

ug QS21	DO	QS21 desactivado
0	0,029	NA
0,5	0,052	< LOD
0,6	0,073	< LOD
0,7	0,091	< LOD
0,8	0,096	< LOD
0,9	0,12	> 98,2%
1	0,195	> 98%
1,1	0,212	> 97,8%
1,2	0,348	> 97,6%
1,3	0,479	> 97,4%

(continuación)

ug QS21	DO	QS21 desactivado
1,4	0,612	> 97,2%
1,5	0,669	> 97%
2	1,139	> 96%
2,5	1,294	> 95%
3	1,391	> 94%
5	1,416	> 90%
Adyuvante*	0,03	> 98,2 %

\*50 ug de equivalente de QS21 sometido a prueba.  
Tampón de cloruro de sodio 150 mM.

Los datos anteriores se muestran gráficamente en la figura 1.

El Límite de detección en este ensayo está en 0,9 ug de QS21, y DO de 0,12

- 5 Se estimó que la desactivación de QS21 en una composición coadyuvante que comprendía cloruro de sodio 150 mM era de más de un 98,2 % para el equivalente de 50 ug de QS21 sometido a prueba. En el caso de un equivalente de 90 ug sometido a prueba, la conclusión es más de un 99 %.

- 10 Después, se comparó la desactivación de QS21 con una composición coadyuvante equivalente que comprendía sorbitol y cloruro de sodio de sólo 5 mM. Se generaron los datos después del almacenamiento de ASA a 4 °C o después de estabilidad acelerada (7 días a 37 °C). Para ASA en sorbitol, se realizó la curva estándar de QS21 en un tampón que contenía sorbitol.

Muestra	Punto temporal	LDD	QS21 desactivado
Composición coadyuvante (ASA) NaCl 150 mM	T0	< 1,4	> 97,2 %
	7 días a 37 °C	< 0,9	> 98,2 %
Composición coadyuvante (ASA) sorbitol, NaCl 5 mM	T0	< 2	> 97,8 %
	7 días a 37 °C	<1	> 96 %
	11 meses a 4 °C	<2	> 97,8 %*

Equivalente de 50 ug de QS21 sometido a prueba excepto \* equivalente de 90 ug de QS21 sometido a prueba.

Se concluyó que QS21 se desactivaba adecuadamente en un tampón de cloruro de sodio bajo.

#### Ejemplo 4: Congéneres de MPL.

- 15 Químicamente, 3D-MPL es una mezcla de un monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Cada molécula de 3D-MPL separada se denomina un congénere. Es importante que la composición de congénere permanezca constante, sin cambios entre la proporción de congéneres. También es importante que cualquier tampón usado permita que la composición de congénere sea la misma que en los liposomas concentrados usados para preparar la composición coadyuvante.
- 20 Como se muestra en la figura 2, se examinó la composición de congénere en liposomas concentrados de 3D-MPL (liposomas concentrados LIP07-217, primera columna de la figura 2), una composición coadyuvante que comprendía liposomas de 3D-MPL y QS21 en un tampón de NaCl 150 mM (coadyuvante NaCl 150 mM, o ASA (NaCl 150 mM), segunda columna), y una composición coadyuvante que comprendía liposomas de 3D-MPL y QS21 en un tampón de sorbitol y NaCl 5 mM (coadyuvante sorbitol, o ASA (sorbitol), columnas 3-7).
- 25 También se examinó la composición de congénere en dos lotes de coadyuvante ASA (sorbitol) en el día 0 y 7 días después de la preparación y se mantuvo a 37 °C para asegurar que no se producía evolución con el tiempo (véanse las últimas cuatro columnas de la figura 2).

Se determinó la distribución relativa de congéneres tetra-, penta- y hexa-acilados de MPL en liposomas concentrados o muestras de ASA (sorbitol) por detección IP-HPLC-Fluo (ARD). Se derivaron tanto los estándares como las muestras con dansilhidrazina, que introduce un cromóforo fluo-activo sobre el esqueleto disacárido. Se analizaron las muestras derivadas sobre una columna de fase inversa C18 usando hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) como reactivo de par iónico. Se eluyeron los congéneres que contenían el mismo número de grupos acilo grasos en distintos grupos (tetraacilo, pentaacilo y hexaacilo). Se deduce la distribución de congéneres comparando el área de pico de cada grupo con el área de pico total de todos los congéneres de MPL.

La figura 2 muestra el porcentaje de cada congénere. No se encontró ninguna diferencia significativa en la composición de congénere entre tampones coadyuvantes, y la composición de congénere era compatible con el tiempo en el tampón de sorbitol.

**Ejemplo 5: Preparación de composición coadyuvante ASA (sorbitol - 2)**

Se preparó una composición coadyuvante que comprendía monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y QS21, en un nivel reducido con relación al ejemplo 1, en una formulación liposomal usando sorbitol como agente de tonicidad. Ésta se preparó como sigue:

Se preparó el coadyuvante por dilución 1:1 de ASA (sorbitol), preparado de acuerdo con el ejemplo 1, con una solución que contenía fosfato 10 mM, NaCl 5 mM, 4,7 % de sorbitol a pH 6,1.

La formulación final ASA (sorbitol - 2) contenía 1 mg de DOPC, 250 ug de colesterol, 50 ug de 3D-MPL/ml y 50 ug de QS21/ml, un 4,7 % de sorbitol, cloruro de sodio 5 mM y fosfato 10 mM.

**Ejemplo 6: Preparación de composición coadyuvante ASA (sorbitol - 3)**

Se preparó una composición coadyuvante que comprendía monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y QS21, en un nivel reducido con relación al ejemplo 1, en una formulación liposomal usando sorbitol como agente de tonicidad. Ésta se preparó como sigue:

**A. Procedimiento de preparación de liposomas:**

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado en un disolvente orgánico a vacío. Después, se añadió una solución acuosa (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 100 mM, fosfato 50 mM pH 6,1]) y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Después, se prehomogeneizó esta suspensión con un mezclador de alto cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm ± 10 nm medido por DLS. Después, se filtraron de forma estéril los liposomas.

**B. Formulación ASA:**

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió tampón de fosfato Na<sub>2</sub>/K 100 mM pH 6,1, diluido 10 veces, a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de tampón de fosfato de 10 mM en la formulación final. Después se añadió un 30 % (p/v) de solución de sorbitol en agua para inyección (WFI) hasta alcanzar una concentración de un 4,7 % en la formulación final (esto se agitó durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente).

Después, se añadieron los liposomas concentrados (preparados de DOPC, colesterol y 3D-MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml y 2 mg/ml respectivamente) a la mezcla hasta alcanzar una concentración de 50 ug/ml de 3D-MPL en la formulación final.

Posteriormente, se agitó la mezcla durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 2: Adición de QS21

Usando una bomba peristáltica, se añadieron existencias a granel de QS21 a los liposomas diluidos bajo agitación magnética hasta alcanzar una concentración de 50 ug/ml en la formulación final. Se agitó la mezcla durante 15 minutos.

La formulación final ASA contenía 1 mg de DOPC, 250 ug de colesterol, 50 ug de 3D-MPL/ml y 50 ug de QS21/ml, un 4,7 % de sorbitol, cloruro de sodio 2,5 mM y fosfato 10 mM.

Etapa 3: Se comprobó que el PH era 6,1 ± 0,1

Etapa 4: Filtración estéril

Se realizó la filtración estéril usando un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

Etapa 5: Almacenamiento a de +2 °C a +8 °C.

La composición coadyuvante obtenida, que comprendía MPL 3-des-O-acilado y QS21 en una formulación liposomal y que contenía sorbitol como agente de tonicidad (designado ASA (sorbitol-3)), se almacenó después a 4 °C.

**Ejemplo 7: Preparación de composición coadyuvante ASA (NaCl 150 mM - 2)**

- 5 Se preparó una composición coadyuvante que comprendía monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y QS21, en un nivel reducido con relación al ejemplo 2, en una formulación liposomal usando cloruro de sodio como agente de tonicidad. Ésta se preparó como sigue:

**A. Procedimiento de preparación de liposomas:**

- 10 Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) en un disolvente orgánico a vacío. Después, se añadió solución salina tamponada con fosfato (NaCl 100 mM, fosfato 50 mM pH 6,1) y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión. Después, se prehomogeneizó esta suspensión con un mezclador de alto cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm ± 10 nm medido por DLS. Después se filtraron de forma estéril los liposomas sobre una membrana de PES de 0,22 µm.

**B. Formulación ASA:**Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

- 20 Se añadió tampón de fosfato Na<sub>2</sub>/K 100 mM pH 6,45, diluido 10 veces y NaCl 1,5 M, a agua para inyección hasta alcanzar respectivamente concentraciones de fosfato 10 mM y NaCl 150 mM en la formulación final. Se agitó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron los liposomas concentrados (preparados de DOPC, colesterol y 3D-MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml y 2 mg/ml respectivamente) a la mezcla hasta alcanzar una concentración de 50 µg/ml de 3D-MPL en la formulación final. Posteriormente, se agitó la mezcla durante de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 2: Adición de QS21

- 25 Se añadieron existencias a granel de QS21 a los liposomas diluidos bajo agitación magnética hasta alcanzar una concentración de 50 µg/ml en la formulación final. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente.

Etapa 3: Se comprobó el PH para que fuera de 6,1 ± 0,1Etapa 4: Filtración estéril

Se realizó la filtración estéril usando un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

Etapa 5: Almacenamiento a de +2 °C a +8 °C.

- 30 La composición final de ASA (NaCl 150 mM - 2) era de 1 mg de DOPC, 250 µg de colesterol, 50 µg de MPL 3-des-O-acilado, 50 µg de QS21 por 1 ml, fosfato 10 mM y NaCl 150 mM.

**Ejemplo 8: Preparación de antígenos de proteínas****M72 con dos restos de His N terminales (SEQ ID No: 3)**Construcción del vector de expresión de M72

- 35 Se generó una codificación de plásmido para la secuencia de aminoácidos de Mtb72f con una marca de 6-His adicional en el extremo N terminal por la unión secuencial en tándem de los marcos de lectura abiertos (ORF) que codificaban el fragmento C terminal de Mtb32a hasta el ORF longitud completa de Mtb39a seguido en el extremo C terminal con la porción N terminal de Mtb32a. Esto se llevó a cabo usando oligonucleótidos específicos de secuencia que contenían sitios de restricción única (EcoRI y EcoRV) y estaban desprovistos de los codones detención en los extremos C terminales (en el caso del fragmento C terminal de Mtb32a y Mtb39a) para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico de la cepa de *M. Tuberculosis* H37Rv. usando este vector como plantilla, se realizó una mutación de Ser706 a Ala estuvo por mutagénesis dirigida a sitio. Se verificó la orientación apropiada de los insertos así como la mutación Ser706Ala por secuenciación de ADN.

- 45 Para obtener el vector que codifica para M72, que sólo tiene 2 restos de His en el extremo N terminal, se borraron cuatro His haciendo uso de un sistema de mutagénesis dirigida a sitio comercial. Después de la verificación de la secuencia, extirpar la secuencia de codificación de M72 del plásmido por reacción enzimática, se purificó con gel y se ligó en un vector pET. Después, se verificó la secuencia del plásmido recombinante. Este plásmido codifica para M72 bajo el control de un promotor de T7. Se conduce la expresión de T7 ARN polimerasa a partir de un integrante genómico en el huésped de expresión y se induce usando un sistema basado en operón de lac (lacI) y una señal de inducción química de IPTG. Se proporciona el plásmido de expresión con resistencia a kanamicina.

50

Se transformó el plásmido que codifica para la proteína de fusión de M72 bajo el control de un promotor T7 en la cepa de HMS174 (DE3) de E.coli, usando un procedimiento de electroporación. Se secuenciaron la secuencia de codificación del inserto de M72 y las regiones flanqueantes en ambas cepas y se encontró que eran idénticas a la secuencia determinada de la construcción de plásmido original.

5 **Fermentación**

Se descongeló un vial de semilla de trabajo sedimentada a temperatura ambiente. Se preparó una predilución mezclando la semilla de trabajo con 4,9 ml de medio precultivo. Se usó 1 ml de la pre-dilución para inocular el precultivo líquido que consiste en 400 ml de medio precultivo complementado con 50 mg/l de sulfato de kanamicina y 10 g/l de glucosa.

10

Composición de medio precultivo

Ingrediente	Concentración		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,83 g/l		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,65 g/l		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,82 g/l		
Extracto de levadura	6,21 g/l		
Glicerol al 87 % (p/p)	14,54 ml/l		
Solución de metal y sal <sup>(1)</sup> : - FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O - MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	9,7 ml/l	3,3 g/l 58 g/l	
- Solución de microelementos <sup>(2)</sup> : - ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O - MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O - CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O - CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> - Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O - HCl 4N		116 ml/l	7,65 g/l 5,28 g/l 1,1 g/l 1,1 g/l 0,3 g/l 2,64 g/l 6,2 ml/l
Solución de biotina y CaCl <sub>2</sub> <sup>(2)</sup> : - Biotina - CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,97 ml/l	0,05 g/l 61,7 g/l	
El pH del medio está ajustado a 6,5 con solución de NaOH (25 %) Se filtra el medio a través de 0,22 µm			
(1) pH ajustado a 1,50 con solución de HCl (37 %); se filtra la solución a través de 0,22 µm			
(2) Se filtra la solución a través de 0,22 µm			

Se incubó el precultivo en un matraz de agitación de 2 litros a 30 °C bajo agitación (200 RPM) hasta que la DO<sub>650nm</sub> alcanzó un valor entre 2 y 4 (tiempo de incubación aproximado: 16 horas). En ese estadio, se inoculó un fermentador de 72 litros (volumen total) que contenía 45 litros de medio de cultivo complementado con 34 mg/l de sulfato de kanamicina con 52 ml de precultivo líquido.

15

Composición de medio de cultivo

Ingrediente	Concentración	
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,63 g/l	
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,056 g/l	
- Solución de microelementos <sup>(1)</sup> : - ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O - MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O - CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	1,91 ml/l	7,65 g/l 5,28 g/l 1,1 g/l

(continuación)

Ingrediente	Concentración	
- CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		1,1 g/l
- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,3 g/l
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O		2,64 g/l
- HCl 4N		6,2 ml/l
HCl 37 %	0,40 ml/l	
Extracto de levadura	35 g/l	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,10 g/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18,70 g/l	
Glutamato de sodio	2,5 g/l	
Glicerol 87 %	0,276 ml/l	
Glucosa	20 g/l	
Solución de biotina <sup>(2)</sup> :	0,22 ml/l	
- Biotina		1 g/l
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,21 g/l	
Se filtra la solución a través de 0,22 um		
(1) Se filtra la solución a través de 0,22 um		
(2) pH ajustado a 11,0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0,22 um		

5 Durante la fase de crecimiento, se mantuvo el pH a  $6,8 \pm 0,2$  por adición periódica de un 25 % (v/v) de NH<sub>4</sub>OH y un 25 % (v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Después de la incubación durante 16 horas a 30 °C, se inició la alimentación semicontinua con medio de alimentación.

Composición de medio de alimentación

Ingrediente	Concentración	
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,98 g/l	
Ingrediente	Concentración	
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,178 g/l	
- Solución de microelementos <sup>(1)</sup> :	6,02 ml/l	
- ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		7,65 g/l
- MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		5,28 g/l
- CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O		1,1 g/l
- CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		1,1 g/l
- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,3 g/l
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O		2,64 g/l
- HCl 4N		6,2 ml/l
HCl 37 %	1,24 ml/l	
Glutamato de sodio	5 g/l	
Extracto de levadura	40 g/l	
Glicerol 87 %	590 ml/l	
Solución de biotina <sup>(2)</sup> :	2 ml/l	
- Biotina		1 g/l
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,66 g/l	
Se filtra la solución a través de 0,22 um		
(1) Se filtra la solución a través de 0,22 um		
(2) pH ajustado a 11,0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0,22 um		

Se mantuvo la temperatura a 30 °C durante 2 horas adicionales, después se elevó hasta a 37 °C hasta el final de la fermentación. Se fijó de forma constante el flujo de aire a 75 l/min y se mantuvo el oxígeno disuelto a un 17 % de saturación por control de retroalimentación de la agitación y la presión. Se añadieron pequeñas cantidades de solución antiespumante según la demanda automáticamente. En el momento que DO<sub>650nm</sub> alcanzó un valor de 50 (±5), se añadió isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM para inducir la expresión de M72. La fermentación terminó después de 5 horas desde que se inició la inducción de punto temporal. Se enfrió el cultivo celular hasta 15 °C bajo agitación leve y se centrifugó (a 4 °C) para obtener sedimentos celulares que se almacenaron a continuación a -20 °C en alícuotas.

#### Aislamiento de cuerpos de inclusión

Se descongelaron los sedimentos celulares recogidos de la recolección a temperatura ambiente y se rompen en tampón de lisis (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0) con un homogeneizador de presión alta. A continuación, se centrifugó el lisado celular y se lavaron los sedimentos celulares resultantes (o cuerpos de inclusión, IB) con tampón de lavado que contenía urea, Tris y NaCl. Se solubilizaron los IB con tampón de solubilización que contenía urea 8 M y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. En primer lugar, se purificó esta solución filtrada por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de flujo rápido de Q Sepharose (QSFF). La elución de M72 tiene lugar con una solución de urea 6 M, bis-Tris propano 20 mM, NaCl 90 mM, pH 7,0.

Se purificó adicionalmente el M72 recogido por cromatografía de hidroxiapatita (HA), de la que se eluye con una solución de urea 6 M, bis-Tris propano 20 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0. Se concentró la fracción recogida con un casete de membrana de 30 kDa y se sometió a diafiltración frente a Tris 20 mM, pH 7,5. Después, se esterilizó M72 a través de un filtro de 0,22 µm. Después, se alícuotó la masa purificada y se almacenó a -70 °C.

#### **Ejemplo 9: Investigación de "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72 con diferentes concentraciones de sal a pH 6,1, 7,5 y 8,5.**

Se investigó el impacto de la concentración de cloruro de sodio y del pH en la estabilidad del antígeno de M72, evaluado por tamaño y antigenicidad.

#### **25 Procedimiento**

Se diluyó antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta una concentración de 100 µg/ml en tres tampones diferente (tampón fosfato 10mM a pH 6,1, tampón Tris 20 mM a pH 7,5 y tampón Tris 20 mM a pH 8,5) que contenían concentraciones de cloruro de sodio finales de 0, 50, 150, 300 y 450 mM.

Se analizaron inmediatamente las muestras (T0), se almacenó durante la noche a 4 °C antes de su análisis (T0 O/N) o se almacenó a 25 °C durante 24 horas antes de su análisis (T24h25 °C).

Se realizó DLS usando un Malvern Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments (Reino Unido). Se hizo funcionar el instrumento usando una longitud de onda de láser de 633 nm y una potencia de 4 mW. Se detectó luz dispersada a 173° a una temperatura de 22 °C. Se calculan el diámetro promedio Z (Zav) y el índice de polidispersidad (IP) por el software de instrumento.

Se realizó la nefelometría usando un Nepheloskan® Ascent, disponible de Thermo Fischer Scientific. Se realizó el análisis en microplacas transparentes UV Costar® disponibles de Corning Inc (EE.UU.).

Se cuantificó la antigenicidad por un ELISA de tipo sándwich en el que se captura el antígeno por un anticuerpo policlonal de conejo específico de M72 y posteriormente se revela por un anticuerpo monoclonal de ratón específico de M72(Mtb39). Se presentan todas los valores medidos con relación a la antigenicidad esperada basándose en la proteína a granel purificada usada para preparar las formulaciones sometidas a prueba.

#### **Resultados**

Los hallazgos de este experimento se presentan en las figuras de 3 a 5.

Los resultados demuestran por primera vez que la estabilidad de soluciones que contienen un antígeno relacionado con M72 es sensible tanto al pH como a la concentración de cloruro del sodio. El impacto del cloruro de sodio sobre el tamaño del antígeno y la antigenicidad es mucho más notable cuando el pH es menor.

El tamaño del antígeno y la antigenicidad no son estables a pH 6,1, incluso en ausencia de cloruro de sodio. La adición de cloruro de sodio 50 mM a pH 6,1 condujo a un incremento de tamaño de desde 35 nm (cloruro de sodio 0 mM a T0) hasta 58 nm (T0) o 79 nm después de 24 horas a 25 °C.

El tamaño de antígeno y la antigenicidad son relativamente estables a partir de 24 horas a 25 °C a pH 7,5 u 8,5, en particular en ausencia de cloruro de sodio o a una concentración de cloruro del sodio de 50 mM. No obstante, el incremento de la concentración de cloruro de sodio hasta 150 mM o mayor da como resultado un incremento claro en el tamaño del antígeno y una reducción en la antigenicidad.

**Ejemplo 10: Prevención de "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72, inmunostimulantes y que usan sorbitol como agente de tonicidad**

Para comparar la estabilidad de composiciones inmunógenas que contienen NaCl 150 mM con composiciones que usan sorbitol como agente de tonicidad, se monitorizó la estabilidad de varias muestras usando SEC-HPLC y ELISA.

**5 Procedimiento**

Se prepararon tres tortas de liofilización diferentes, de modo que cuando se combinan con las formulaciones coadyuvantes apropiadas de los ejemplos 5 y 7 se obtendría el pH deseado:

**(a) M72 con dos restos de His N terminales – pH objetivo 8.5 en vacuna reconstituida**

10 Se añadió un 15,75 % (p/v) de solución de sacarosa (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6,3 %. Después, se añadió un 3 % (p/v) de solución de Tween80 (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0,025 %. Después, se añadió tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 50 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta  
15 alcanzar una concentración de proteína de 25 ug/ml. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se encontró que era de 8,8.  
Se cargaron 0,5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, después se secó por congelación.

**(b) M72 con dos restos de His N terminales – pH objetivo 8.0 en vacuna reconstituida**

20 Se añadió un 15,75 % (p/v) de solución de sacarosa (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6,3 %. Después, se añadió un 3 % (p/v) de solución de Tween80 (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0,025 %. Después, se añadió tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 20 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta  
25 alcanzar una concentración de proteína de 25 ug/ml. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se encontró que era de 8,8.  
Se cargaron 0,5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, después se secó por congelación.

**(c) M72 con dos restos de His N terminales – pH objetivo 7.5 en vacuna reconstituida**

30 Se añadió un 15,75 % (p/v) de solución de sacarosa (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6,3 %. Después, se añadió un 3 % (p/v) de solución de Tween80 (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0,025 %. Después, se añadió tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 12,5 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta  
35 alcanzar una concentración de proteína de 25 ug/ml. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se encontró que era de 8,8.  
Se cargaron 0,5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, después se secó por congelación.

40 Se reconstituyeron las tortas de liofilización descritas anteriormente con 625 ul de las soluciones coadyuvantes preparadas en los ejemplos 5 y 7. Tras la reconstitución con solución coadyuvante, se obtuvieron las siguientes composiciones inmunógenas:

**(i) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH 8,5**

10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 40 mM  
45 0,02 % p/v de Tween80  
500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
50 NaCl 150 mM  
Fosfato 10 mM  
pH 8,5

**(ii) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH 8,0**

55 10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 16 mM  
0,02 % p/v de Tween80

## ES 2 567 190 T3

- 500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
NaCl 150 mM  
Fosfato 10 mM  
pH 8,0
- 5
- (iii) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH 7,5
- 10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 12,5 mM  
0,02 % p/v de Tween80  
500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
NaCl 150 mM  
Fosfato 10 mM  
pH 7,5
- 10
- 15
- (iv) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 8,5
- 10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 40 mM  
0,02 % p/v de Tween80  
500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
NaCl 5 mM  
4,7 % p/v de sorbitol  
Fosfato 10 mM  
pH 8,5
- 20
- 25
- 30
- (v) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 8,0
- 10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 16 mM  
0,02 % p/v de Tween80  
500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
NaCl 5 mM  
4,7 % p/v de sorbitol  
Fosfato 10 mM  
pH 8,0
- 35
- 40
- 45
- (vi) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 7,5
- 10 ug/ml de antígeno  
5 % p/v de sacarosa  
Tris 12,5 mM  
0,02 % p/v de Tween80  
500 ug de DOPC  
125 ug de colesterol  
25 ug de 3D-MPL  
25 ug de QS21  
NaCl 5 mM  
4,7 % p/v de sorbitol  
Fosfato 10 mM  
pH 7,5
- 50
- 55

Análisis de la muestra

Se caracterizaron las composiciones inmunógenas reconstituidas descritas anteriormente después del almacenamiento a 25 °C o 30 °C (T0, T6h y T24h).

5 Se realizó un análisis SEC-HPLC por inyección en un Supelco TSK-Gel5000Pwxl (ID 7,8 mm x 30 cm) equilibrado en tampón Tris 20 mM pH 8,5, detección por UV a 210 nm e índice de flujo de 0,5 ml/min.

Se cuantificó la antigenicidad por un ELISA de tipo sándwich en el que se captura el antígeno por un anticuerpo policlonal de conejo específico de M72 y posteriormente se revela por un anticuerpo monoclonal de ratón específico de M72(Mtb39). Se presentan todas los valores medidos con relación a la antigenicidad esperada basándose en la proteína a granel purificada usada para preparar las formulaciones sometidas a prueba.

10 **Resultados**

Los resultados se muestran en las figuras 6a-6d y 7.

15 Los perfiles de SEC-HPLC son estables tras la reconstitución en composiciones de sal baja usando sorbitol como agente de tonicidad en cada pH (es decir, pH 7,5, 8,0 y 8,5). Esto se puede contrastar con los perfiles de SEC-HPLC para composiciones inmunógenas que contienen NaCl 150 mM, que muestran cambios claros entre el perfil inicial obtenido y los que siguen al almacenamiento a 25 °C o 30 °C. Esta evolución se vuelve más intensa cuando se disminuye el pH de la composición de NaCl 150 mM.

Las mismas conclusiones se pueden extraer en términos de antigenicidad, permaneciendo las recuperaciones en gran parte estables tras la reconstitución en composiciones de sal baja usando sorbitol como agente de tonicidad a cada pH (es decir, pH 7,5, 8,0 y 8,5) hasta 24h a 30 °C.

20 **Ejemplo 11: Determinación de la conductividad para composiciones inmunógenas de la invención.**

Se midió la conductividad de una variedad de composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención y se comparó con la conductividad de soluciones de cloruro de sodio de control y con una composición inmunógena que contenía una cantidad convencional de cloruro de sodio.

**Procedimiento**

25 Se preparó una variedad de estándares que tenían concentraciones de cloruro del sodio de 0, 75, 100, 150, 250 y 300 mM a partir de una solución madre de cloruro de sodio 1500 mM por dilución en agua para inyección.

30 Se prepararon composiciones inmunógenas usando M72 con dos restos de His N terminales de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el ejemplo 8. Para investigar la contribución del propio antígeno y cualquier material residual en la masa purificada, también se prepararon tortas de liofilización de placebo excluyendo el componente de antígeno.

Usando un Malvern Zetasizer Nano y 1,5 ml de cada muestra en células de capilaridad plegadas, se aplicó un voltaje de 30 a 150 V (determinado automáticamente por el instrumento) y se determinó la conductividad.

**Resultados**

Conductividad de soluciones estándar de cloruro de sodio

Concentración de cloruro de sodio mM	Conductividad mS/cm
0	0,0
75	8,2
100	10,7
150	15,6
250	23,9
300	30,0

35

En la figura 8 se proporciona una curva estándar, basado en estos datos.

## Conductividad de soluciones de prueba

Descripción	Concentración de cloruro de sodio mM	Conductividad mS/cm	Concentración de cloruro de sodio equivalente mM
ASA (sorbitol – 2)	5	1,46	9
Placebo pH 8,0 / ASA(sorbitol – 2)	5	1,95	14
M72 pH 8,0 / ASA(sorbitol – 2)	5	1,96	14
Placebo pH 8,5 / ASA(sorbitol – 2)	5	2,36	18
M72 pH 8,5 / ASA(sorbitol – 2)	5	2,28	17
ASA(NaCl 150 mM – 2)	150	16	159
Placebo pH 8,5 / ASA(NaCl 150 mM – 2)	150	14,8	147
M72 pH 8,5 / ASA(NaCl 150 mM – 2)	150	15,3	152

Como se puede observar de los datos anteriores, la conductividad de soluciones que utilizan NaCl 150 mM es significativamente mayor que la de las soluciones que hacen un uso mínimo de NaCl.

- 5 El impacto del antígeno y cualquier componente en la masa purificada es mínimo, ya que las preparaciones de placebo tienen una conductividad comparable con su antígeno relacionado con M72 que contienen homólogos.

#### Ejemplo 12: Prueba de inmunogenicidad de composiciones inmunógenas de la invención.

- 10 El objetivo de este ejemplo era determinar si los cambios de formulación para reducir la cantidad de sal en composiciones inmunógenas de la invención, con vistas a mejorar la estabilidad de proteína, tenían o no un impacto sobre la inmunogenicidad *in vivo*.

#### Procedimiento

Se evaluaron cuatro composiciones inmunógenas:

1. M72 con dos restos de His N terminales pH 8,5/ASA (NaCl 150 mM – 2)
- 15 2. M72 con dos restos de His N terminales pH 8,5/ASA (sorbitol – 2)
3. M72 con dos restos de His N terminales pH 8/ASA (sorbitol – 2)
4. M72 con dos restos de His N terminales pH 7,5/ASA (sorbitol – 2)

- 20 Se evaluó la inmunogenicidad de estas composiciones que contenían antígenos en ratones C57BL/6. Para cada de las cuatro composiciones, se les inyectó 3 veces por vía intramuscular a 30 ratones C57BL/6, en los días 0, 14 y 28, con 1 ug de antígeno en 50 ul de solución coadyuvante (preparada por el procedimiento proporcionado en el ejemplo 10). Se midieron las respuestas de linfocitos T específicos de M72 elicitados (tanto CD4 como CD8) 6 días después de la última inmunización (6dPIII).

- 25 Para la determinación de respuestas celulares específicas de M72, se recogieron linfocitos de sangre periférica de 30 ratones/grupo y se almacenaron (seis grupos de cinco ratones/grupo). Se realizó una lisis de glóbulos rojos antes de sembrar en placas las células *in vitro*. Se reestimularon las células *in vitro* con un grupo de péptidos solapantes (péptidos 15-meros con un solapamiento de 11 aminoácidos, a 1 ug/ml/péptido) cubriendo la secuencia de M72 (sin los restos de His N terminales). Se usaron las células que permanecían en el medio (ninguna estimulación de péptido) para determinar las respuestas de fondo. Dos horas después del cocultivo con el grupo de péptidos, se añadió brefeldina A a los pocillos (para inhibir la excreción de citocinas) y se almacenaron las células durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se tiñeron las células por los siguientes marcadores: CD4, CD8, IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa.
- 30

#### Resultados

- 35 Cada punto de dato en las figuras 9 y 10 representa el fondo restado de respuesta de linfocitos T CD4 o CD8 específicos de M72, respectivamente, de un grupo de linfocitos de sangre periférica de cinco ratones seis días después de la tercera inmunización. La respuesta se expresa como el porcentaje de linfocitos T CD4 que producen IFN-gamma y/o IL-2 y/o TNF-alfa en respuesta a la simulación con el grupo de péptido de M72. La barra representa la mediana de las respuestas para cada grupo.

Los resultados en la figura 9 y 10 muestran que las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 comparables se inducen después de tres inmunizaciones con cada una de las formulaciones de prueba. En consecuencia, se puede concluir que una reducción en la cantidad de sales presentes en las composiciones inmunógenas de la presente invención no conduce a un compromiso en las respuestas de linfocitos T inducidos.

**5 Ejemplo 13: Investigación del "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72 con CaCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub> a pH 6,1 y 8,0.**

Para investigar el impacto de otras sales sobre la estabilidad del antígeno M72, las soluciones se prepararon con un intervalo de concentraciones de CaCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub> y a diferentes niveles de pH. La inspección visual se utilizó como una lectura de la estabilidad.

**10 Procedimiento**

Se diluyó antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 3) hasta una concentración de 100 ug/ml en dos tampones diferente (tampón succinato 10mM a pH 6,1, tampón Tris 10 mM a pH 8,0) que contenían cantidades especificadas de sales (NaCl 0 mM; 150 mM o 300 mM; CaCl<sub>2</sub> 40 mM, 80 mM o 160 mM; MgSO<sub>4</sub> 87,5 mM, 175 mM o 430 mM).

15 Se analizaron inmediatamente las muestras después de preparar.

Usando un medidor de la conductividad Mettler Toledo y 6 ml de cada muestra en un vial de vidrio siliconizado, se determinó la conductividad.

**Resultados**

<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Tampón</u>	<u>pH (teórico)</u>	<u>Conductividad (mS / cm)</u>	<u>pH (medido)</u>	<u>Observación Visual</u>
A	0 mM	Succinato 10mM	6,1	1,1	6,3	Transparente
B	NaCl 150 mM	Succinato 10mM	6,1	13,4	6,1	Transparente
C	NaCl 300 mM	Succinato 10mM	6,1	20,0	6,1	Transparente
D	CaCl <sub>2</sub> 40 mM	Succinato 10mM	6,1	8,0	6,1	Opalescente
E	CaCl <sub>2</sub> 80 mM	Succinato 10mM	6,1	11,2	5,8	Opalescente + partículas grandes
F	CaCl <sub>2</sub> 160 mM	Succinato 10mM	6,1	20,2	5,8	Opalescente + partículas grandes
G	MgSO <sub>4</sub> 87,5 mM	Succinato 10mM	6,1	7,7	6,1	Opalescente
H	MgSO <sub>4</sub> 175 mM	Succinato 10mM	6,1	12,4	5,9	Opalescente + partículas muy grandes
I	MgSO <sub>4</sub> 430 mM	Succinato 10mM	6,1	20,4	5,9	Opalescente + partículas muy grandes
J	0 mM	Tris 10mM	8,0	0,463	8,0	Transparente
K	NaCl 150 mM	Tris 10mM	8,0	12,13	8,0	Transparente
L	NaCl 300 mM	Tris 10mM	8,0	21,1	8,0	Transparente
M	CaCl <sub>2</sub> 40 mM	Tris 10mM	8,0	6,7	8,1	Partículas grandes
N	CaCl <sub>2</sub> 80 mM	Tris 10mM	8,0	10,8	8,0	Opalescente + partículas grandes

(continuación)

<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Tampón</u>	<u>pH (teórico)</u>	<u>Conductividad (mS / cm)</u>	<u>pH (medido)</u>	<u>Observación Visual</u>
O	CaCl <sub>2</sub> 160 mM	Tris 10mM	8,0	19,7	8,0	Opalescente + partículas grandes
P	MgSO <sub>4</sub> 87,5 mM	Tris 10mM	8,0	7,5	8,0	Partículas grandes
Q	MgSO <sub>4</sub> 175 mM	Tris 10mM	8,0	10,9	8,2	Opalescente + partículas muy grandes
R	MgSO <sub>4</sub> 430 mM	Tris 10mM	8,0	21,7	8,1	Opalescente + partículas muy grandes

5 Los resultados demuestran que las soluciones que contienen un antígeno relacionado con M72 pueden ser sensibles a otras sales aparte de cloruro del sodio. El impacto del CaCl<sub>2</sub> o el MgSO<sub>4</sub> parece ser mucho más pronunciado que para el cloruro sódico a concentraciones o conductividad comparables.

**Ejemplo 14: Investigación de "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden Mtb72f con diferentes concentraciones de sal a pH 6,1, 7,5 y 8,5.**

Se investigó el impacto de la concentración de cloruro del sodio y del pH sobre la estabilidad del antígeno de Mtb72f, evaluado por tamaño.

10 **Procedimiento**

Se diluyó antígeno a granel purificado (Mtb72f con 6 restos de His, SEQ ID No: 7) hasta una concentración de 100 ug/ml en tres tampones diferente (tampón fosfato 10mM a pH 6,1, tampón Tris 20 mM a pH 7,5 y tampón Tris 20 mM a pH 8,5) que contenían concentraciones de cloruro de sodio finales de 0, 50, 150, 300 y 450 mM.

Las muestras se almacenaron durante 24 horas a 4 °C o 25 °C antes de analizar.

15 La nefelometría se realizó usando un Nepheloskan® Ascent, disponible en Thermo Fischer Scientific. Se realizó el análisis en microplacas transparentes UV Costar® disponibles de Corning Inc (EE.UU.).

Se realizó DLS usando un Dynapro Plate Reader de Wyatt Instruments. Se hizo funcionar el instrumento usando una longitud de onda de láser de 830 nm y una potencia de 50 mW. Se detectó luz dispersada a 153° a una temperatura de 22 °C. Se calculan el diámetro promedio y el índice de polidispersidad (IP) por el software de instrumento.

20 **Resultados**

Los hallazgos de este experimento se presentan en las figuras 11 y 12.

25 Tanto la DLS como la nefelometría demuestran una tendencia general de que Mtb72f es sensible a la concentración de sales y al pH, de una manera similar a M72, como se muestra en los ejemplos anteriores. En consecuencia, los beneficios de la presente invención se aplican a los antígenos relacionados M72 y no sólo a la propia secuencia de M72.

En el caso de un número de muestras de DLS, la instrumentación no pudo determinar un tamaño de partícula específico (mostrado como NV en la Figura 12).

**Ejemplo 15: Prevención del "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72, inmunoestimulantes y que usan sorbitol como agente de tonicidad**

30 Para comparar la estabilidad de composiciones inmunógenas que contienen NaCl 150 mM con composiciones que usan sorbitol como agente de tonicidad, se monitorizaron las muestras usando un ELISA alternativo.

**Procedimiento**

35 Se preparó la torta de liofilización como se ha descrito en el ejemplo 10 (específicamente el procedimiento (a)), de modo que cuando se combinan con las formulaciones coadyuvantes apropiadas del ejemplo y 7 se obtendría un pH de 8,5.

La torta de liofilización descrita anteriormente se reconstituyó con 625 ul de las soluciones de coadyuvantes preparados en el Ejemplo 7. Después de la reconstitución con solución de coadyuvante, se obtuvieron las siguientes composiciones inmunógenas:

(i) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (150 mM NaCl - 2) pH 8,5

- 5 10 ug de antígeno (20 ug/ml)
- 5 % p/v de sacarosa
- Tris 40 mM
- 0,02 % p/v de Tween80
- 500 ug de DOPC
- 125 ug de colesterol
- 25 ug de 3D-MPL
- 25 ug de QS21
- 10 NaCl 150 mM
- Fosfato 10 mM
- pH 8,5

(ii) M72con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol - 2)) pH 8,5

- 15 10 ug de antígeno (20 ug/ml)
- 5 % p/v de sacarosa
- Tris 40 mM
- 0,02 % p/v de Tween80
- 500 ug de DOPC
- 125 ug de colesterol
- 25 ug de 3D-MPL
- 25 ug de QS21
- NaCl 5 mM
- 4,7% p/v de sorbitol
- Fosfato 10 mM
- 25 pH 8,5

Las composiciones inmunógenas descritas anteriormente reconstituidas se caracterizaron después de almacenamiento a 30 °C (T24h) y se compararon con una muestra preparada extemporáneamente (TO).

La antigenicidad se cuantificó mediante un sándwich de tipo ELISA indirecto en el que el antígeno es capturado por un anticuerpo policlonal de conejo específico de M72 y posteriormente se reveló mediante un anticuerpo monoclonal de ratón específico de M72 (Mtb39). Brevemente, la placa se recubre con anticuerpo policlonal de conejo anti-M72 a la dilución de 1/8000 en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco a 4 °C y después de cuatro lavados se bloquearon las placas durante 1 hora a 37 °C con tampón de saturación (PBS, 0,1 % de Tween 20, 1 % de BSA). Después de la etapa de lavado, el patrón de proteína (M72 purificado a granel: 1950 ug/ml), control interno (M72: 1768 µg/ml) y las muestras se cargan en pocillos de la primera columna de la placa a una concentración de aproximadamente 0,25µg/ml y después se realiza una dilución en serie por dos en el tampón de saturación (PBS, 0,025% de Tween 20) del pocillo 1 al 12 y se incubó 1h30 a 37 °C. Después de la etapa de lavado, el complejo inmune se incubó después 1h a 37 °C con anticuerpo monoclonal anti-M72 a una dilución de 1/1000 en tampón de saturación (PBS, 0,025 % de Tween 20). Después de cuatro lavados, se añadió un anticuerpo policlonal anti-ratón de conejo biotinilado a una dilución de 1/1000 en tampón de saturación (PBS, 0,025 % de Tween 20). Después de cuatro lavados, la señal se amplificó mediante la adición de peroxidasa de rábano con estreptavidina diluida a 1/4000 en tampón de saturación (PBS, 0,025 % de Tween 20). Después de cuatro lavados, la señal se reveló mediante orto diclorhidrato de fenilendiamina (OPDA) durante 15 minutos a TA y la reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1M. La coloración es proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-M72 unido, y se mide a 490 nm y 620 nm. Todas las etapas de lavado se realizaron con PBS, 0,025 % de Tween 20.

45 Todos los valores medidos se presentan en relación con la antigenicidad esperada sobre la base de la proteína purificada a granel utilizada para preparar las formulaciones ensayadas.

**Resultados**

Los resultados se muestran en la Figura 13. Los rombos indican las mediciones específicas para cada una de las tres muestras de ensayo, con una línea que indica el valor medio.

50 La recuperación de antígeno es bastante estable después de la reconstitución en composiciones de sal bajas utilizando sorbitol como agente de tonicidad a un pH de 8,5 hasta 24 horas a 30 °C. La recuperación de ASA (sorbitol-2) fue del 83,5 % después de 24 horas (T0 87,1%, es decir, el 95,9 % de la antigenicidad relativa se mantuvo), mientras que la recuperación de ASA (NaCl-2) fue de 54,5 % después de 24 horas (T0 81,0 %, es decir, sólo el 67,3 % de la antigenicidad relativa se mantuvo después del almacenamiento).

55 En resumen, los Ejemplos 9, 10 y 15 demuestran por primera vez que el impacto perjudicial resultante del pH y la concentración de NaCl sobre la estabilidad de composiciones inmunógenas que contienen un antígeno relacionado con M72. Ejemplo 13 extiende este trabajo para demostrar que otras sales también pueden tener un impacto

perjudicial sobre la estabilidad de composiciones inmunógenas que contienen un antígeno relacionado con M72, demostrando el Ejemplo 14 que el efecto es también aplicable a secuencias relacionadas con M72.

5 La reformulación de las composiciones inmunógenas con un agente de tonicidad no iónico aborda los problemas de estabilidad del antígeno. Además, los Ejemplos 3, 4 y 12 demuestran la eliminación de sustancialmente todo el NaCl de la formulación inmunógena y su sustitución con sorbitol como un agente de tonicidad no tiene un impacto perjudicial sobre la estimulación de respuestas de células T.

10 La estabilidad de composiciones inmunógenas es clave y puede ser particularmente difícil en lugares aislados donde la refrigeración puede no ser fácilmente accesible. Mediante la reducción de la presencia de sales en las composiciones inmunógenas, los presentes inventores han sido capaces de reducir la extensión de los cambios observados cuando se almacenan las composiciones inmunógenas.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> GlaxoSmithKline Biologicals sa  
Godart, Stephane  
Laanan, Amina  
Lemoine, Dominique

<120> Composiciones novedosas

20 <130> VB64442

<150> US61/422723  
<151> 14-12-2010

25 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1  
<211> 723  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Proteína de fusión M72

<400> 1

ES 2 567 190 T3

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
 1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
 35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
 50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp  
 65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
 85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
 100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
 115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
 130 135 140

ES 2 567 190 T3

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
 145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
 165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
 180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
 195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
 210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
 225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
 245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn  
 260 265 270

Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe  
 275 280 285

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320

Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365

His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380

Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400

ES 2 567 190 T3

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala  
 435 440 445  
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln  
 450 455 460  
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly  
 485 490 495  
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val  
 500 505 510  
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile  
 515 520 525  
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 530 535 540  
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 545 550 555 560  
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
 565 570 575  
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
 580 585 590  
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln  
 595 600 605  
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
 610 615 620  
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly



ES 2 567 190 T3

gccgcggtcg aggaggcctc cgacaccgcc ggggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020  
 caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080  
 ggctgtgga agacggtctc gccgatcggc tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140  
 aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaaacctt gagctcgatg 1200  
 ttgaagggct ttgctccggc ggcggccgcc caggccgtgc aaaccgaggc gaaaaacggg 1260  
 gtccggggca tgagctcgtc gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggg 1320  
 gccccaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcctgggcc 1380  
 gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440  
 gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggggggctgc cggtggggca gatggggccc 1500  
 agggccggtg gtgggtcag tgggtgtgctg cgtgttcgca cgcgacctta tgtgatgccg 1560  
 cattctcggc cagccggoga tatcgcoccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcggcagc 1620  
 ttccccggc tgccctcga cccgtccggc atggctgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680  
 aacatcaaca ccaactggg ctacaacaac gccgtgggca cggggaccgg catcgtcatc 1740  
 gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800  
 gcgttcagcg tcggtccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860  
 caggatgtcg cgggtgtgca gctgcgoggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcgg 1920  
 ggcgccgtcg cggttggtga gcccgctgctc gogatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980  
 acgcccgtg cgggtcctgg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040  
 tcgtgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100  
 cccggtgatg cgggcgggcc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160  
 gccgcgtcct ag 2172

<210> 3  
 <211> 725  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Fusión de M72 con 2 restos de His adicionales

10

<400> 3

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly  
 1 5 10 15

Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln  
 20 25 30

Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala



ES 2 567 190 T3

Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu  
 290 295 300

Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu  
 305 310 315 320

Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln  
 325 330 335

Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr  
 340 345 350

Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val  
 355 360 365

Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn  
 370 375 380

His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser  
 385 390 395 400

Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln  
 405 410 415

Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser  
 420 425 430

Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala  
 450 455 460

Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu  
 465 470 475 480

Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro  
 485 490 495

Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu  
 500 505 510

Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly  
 515 520 525

Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro  
 530 535 540

ES 2 567 190 T3

Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln  
 545 550 555 560

Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala  
 565 570 575

Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn  
 580 585 590

His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser  
 595 600 605

Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp  
 610 615 620

Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala  
 625 630 635 640

Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn  
 645 650 655

Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val  
 660 665 670

Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu  
 675 680 685

Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly  
 690 695 700

Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met  
 705 710 715 720

Asn Thr Ala Ala Ser  
 725

<210> 4

<211> 2178

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación para fusión de M72 con 2 restos de His adicionales

<400> 4

atgcatcaca cggcgcgctc cgataacttc cagctgtccc agggctgggca gggattcgcc 60

attccgatcg ggcaggggat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120

accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180

ES 2 567 190 T3

ggcgacagag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240  
 ggcgacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300  
 gcgcttaacg ggcatcatcc cggtagcgtc atctcgggtga cctggcaaac caagtccggc 360  
 ggcacgcgta cagggaaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420  
 ttccggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc 480  
 tcgctggtgg ccgcggctca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttccggccgcg 540  
 tcggcgtttc agtcggtggt ctggggtctg acgggtgggt cgtggatagg ttctgcggcg 600  
 ggtctgatgg tggcggcggc ctcccgctat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag 660  
 gccgagctga ccgccccca ggtccgggtt gctgcggcgg cctaccgagac ggcgatggg 720  
 ctgacgggtgc ccccgccggt gatcccgag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780  
 accaacctct tggggcaaaa caccocggcg atcccggtca acgaggccga atacggcgag 840  
 atgtgggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg 900  
 gcgacgttgc tgcggttoga ggaggcgccg gagatgacca gcgcggtgg gctcctcagag 960  
 caggccgccg cggtcgagga ggcctccgac accgcccgcg cgaaccagtt gatgaacaat 1020  
 gtgccccagg cgctgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080  
 ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgcg catcggctgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140  
 atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa cacctgagc 1200  
 tcgatgttga aggccttgc tcggcgcgcg gccgccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa 1260  
 aacggggtcc gggcgatgag ctccgctggc agctcgcctg gttcttcggg tctgggcggt 1320  
 ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttgtcggg gccgcaggcc 1380  
 tgggcccggc ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgctgccgct gaccagcctg 1440  
 accagcgccg cggaaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg 1500  
 ggcgccaggg ccggtggtgg gctcagtggg gtgctgcgtg ttccgcccg accctatgtg 1560  
 atgccgcatt ctccggcagc cggcgatata gccccgccg ccttgtcga ggaccggttc 1620  
 gccgacttcc ccgcgctgcc cctcgacccg tccgcgatgg tcgccaagt ggggccacag 1680  
 gtggtcaaca tcaaacacaa actgggctac aacaacgccg tgggcgcccg gaccggcatc 1740  
 gtcacgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg gccaccgac 1800  
 atcaatgctg tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac 1860  
 cgcaccagg atgtccggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcgggc 1920  
 atcgggtggc gcgtccgggt tggtagccc gtcgtcgcga tgggcaacag cggtgggcag 1980  
 ggcggaaacgc ccgctgcggt gcctggcagg gtggtcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040

ES 2 567 190 T3

tcggattcgc tgaccgggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccgcg 2100  
 atccagcccg gtgatgoggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg 2160  
 aacacggccg cgtcctag 2178

<210> 5  
 <211> 723  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Fusión de Mtb72f

<400> 5

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
 35 40 45  
 Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
 50 55 60  
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp  
 65 70 75 80  
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
 85 90 95  
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
 100 105 110  
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
 115 120 125  
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
 130 135 140  
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
 165 170 175  
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
 180 185 190

ES 2 567 190 T3

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
 210 215 220  
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
 245 250 255  
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn  
 260 265 270  
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe  
 275 280 285  
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300  
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335  
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365  
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380  
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala



ES 2 567 190 T3

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser  
 690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
 705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 6  
 <211> 2172  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de codificación para fusión de Mtb72f

<400> 6

atgacggcgg cgtcogataa cttccagctg tcccagggtg ggcagggatt cgccattccg 60  
 atcggggcagg cgatggcgat cgcggggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccacggtt 120  
 catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtggtgtcg acaacaacgg caacggcgca 180  
 cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgcctcg gcggaagtc tcggcatctc caccggcgac 240  
 gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300  
 aacgggcata atcccggtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360  
 cgtacagggg acgtgacatt ggccgagggg ccccgggccg aattcatggt ggatttcggg 420  
 gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgcgg gcccgggttc ggccctcgctg 480  
 gtggcccgcg ctcagatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540  
 tttcagtcgg tggctcgggg tctgacggtg gggtcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600  
 atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag 660  
 ctgaccgccc cccaggtccg ggttgctcgg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720  
 gtgccccgcg cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780  
 ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcggg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840  
 gcccaagaag ccgcccgat gtttggtac gcccgggcga cggcgacggc gacggcgacg 900  
 ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcggcg gtgggctcct cgagcaggcc 960  
 gccgcggtcg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020  
 caggcgtcgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080  
 ggccctgtgga agacggtctc gccgatcggg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140  
 aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200  
 ttgaagggct ttgctccggc ggcggccgcc caggccgtgc aaaccgccc gcaaacggg 1260

ES 2 567 190 T3

gtccggggcga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320  
 gccgccaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcggtgt cggtgccgca ggctggggcc 1380  
 gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440  
 gccgcgaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cgggtgggca gatgggcgcc 1500  
 agggccggtg gtgggctcag tgggtgctg cgtgttcgce cgcgacceta tgtgatccg 1560  
 cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcggccac 1620  
 ttccccgccc tgcccctcga cccgtccgcy atggctgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680  
 aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcy cggggaccgy catcgtcatc 1740  
 gatcccaacy gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatog cgggcgccac cgacatcaat 1800  
 gcgttcagcy tccgctccgy ccaaactac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860  
 caggatgctg cgggtgctgca gctgcgcggt gccggtgggc tgccgctggc ggcgatcggg 1920  
 ggcggcgtcg cggttggtga gcccgctgct gcgatgggca acagcgggtg gcagggcggc 1980  
 acgccccgtg cgggtgcctg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040  
 tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100  
 cccggtgatt cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160  
 gccggtcct ag 2172

<210> 7

<211> 729

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión de Mtb72f con 6 restos de His adicionales

<400> 7

Met His His His His His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu  
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala  
 20 25 30

Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile  
 35 40 45

Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn  
 50 55 60

Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu  
 65 70 75 80

ES 2 567 190 T3

Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile  
85 90 95

Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly  
100 105 110

Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr  
115 120 125

Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp  
130 135 140

Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly  
145 150 155 160

Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val  
165 170 175

Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp  
180 185 190

Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val  
195 200 205

Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln  
210 215 220

Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu  
225 230 235 240

Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg  
245 250 255

Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr  
260 265 270

Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln  
275 280 285

Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr  
290 295 300

Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly  
305 310 315 320

Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala  
325 330 335

Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu  
 340 345 350

Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu  
 355 360 365

Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser  
 370 375 380

Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr  
 385 390 395 400

Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala  
 405 410 415

Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser  
 420 425 430

Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala  
 435 440 445

Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala  
 450 455 460

Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro  
 465 470 475 480

Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu  
 485 490 495

Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu  
 500 505 510

Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser  
 515 520 525

Pro Ala Ala Gly Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe  
 530 535 540

Ala Asp Phe Pro Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln  
 545 550 555 560

Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn  
 565 570 575

Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val  
 580 585 590

ES 2 567 190 T3

Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe  
 595 600 605

Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp  
 610 615 620

Arg Thr Gln Asp Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu  
 625 630 635 640

Pro Ser Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val  
 645 650 655

Ala Met Gly Asn Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro  
 660 665 670

Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu  
 675 680 685

Thr Gly Ala Glu Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala  
 690 695 700

Ile Gln Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln  
 705 710 715 720

Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser  
 725

<210> 8  
 <211> 2190  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de codificación para fusión de M72 con 6 restos de His adicionales

<400> 8

atgcatcacc atcaccatca cacggcgcgc tccgataact tccagctgtc ccaggggtggg 60  
 cagggattcg ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt 120  
 ggggggtcac ccaccgttca tatcgggcoct accgccttcc tcggcttggg tgttgtcgac 180  
 aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga ggcctccggc ggcaagtctc 240  
 ggcattctca cgggcgacgt gatcaccgcg gtcgacggcg ctccgatcaa ctccggccacc 300  
 gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat cccggtgacg tcatctcggg gacctggcaa 360  
 accaagtcgg gcggcacgcg tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa 420  
 ttcatggtgg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgagggat gtacgcccgc 480

ES 2 567 190 T3

ccgggttcg cctcgctggt ggccgcggt cagatgtggg acagcgtggc gagtgacctg 540  
 ttttcggccg cgtcggcggt tcagtcgggt gtctggggtc tgacggtggg gtcgtggata 600  
 ggttcgctcg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgccgt atgtggcgtg gatgagcgtc 660  
 accgcggggc aggcgagct gaccgccc caggtccggg ttgctcgggc ggcctacgag 720  
 acggcgtatg ggctgacggt gccccgccc gtgatogccg agaaccgtgc tgaactgatg 780  
 attctgatag cgaccaacct cttggggcaa aacaccccgg cgatcgggt caacgagccc 840  
 gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcggcgacg 900  
 gcgacggcga cggcgacggt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcgggt 960  
 gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctccg acaccgccc ggcgaaccag 1020  
 ttgatgaaca atgtgcccc ggcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080  
 ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcctcgggt gccgatcagc 1140  
 aacatggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200  
 aacacctga gctcgatgtt gaagggcttt gctccggcgg cggccgccc ggcctgcaa 1260  
 accgcgggc aaaacggggt ccggcgatg agctcgtgg gcagctcgt gggttcttcg 1320  
 ggtctggcgc gtgggggtgc cgccaacttg ggtcgggcgg cctcggtcgg tcggtgtcg 1380  
 gtgccgcagg cctgggccc gcccaaccag gcagtcaccc cggcggcgc ggcgctgccg 1440  
 ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggcccgggc agatgctggg cgggctgccg 1500  
 gtggggcaga tggggcccag ggcgggtggt gggctcagtg gtgtgctgog tgttccgccg 1560  
 cgaccctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggccttgtcg 1620  
 caggaccggt tcgcccactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtcccgat ggtcgcccaa 1680  
 gtggggccac aggtggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc 1740  
 gggaccgca togtcatcga tcccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800  
 ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctcggcc aacctaagg cgtcgatgtg 1860  
 gtcgggtatg accgcaccca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgogcgggtc cgggtggcctg 1920  
 ccgtcggcgg cgatcgggtg cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980  
 agcgggtggc agggcggaac gcccgtgcg gtgcctggca gggtggtcgc gctcggccaa 2040  
 accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100  
 ttcgatgcog cgatccagcc cggtgattcg ggcgggccc tcgtcaacgg cctaggacag 2160  
 gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cpg Oligo 1 - CpG 1826

10

ES 2 567 190 T3

	<400> 9 tccatgacgt tcctgacgtt	20
5	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> CpG Oligo 2 - CpG 1758	
	<400> 10 tctcccagcg tgcgcat	18
15	<210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> CpG Oligo 3	
25	<400> 11 accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
30	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CpG Oligo 4 - CpG 2006	
35	<400> 12 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt	24
40	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CpG Oligo 5 - CpG 1686	
45	<400> 13 tccatgacgt tcctgatgct	20

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1, el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0 y la conductividad de la composición es de 5 mS/cm o menor.
- 5 2. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la conductividad de la composición es de 4 mS/cm o menor.
3. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la conductividad de la composición es de 3 mS/cm o menor.
- 10 4. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 40 mM o menor.
5. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agente de tonicidad no iónico.
6. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el agente de tonicidad no iónico es un poliol.
- 15 7. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el poliol es sorbitol y en la que la concentración de sorbitol es de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6 % (p/v).
8. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración de sacarosa es de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6 % (p/v).
- 20 9. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además uno o más inmunostimulantes.
10. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición inmunógena comprende QS21.
11. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que la composición inmunógena comprende monofosforil lípido A 3-des-O-acilado.
- 25 12. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la osmolalidad es de 250 a 750 mOsm/kg.
13. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición se proporciona como dosis unitaria de entre 50 ul y 1 ml.
- 30 14. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la dosis unitaria contiene de 5 a 50 ug de la proteína relacionada con M72.
15. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que una dosis unitaria es una dosis humana y contiene entre 1 y 100 ug de 3D-MPL.
16. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que una dosis unitaria es una dosis humana y contiene entre 1 y 100 ug de QS21.
- 35 17. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,5 a 8,5.
18. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 3.
- 40 19. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1.
20. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 3.
21. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en medicina.
- 45 22. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para su uso en un procedimiento para la profilaxis, tratamiento o mejora de una infección por micobacterias.

23. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, para administración a un ser humano.

Figura 1

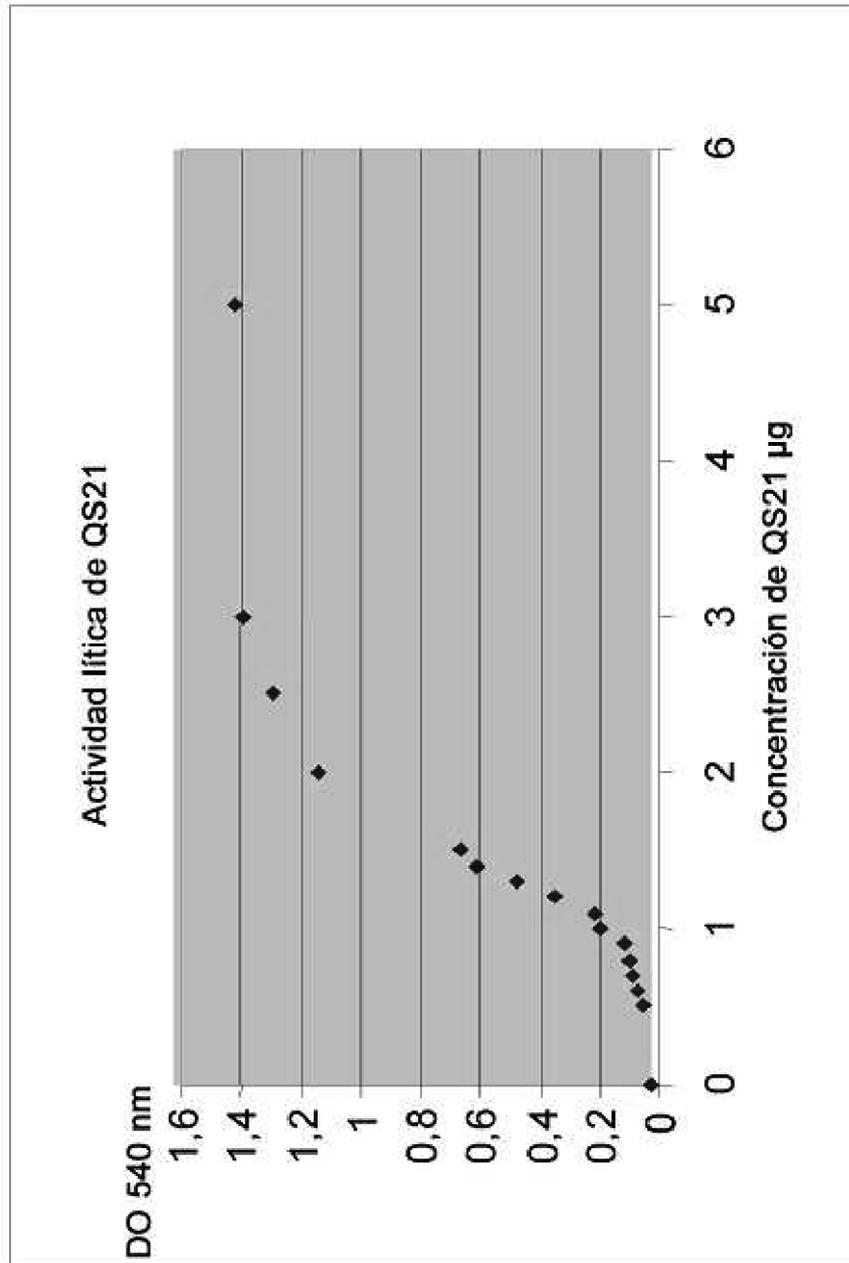


Figura 2

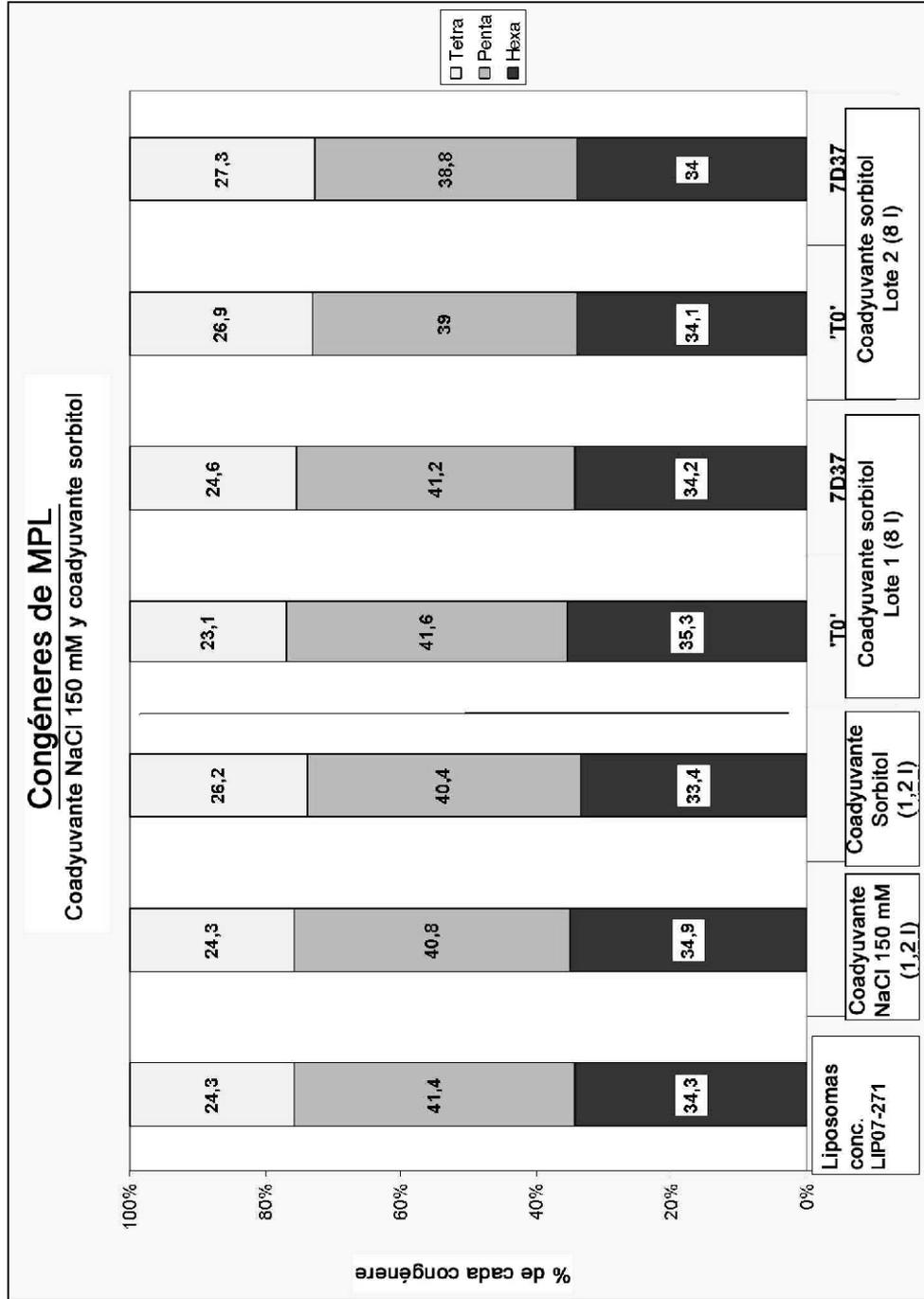


Figura 3

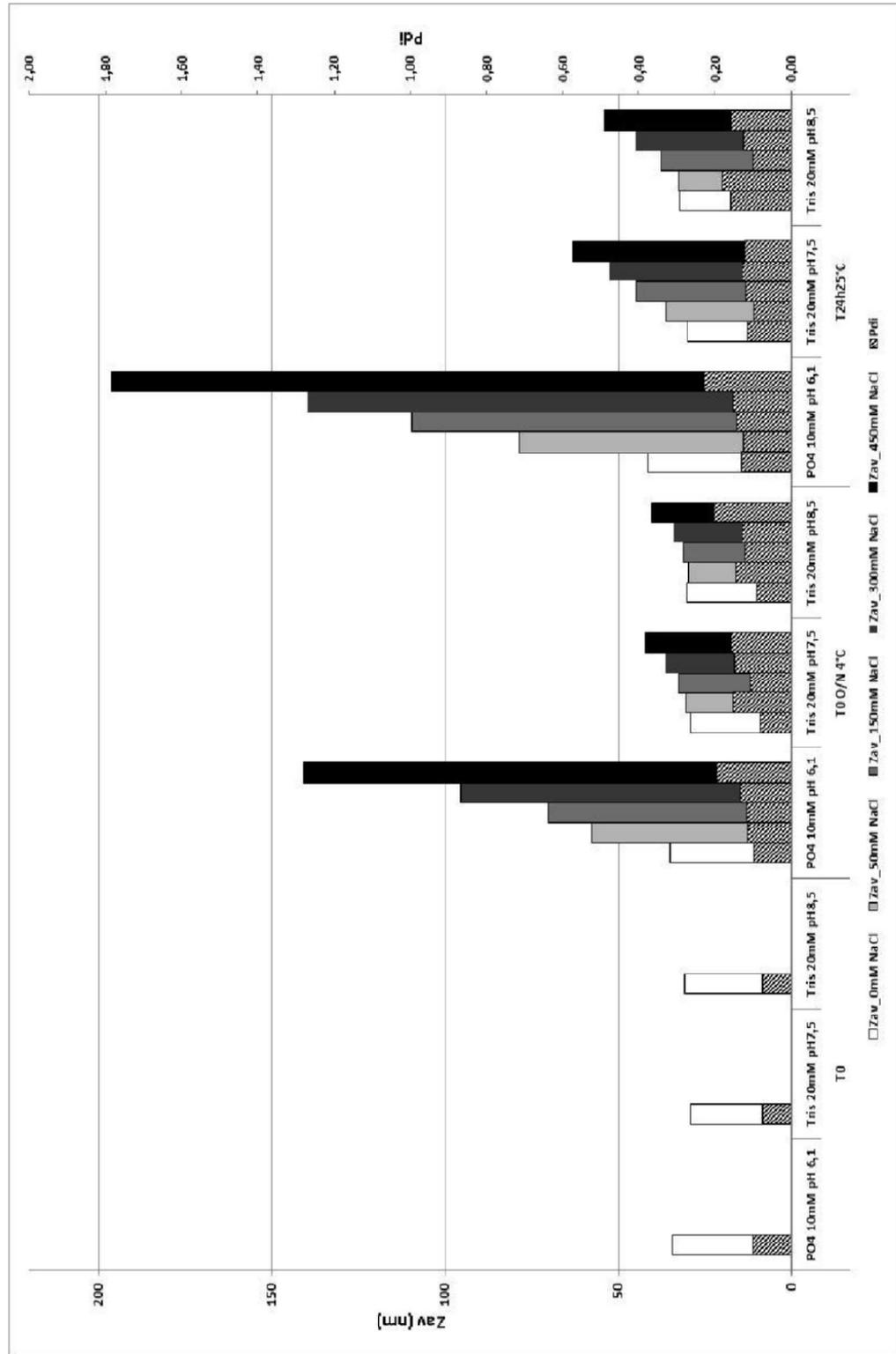


Figura 4

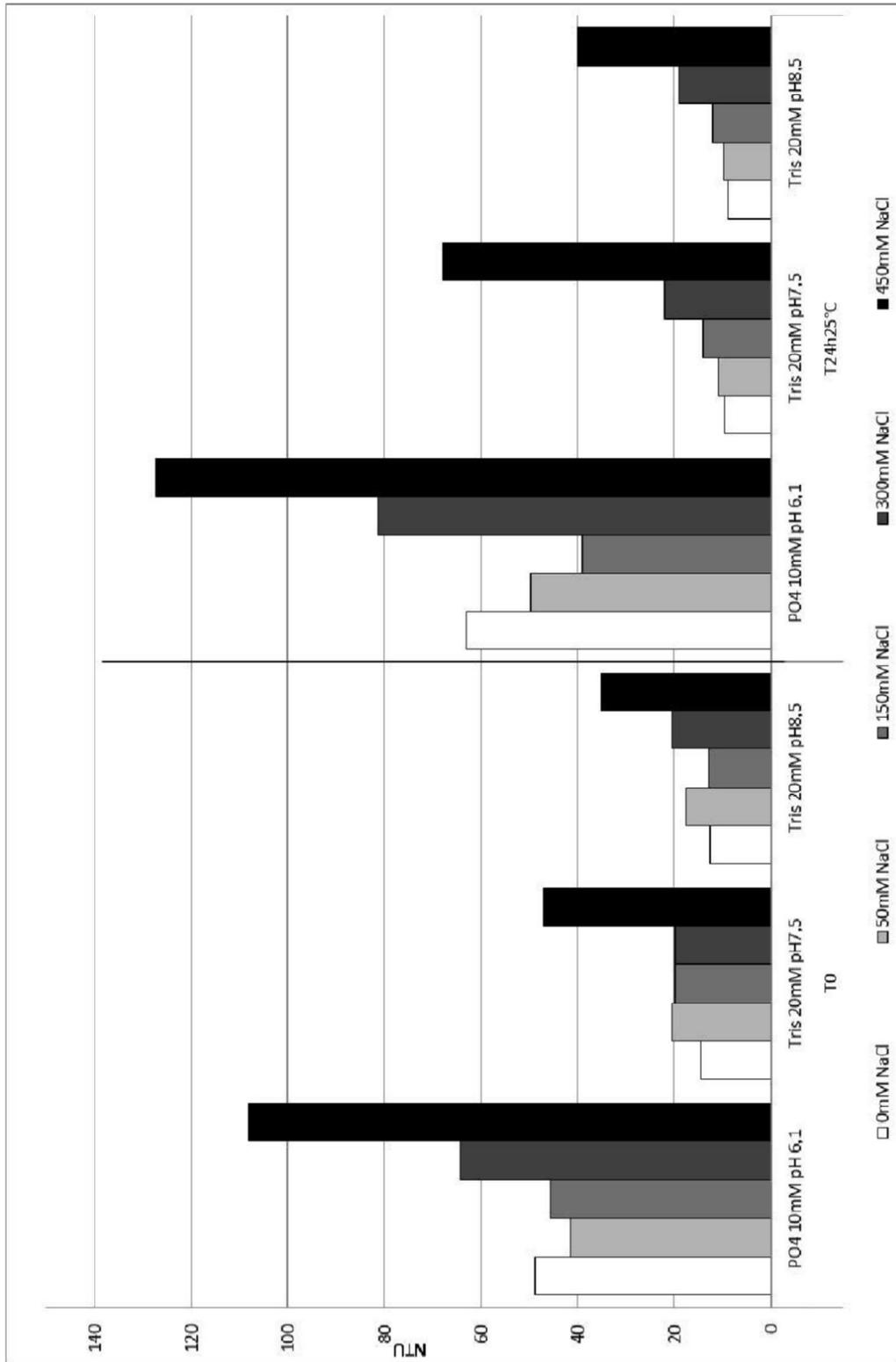


Figura 5

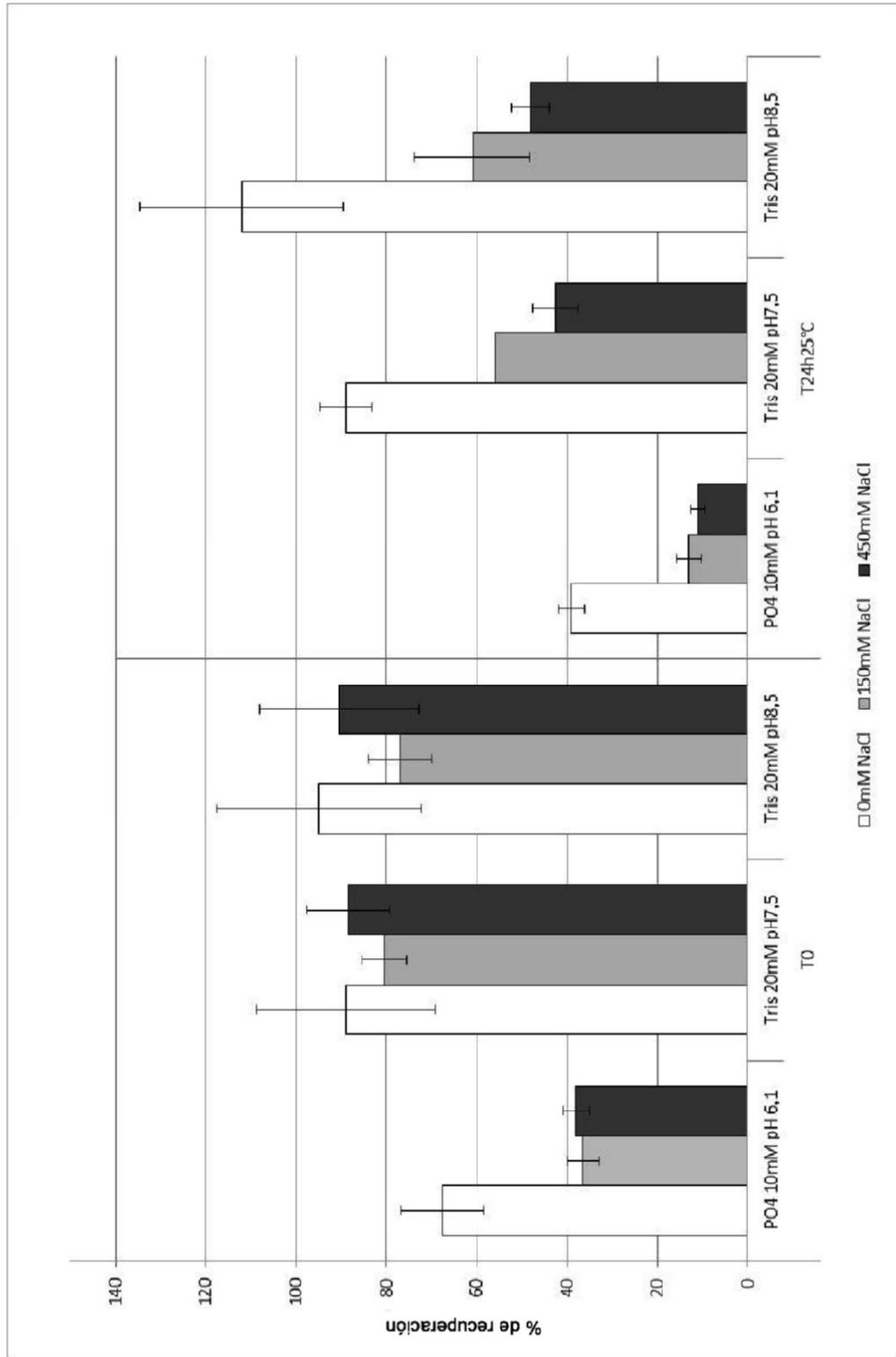


Figura 6a

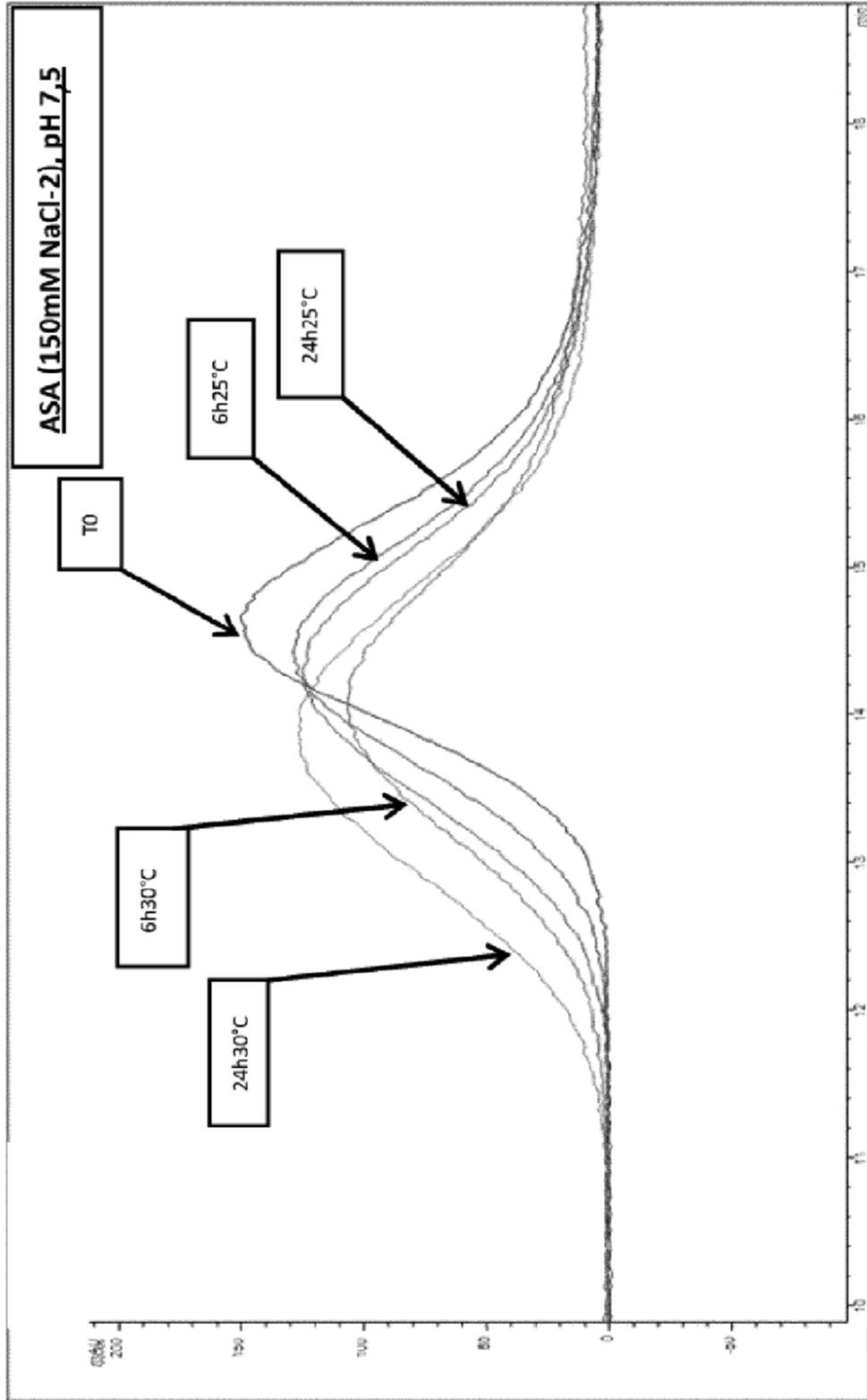


Figura 6b

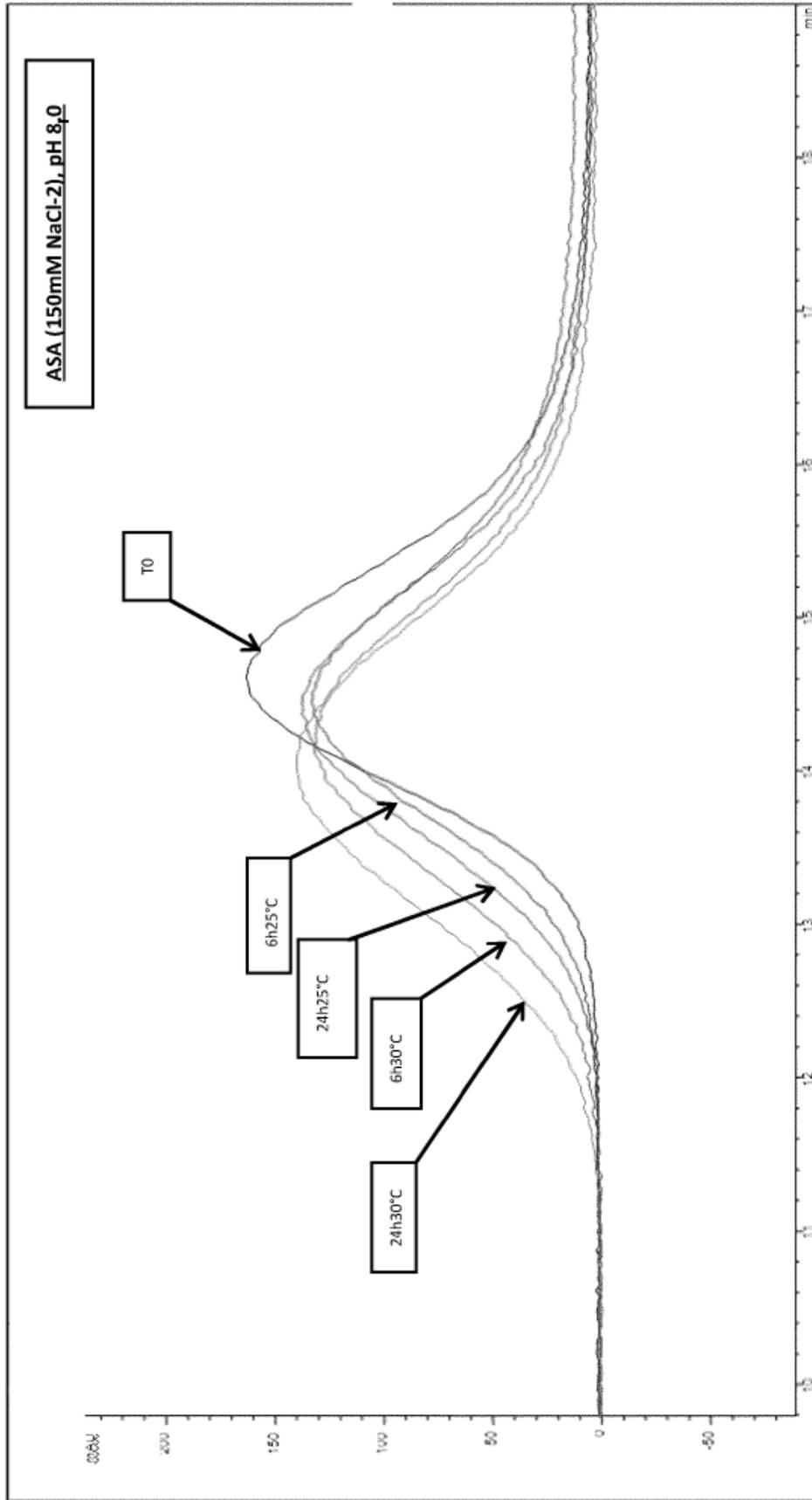


Figura 6c

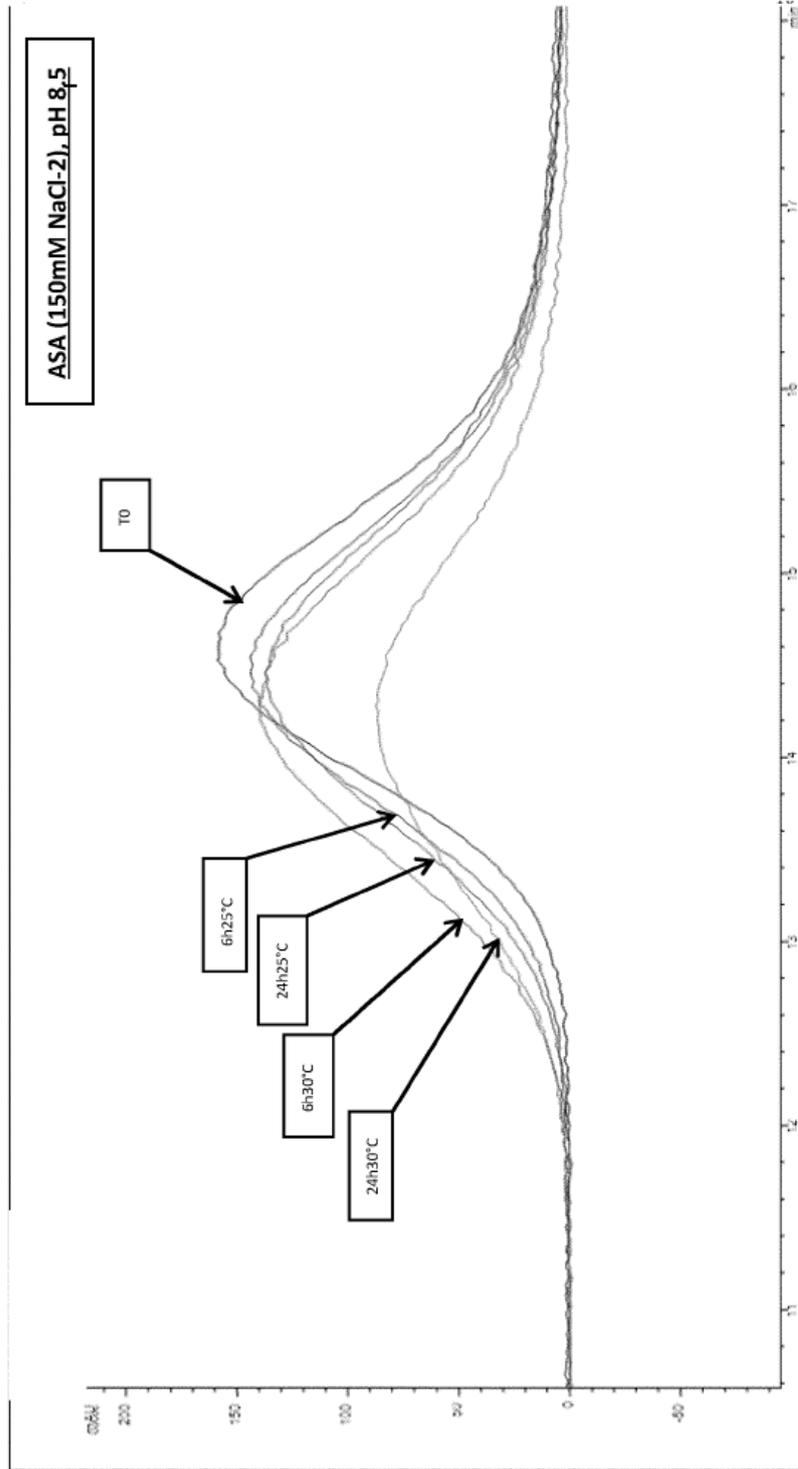


Figura 6d

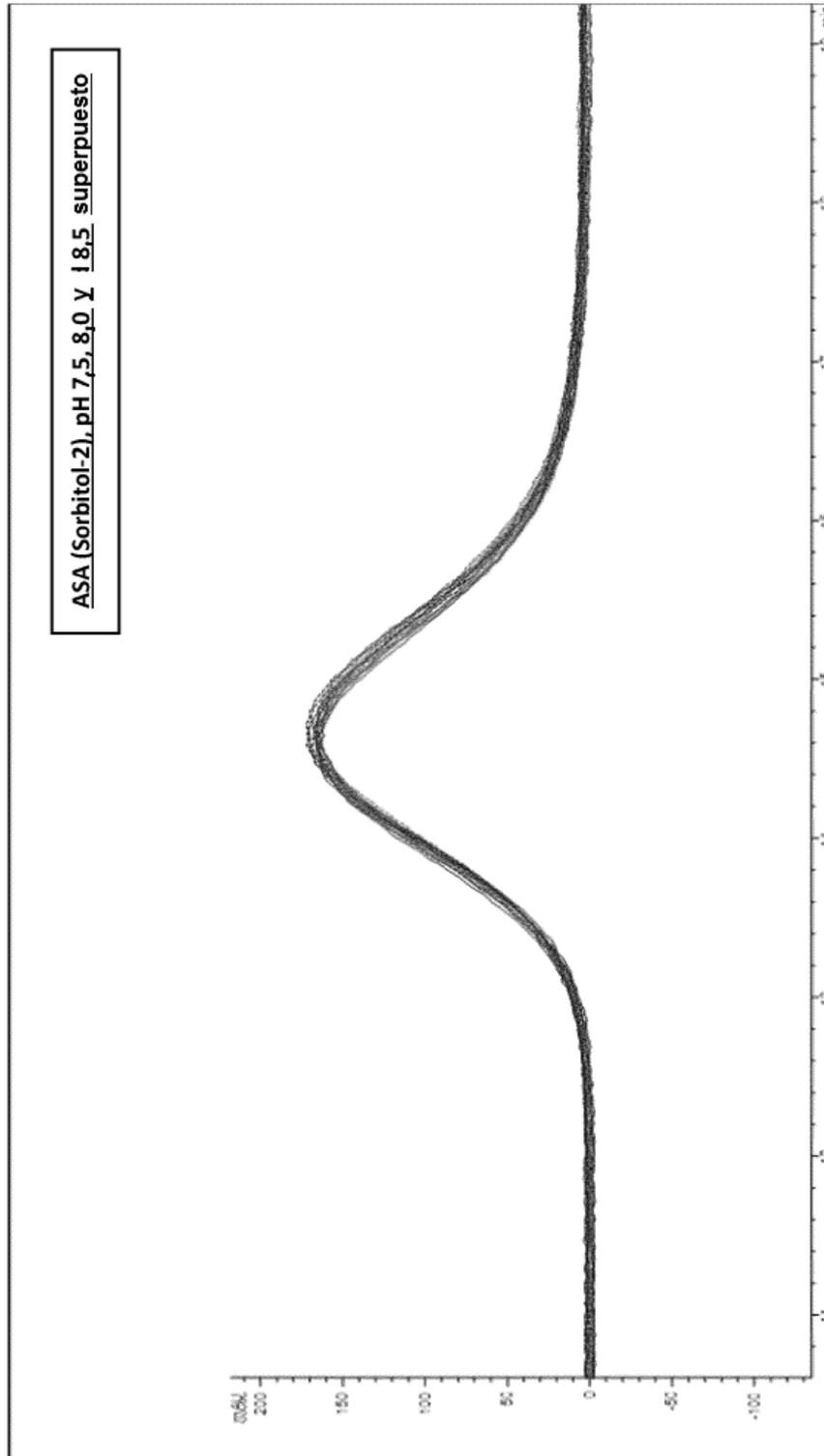


Figura 7

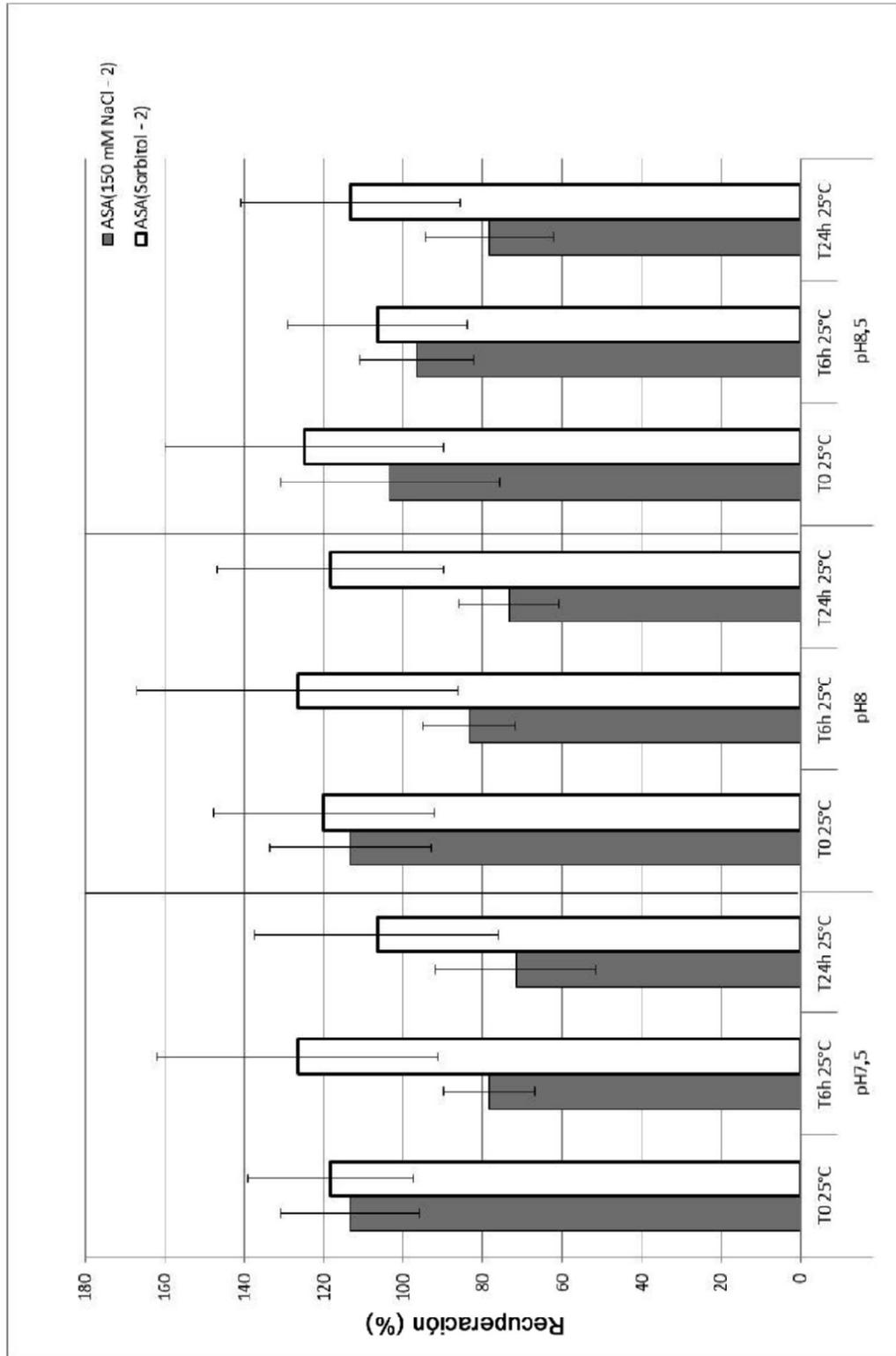


Figura 8

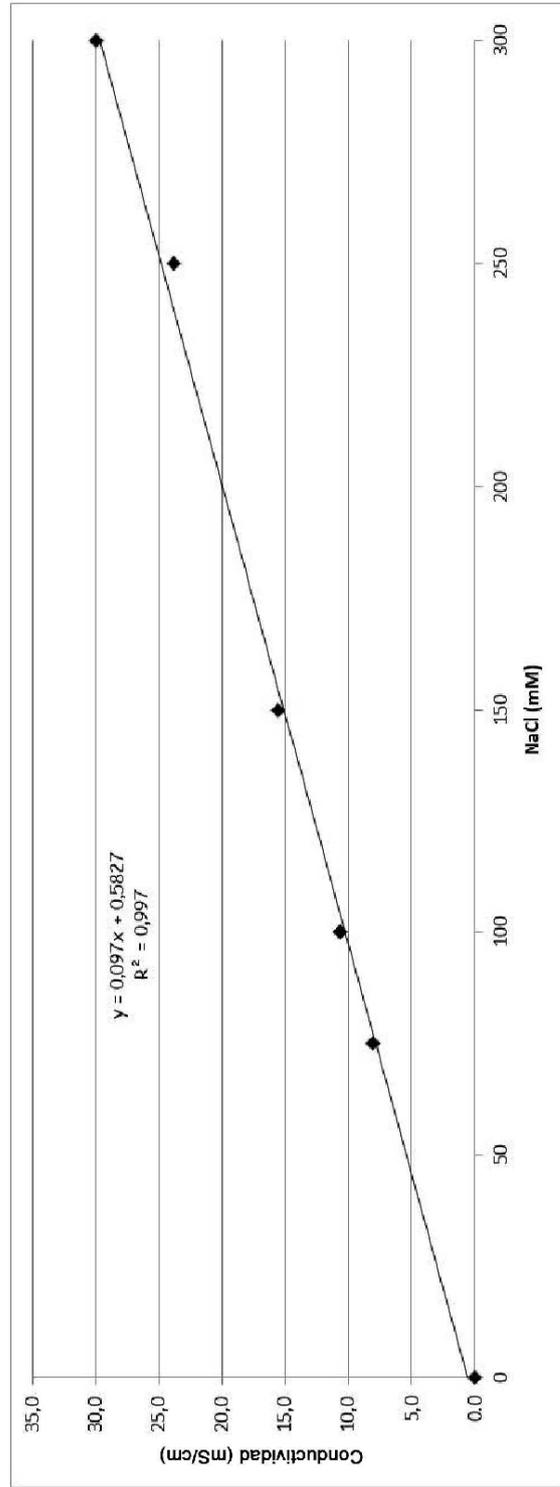


Figura 9

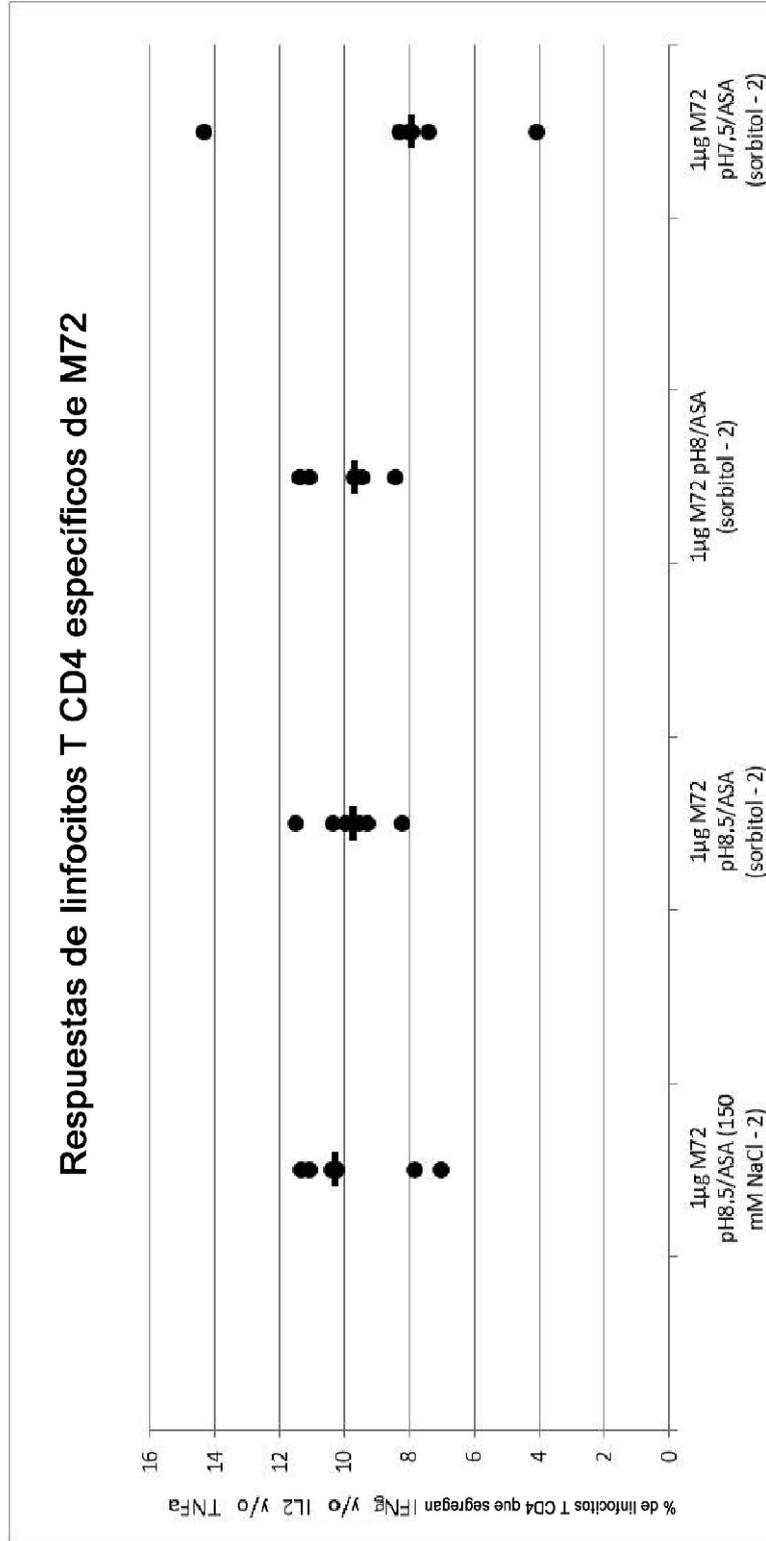
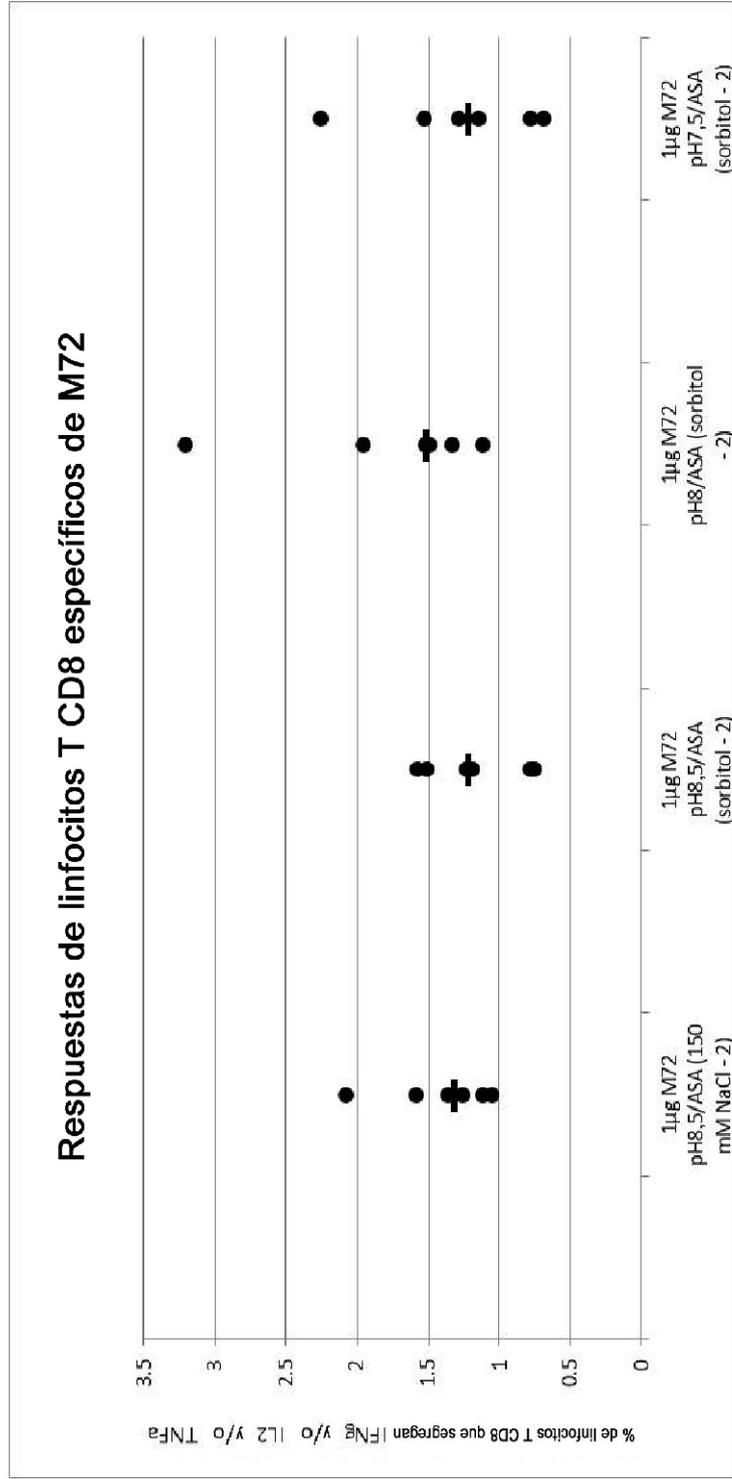


Figura 10



**Figura 11**

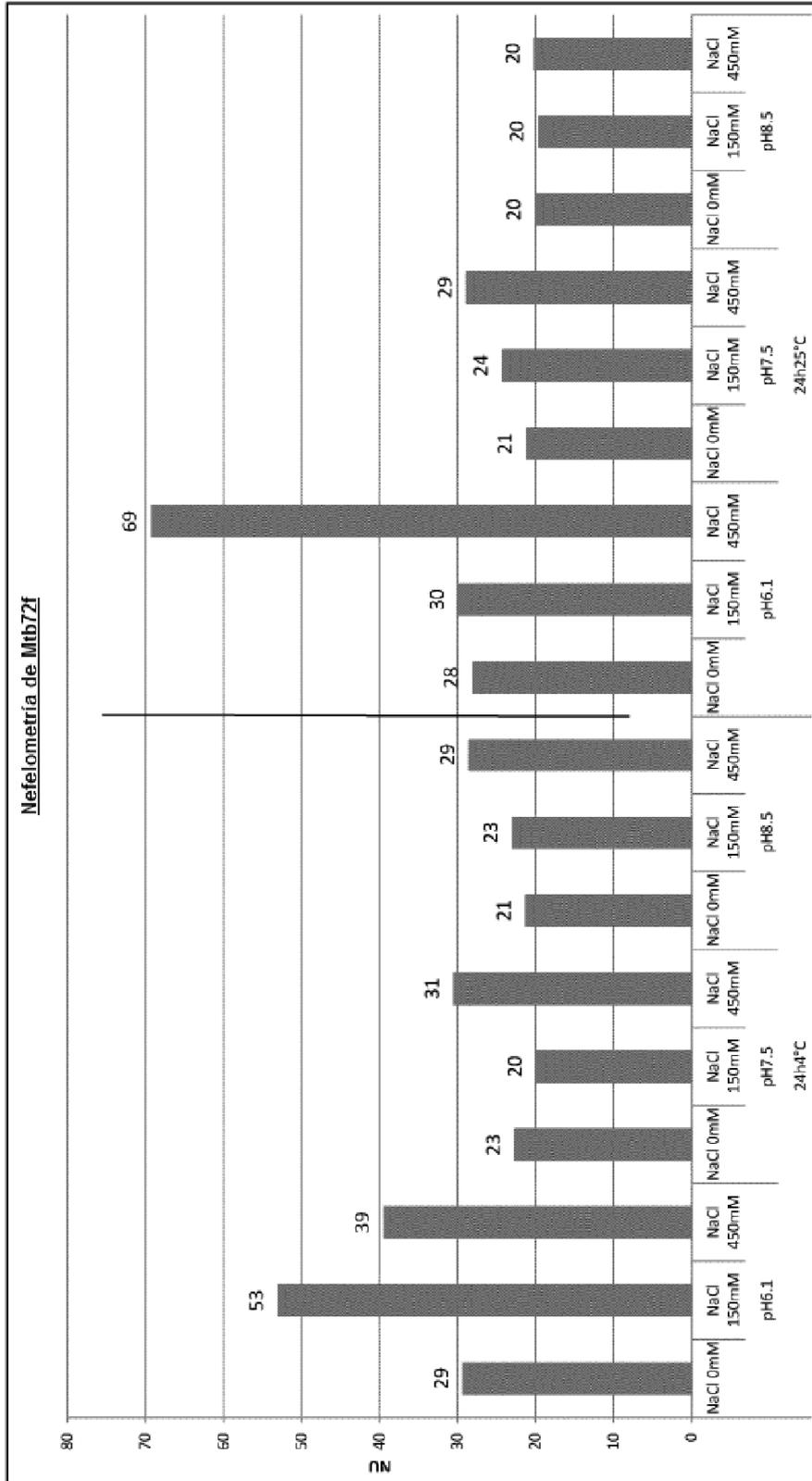


Figura 12

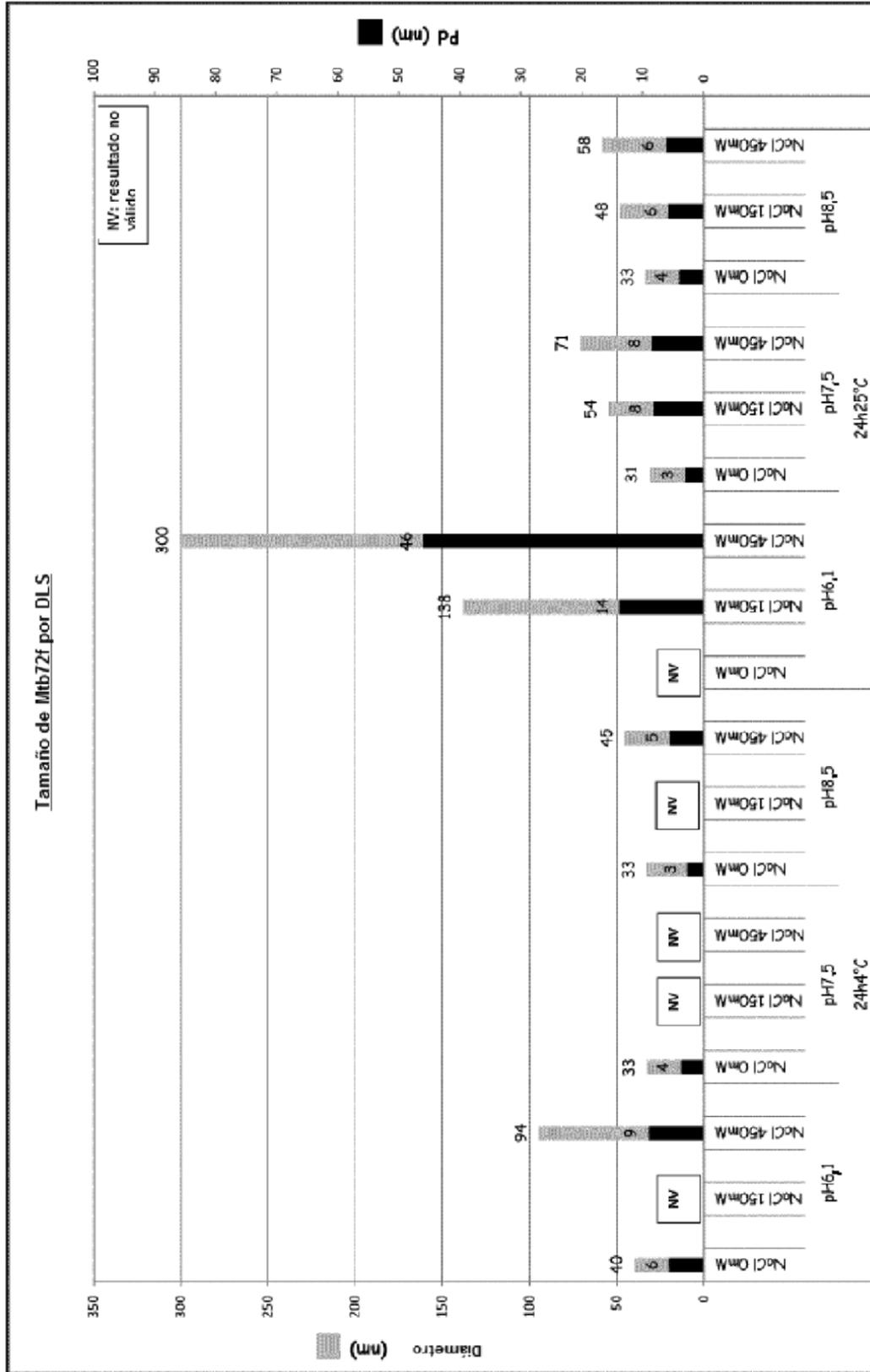


Figura 13

