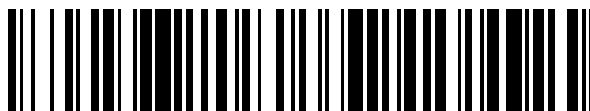


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 403**

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 11794778 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2651436**

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:

17.06.2016

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 2 574 403 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 Rv1196 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 La proteína de micobacteria Rv1196 (descrita, por ejemplo, con el nombre Mtb39a en Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950) o fragmentos o derivados de la misma, son antígenos de proteína de un beneficio potencial para el tratamiento o la prevención de la tuberculosis. Rv1196 está altamente conservada, con una identidad de secuencia del 100 % en las cepas H37Rv, C, Haarlem, CDC1551,94-M4241A, 98-R604INH-RIF-EM, KZN605, KZN1435, KZN4207, KZNR506, teniendo la cepa F11 una única mutación puntual Q30K. Rv1196 es un componente de los antígenos de la proteína de fusión Mtb72f and M72 (descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2006/117240).

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.

25 Leroux-Roels et al *Clinical and Vaccine Immunology* 2010 17(11):1763-1771 describe las infecciones por tuberculosis candidatas usando una vacuna Mtb72f/AS02.

30 Nair et al *Journal of Immunology* 2009 183(10):6269-6281 describe composiciones inmunógenas que comprenden PPE18 (también conocida como Rv1196).

Skeiky et al *The Journal of Immunology*, The American Association of Immunologists, 2004 172(12):7618-7628 describe una composición inmunógena que comprende la proteína Mtb72F.

Sumario de la invención

40 Los presentes inventores han identificado por primera vez que los antígenos relacionados con Rv1196 son particularmente sensibles a la presencia de sales. Sin limitarse por la teoría, se cree que los antígenos relacionados con Rv1196 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 Rv1196 se puede mejorar sorprendentemente por una reducción en la concentración de cloruro de sodio.

45 En consecuencia, La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con Rv1196, en el que el antígeno relacionado con Rv1196 comprende (a) una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID No: 1 o (b) un fragmento de la SEQ ID No: 1 que tiene una longitud de al menos 350 aminoácidos y en el que la conductividad de la composición es de 5 mS/cm o menor y el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0.

Breve descripción de los dibujos

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. Nefelometría de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 4. DLS de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 5. DLS de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 6. Nefelometría de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 7. Estabilidad antigénica de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figuras 8a-8d. Análisis de SEC-HPLC de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 9. Antigenicidad de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 10. Conductividad de soluciones estándar de NaCl
- Figura 11. Inducción de respuestas de linfocitos T CD4 en ratones usando composiciones inmunógenas de la invención
- Figura 12. Inducción de respuestas de linfocitos T CD8 en ratones usando composiciones inmunógenas de la invención
- Figura 13. Nefelometría de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 14. DLS de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
- Figura 15. Antigenicidad de composiciones inmunógenas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento

Breve descripción de identificadores de secuencia

- SEQ ID No: 1 Secuencia de aminoácidos para la proteína de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- SEQ ID No: 2 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- SEQ ID No: 3 Secuencia de aminoácidos para la proteína de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* F11
- SEQ ID No: 4 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* F11
- SEQ ID No: 5 Secuencia de aminoácidos para la proteína de M72
- SEQ ID No: 6 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de M72
- SEQ ID No: 7 Secuencia de aminoácidos para la proteína de M72 con dos restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 8 Secuencia de nucleótidos que codifican la proteína de M72f con dos restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 9 Secuencia de nucleótidos para la proteína Mtb72f
- SEQ ID No: 10 Secuencia de nucleótidos para la proteína Mtb72f
- SEQ ID No: 11 Secuencia de nucleótidos para la proteína Mtb72f
- SEQ ID No: 12 Secuencia de nucleótidos para la proteína Mtb72f con seis restos de His N-terminales
- SEQ ID No: 13 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 1 (CpG 1826)
- SEQ ID No: 14 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 2 (CpG 1758)
- SEQ ID No: 15 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 3
- SEQ ID No: 16 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 4 (CpG 2006)
- SEQ ID No: 17 Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 5 (CpG 1686)

Descripción detallada de la invención

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con Rv1196, en la que el antígeno relacionado con Rv1196 comprende (a) una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 % con la SEQ ID NO:1 o (b) un fragmento de la SEQ ID No: 1 que tiene una longitud de al menos 350 aminoácidos, el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0 y en la que la conductividad de la composición inmunógena 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.
- 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.
- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición inmunógena en la que 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).

- 5 Adecuadamente, la concentración de CaCl_2 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_4 en las composiciones inmunógenas será de 60 mM o menor, 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor o 15 mM o menor o 10 mM o menor.

- 10 Adecuadamente, la concentración de los iones NH_4^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} 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.

Las composiciones inmunógenas de la invención serán preparaciones acuosas.

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).

- 15 El experto puede someter a prueba fácilmente la concentración de ambos iones de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) 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: BQ011EAE) de Biosupply. El cloruro se puede determinar usando un kit tal como el kit de ensayo enzimático de cloruro (número de catálogo: BQ006EAE) de Biosupply.

- 20 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).
- 25

- 30 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.

- 35 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).

- 40 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).

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.

- 45 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.

- 50 La TB multirresistente (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.

- 5 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.
- 10 Adicionalmente, algunos países, tales como los Estados Unidos, no vacunan a la población con este agente.

- 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
- 15 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.

- 20 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).

- El antígeno de la proteína Rv1196 tiene un potencial beneficio para el tratamiento o prevención de la tuberculosis. Rv1196 se describe, por ejemplo, con el nombre Mtb39a en Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950). La proteína Rv1196 está altamente conservada, con una identidad de secuencia del 100 % en las cepas H37Rv, C, Haarlem, CDC1551, KZN605, KZN1435 y KZN4207, teniendo la cepa F11 una única mutación puntual (Q30K).
- 25

- Los antígenos de proteínas Mtb72f y M72 son proteínas de fusión que comprenden Rv1196 y tienen un 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).
- 30
- 35

- Como se usa en el presente documento, "antígeno relacionado con Rv1196" se refiere a la proteína de Rv1196 proporcionada en la SEQ ID No: 1 o un derivado inmunógeno de la misma que es una secuencia que comprende (a) una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1 o (b) un fragmento de la SEQ ID No: 1 que tiene al menos 350 aminoácidos de longitud. 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 (a) una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1 o (b) un fragmento de la SEQ ID No: 1 que tiene al menos 350 aminoácidos de longitud o alternativamente puede consistir en (a) una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1 o (b) un fragmento de la SEQ ID No: 1 que tiene al menos 350 aminoácidos de longitud.
- 40
- 45

El antígeno relacionado de Rv1196 puede contener, por ejemplo, menos de 1.000 restos de aminoácidos, tal como menos de 900 restos de aminoácidos, en particular 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 Rv1196 que contenga la mayoría (o de forma adecuada todos) los epítomos de linfocitos T intactos.
- 50
- 55

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

- 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 epítipo, y por lo tanto no tienen un impacto significativo sobre las propiedades inmunógenas del antígeno.

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 250 aminoácidos en longitud, tal como 300 aminoácidos o 350 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 dendrograma 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/). 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) o 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.

Adecuadamente, el antígeno relacionado con Rv1196 comprenderá, tal como consistirá en, una secuencia que tiene al menos una identidad del 90 % con la SEQ ID No: 1, especialmente al menos del 95 %, por ejemplo al menos del 98 %, tal como al menos del 99 %.

Un ejemplo específico de un antígeno relacionado con Rv1196 es Rv1196 de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, como se proporciona en la SEQ ID No: 1. En consecuencia, en una realización de la invención, el antígeno relacionado con Rv1196 es una proteína que comprende la SEQ ID No: 1. En una segunda realización de la invención, el antígeno relacionado con Rv1196 es una proteína que consiste en la SEQ ID No: 1.

Un ejemplo adicional un antígeno relacionado con Rv1196 es Rv1196 de la cepa F11 de *Mycobacterium tuberculosis*, como se proporciona en la SEQ ID No: 3. En una realización de la invención, el antígeno relacionado con Rv1196 es una proteína que comprende la SEQ ID No: 3. En una segunda realización de la invención, el antígeno relacionado con Rv1196 es una proteína que consiste en la SEQ ID No: 3.

Otros derivados inmunógenos de Rv1196 son los que comprenden, tal como consisten en, un fragmento de SEQ ID No: 1, que tiene una longitud de al menos 350 aminoácidos.

Los antígenos relacionados con Rv1196 se pueden preparar mediante métodos previamente descritos (por ejemplo, Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950; documento WO2006/117240), los proporcionados en los ejemplos o procedimientos análogos de los mismos.

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

Los componentes antigénicos adicionales pueden estar destinados a reforzar o complementar las respuestas inmunitarias producidas por el antígeno relacionado con Rv1196 en el campo de la prevención y terapia de la tuberculosis o antígenos adicionales podrían asociarse con otros patógenos y son para la administración del antígeno relacionado con Rv1196 por motivos de comodidad. Cuando en la formulación hay presente una serie de componentes antigénicos, estos se pueden proporcionar en forma de polipéptidos individuales o proteínas de fusión. En algunas circunstancias, los componentes antigénicos adicionales pueden proporcionarse como un polinucleótido (o polinucleótidos).

Los derivados inmunógenos concretos de la proteína Rv1196 incluyen proteínas de fusión que comprenden una secuencia que tiene una identidad de al menos un 90 % con la SEQ ID No: 1, especialmente al menos del 95 %, por ejemplo al menos del 98 %, tal como al menos del 99 %.

Ejemplos de proteínas de fusión que contienen una proteína Rv1196 incluyen: M72 (SEQ ID No: 5) y variantes de la misma, tales como aquellas con restos de His adicionales en el extremo N terminal (por ejemplo, dos restos de His, como se proporciona en la SEQ ID No: 7; 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: 9) 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).

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, la 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 Rv1196 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 Rv1196 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 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.

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 %.

Los esteroides adecuados incluyen β -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^a Ed., página 341, como un esteroil natural que se encuentra en la grasa animal.

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.

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).

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 μ 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 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.

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 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.

En una realización, el enlace internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o posiblemente un enlace fosforotioato, aunque también se pueden usar enlaces de fosfodiéster y otros internucleótidos, incluyendo oligonucleótidos con uniones de internucleótidos mezclados. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato 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 fosforotioato mezclados. Se pueden usar otros enlaces internucleótidos que estabilicen el oligonucleótido.

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 fosforotioato.

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 ATG 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 delecciones o adiciones inconsecuentes de las mismas.

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).

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 Rv1196 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 Rv1196.

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)

- 5 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:

A. Procedimiento de preparación de liposomas:

- 10 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:

- 15 Etapla 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió tampón de fosfato Na₂/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.

- 20 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.

Etapla 2: Adición de QS21

- 25 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.

- 30 Etapla 3: Se comprobó que el PH era 6,1 ± 0,1

Etapla 4: Filtración estéril

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

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

- 35 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.

A. Procedimiento de preparación de liposomas:

- 40 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

- 5 Se añadió tampón de fosfato Na₂/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.

Etapa 2: Adición de QS21

- 10 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 ± 0,1Etapa 4: Filtración estéril

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

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

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

- 20 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)).

- 25 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.

- 30 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.

- 40 1. Se definió el límite de detección (LDD) como la concentración más baja de QS21 que conduce a una DO:
- 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.
- 45 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_{LDD}.

Curva de QS21 de ejemplo

ug QS21	DO	QS21 desactivado
0	0,029	NA

(continuación)

ug QS21	DO	QS21 desactivado
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%
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 %.

Después, se comparó la desactivación de QS21 con una composición coadyuvante equivalente que comprendía sorbitol y cloruro de sodio de solo 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.

10

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.

5 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).

10 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).

15 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.

20 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)

25 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:

35 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

45 Se añadió tampón de fosfato Na₂/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.

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

Etapas 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.

- 5 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.

Etapas 3: Se comprobó que el PH era 6,1 ± 0,1Etapas 4: Filtración estéril

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

- 10 Etapas 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)

- 15 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:

- 20 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:

- 25 Etapas 1: Dilución de liposomas concentrados

- 30 Se añadió tampón de fosfato Na₂/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 ug/ml de 3D-MPL en la formulación final. Posteriormente, se agitó la mezcla durante de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.

Etapas 2: Adición de QS21

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 a temperatura ambiente.

- 35 Etapas 3: Se comprobó el PH para que fuera de 6,1 ± 0,1

Etapas 4: Filtración estéril

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

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

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

Ejemplo 8: Investigación del "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden Rv1196 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 Rv1196, evaluado por tamaño.

- 45 **Procedimiento**

La proteína Rv1196 (SEQ ID No: 1) se obtuvo en Corixa Corporation y se diluyó 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.

- 5 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.

Resultados

- 10 Los hallazgos de este experimento se presentan en las figuras 3 y 4.

La nefelometría demuestra una tendencia general de menor claridad con el incremento de la concentración de sal, lo que indica que Rv1196 es sensible a la concentración de sal.

- 15 Para la mayoría de las muestras de DLS, la instrumentación no pudo determinar un tamaño de partícula específico (mostrado como NV en la Figura 4). No obstante, cuando se obtuvieron datos comparables (es decir, pH 8,5 con NaCl 0 o 150 nM), está claro que la concentración de cloruro sódico afecta al tamaño de particular medida en las composiciones inmunógenas de Rv1196.

Ejemplo 9: Preparación de antígenos de proteínas

M72 con dos restos de His N terminales (SEQ ID No: 7)

Construcción del vector de expresión de M72

- 20 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.

- 30 Para obtener el vector que codifica para M72, que solo 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.

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.

40 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 pre-cultivo líquido que consiste en 400 ml de medio precultivo complementado con 50 mg/l de sulfato de kanamicina y 10 g/l de glucosa.

- 45 Composición de medio precultivo

Ingrediente	Concentración		
KH ₂ PO ₄	14,83 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,65 g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,82 g/l		
Extracto de levadura	6,21 g/l		

(continuación)

Ingrediente	Concentración		
Glicerol al 87 % (p/p)	14,54 ml/l		
Solución de metal y sal ⁽¹⁾ : - FeCl ₃ 6H ₂ O - MgSO ₄ 7H ₂ O - Solución de microelementos ⁽²⁾ : - ZnSO ₄ 7H ₂ O - MnSO ₄ H ₂ O - CuSO ₄ 5H ₂ O - CoCl ₂ 6H ₂ O - H ₃ BO ₃ - Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O - HCl 4N	9,7 ml/l	3,3 g/l 58 g/l 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 ₂ ⁽²⁾ : - Biotina - CaCl ₂ 2 H ₂ 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_{650nm} alcanzó un valor entre 2 y 4 (tiempo de incubación aproximado: 16 horas). Es 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.

5

Composición de medio de cultivo

Ingrediente	Concentración	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,63 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O - Solución de microelementos ⁽¹⁾ : - ZnSO ₄ 7H ₂ O - MnSO ₄ H ₂ O - CuSO ₄ 5H ₂ O	0,056 g/l 1,91 ml/l	7,65 g/l 5,28 g/l 1,1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O - H ₃ BO ₃ - Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O - HCl 4N		1,1 g/l 0,3 g/l 2,64 g/l 6,2 ml/l
HCl 37 %	0,40 ml/l	
Extracto de levadura	35 g/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,10 g/l	
KH ₂ PO ₄	18,70 g/l	
Glutamato de sodio	2,5 g/l	
Glicerol 87 %	0,276 ml/l	
Glucosa	20 g/l	
Solución de biotina ⁽²⁾ : - Biotina	0,22 ml/l	1 g/l

(continuación)

Ingrediente		Concentración	
CaCl ₂ 2 H ₂ O		0,21 g/l	
Se filtra la solución a través de 0,22 µm			
(1)	Se filtra la solución a través de 0,22 µm		
(2)	pH ajustado a 11,0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0,22 µm		

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 NH₄OH y un 25 % (v/v) de H₃PO₄. 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 ₄ 7H ₂ O		1,98 g/l	
Ingrediente		Concentración	
FeCl ₃ 6H ₂ O		0,178 g/l	
- Solución de microelementos ⁽¹⁾ :		6,02 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O			7,65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O			5,28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O			1,1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O			1,1 g/l
- H ₃ BO ₃			0,3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ 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 ⁽²⁾ :		2 ml/l	
- Biotina			1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O		0,66 g/l	
Se filtra la solución a través de 0,22 µm			
(1) Se filtra la solución a través de 0,22 µm			
(2) pH ajustado a 11,0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0,22 µm			

10 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_{650nm} 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

20 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 alicuotó la masa purificada y se almacenó a -70 °C.

Ejemplo 10: 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.

Procedimiento

Se diluyó antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 7, como se preparó en el ejemplo 9) hasta una concentración de 100 µg/ml en tres tampones diferentes (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 todos 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 Rv1196, específicamente M72, es sensible tanto al pH como a la concentración de cloruro de 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 de 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.

En consecuencia, los beneficios de la presente invención se extienden a las secuencias que contienen antígenos relacionados Rv1196 y no solo a la propia secuencia de Rv1196

Ejemplo 11: Prevención de "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72, inmunoestimulantes 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.

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

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: 7, como se preparó en el ejemplo 9) hasta 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

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: 7, como se preparó en el ejemplo 9) hasta 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

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: 7 como se preparó en el ejemplo 9) hasta 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.

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
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 8,5

(ii) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (NaCl 150 mM – 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 150 mM
Fosfato 10 mM
pH 8,0

(iii) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH 7,5

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
10 NaCl 150 mM
Fosfato 10 mM
pH 7,5

(iv) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 8,5

15 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
20 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

(v) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 8,0

30 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
35 NaCl 5 mM
4,7 % p/v de sorbitol
Fosfato 10 mM
pH 8,0

(vi) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 2) pH 7,5

40 10 ug/ml de antígeno
5 % p/v de sacarosa
Tris 12,5 mM
0,02 % p/v de Tween80
500 ug de DOPC
45 125 ug de colesterol
25 ug de 3D-MPL
25 ug de QS21
NaCl 5 mM
4,7 % p/v de sorbitol
50 Fosfato 10 mM
pH 7,5

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).

55 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 todos 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

- 5 Los resultados se muestran en las figuras 8a-8d y 9.

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.

Ejemplo 12: Determinación de la conductividad para composiciones inmunógenas de la invención.

- 15 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

- 20 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.

Se prepararon composiciones inmunógenas usando M72 con dos restos de His N terminales de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el ejemplo 9. 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.

- 25 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

- 30 En la figura 10 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

(continuación)

Descripción	Concentración de cloruro de sodio mM	Conductividad mS/cm	Concentración de cloruro de sodio equivalente mM
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 Rv1196 que contienen homólogos.

Ejemplo 13: Prueba de inmunogenicidad de composiciones inmunógenas de la invención.

10 El objetivo del 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)
2. M72 con dos restos de His N terminales pH 8,5/ASA (sorbitol – 2)
- 15 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)

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 11). Se midieron las respuestas de linfocitos T específicos de M72 elicitados (tanto CD4 como CD8) 6 días después de la última inmunización (6dPIII).

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.

Resultados

Cada punto de dato en las figuras 11 y 12 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 11 y 12 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.

Ejemplo 14: Investigación del "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72 con CaCl₂ o MgSO₄ 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 CaCl₂ o MgSO₄ y a diferentes niveles de pH. La inspección visual se utilizó como una lectura de la estabilidad.

Procedimiento

Se diluyó antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID No: 7) 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; CaCl₂ 40 mM, 80 mM o 160 mM; MgSO₄ 87,5 mM, 175 mM o 430 mM).

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 ₂ 40 mM	Succinato 10mM	6,1	8,0	6,1	Opalescente
E	CaCl ₂ 80 mM	Succinato 10mM	6,1	11,2	5,8	Opalescente + partículas grandes
F	CaCl ₂ 160 mM	Succinato 10mM	6,1	20,2	5,8	Opalescente + partículas grandes
G	MgSO ₄ 87,5 mM	Succinato 10mM	6,1	7,7	6,1	Opalescente
H	MgSO ₄ 175 mM	Succinato 10mM	6,1	12,4	5,9	Opalescente + partículas muy grandes
I	MgSO ₄ 430 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 ₂ 40 mM	Tris 10mM	8,0	6,7	8,1	Partículas grandes
N	CaCl ₂ 80 mM	Tris 10mM	8,0	10,8	8,0	Opalescente + partículas grandes
O	CaCl ₂ 160 mM	Tris 10mM	8,0	19,7	8,0	Opalescente + partículas grandes
P	MgSO ₄ 87,5 mM	Tris 10mM	8,0	7,5	8,0	Partículas grandes

(continuación)

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

Los resultados demuestran que las soluciones que contienen un antígeno relacionado con Rv1196 pueden ser sensibles a otras sales aparte de cloruro del sodio. El impacto del CaCl₂ o el MgSO₄ parece ser mucho más pronunciado que para el cloruro sódico a concentraciones o conductividad comparables.

Ejemplo 15: 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.

Procedimiento

Se diluyó antígeno a granel purificado (Mtb72f con 6 restos de His, SEQ ID No: 11) 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.

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.

Resultados

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

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 Rv1196 y no solo 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 14).

Ejemplo 16: Prevención del "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72, inmunoestimulantes 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 monitorizaron las muestras usando un ELISA alternativo.

Procedimiento

Se preparó la torta de liofilización como se ha descrito en el ejemplo 11 (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

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 150 mM
 Fosfato 10 mM
 pH 8,5

(ii) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol - 2)) pH 8,5

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
 NaCl 5 mM
 4,7% p/v de sorbitol
 Fosfato 10 mM
 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 incuba 1h30 a 37 °C. Después de la etapa de lavado, el complejo inmune se incuba 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.

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 15. Los rombos indican las mediciones específicas para cada una de las tres muestras de ensayo, con una línea que indica el valor medio.

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, solo el 67,3 % de la antigenicidad relativa se mantuvo después del almacenamiento).

En resumen, el Ejemplos 8 demuestra 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 Rv1196. Ejemplo 14 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 Rv1196, demostrando los Ejemplos 10, 11, 12, 15 y 16 que el efecto es también aplicable a otras secuencias.

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.

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

10	<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa Godart, Stephane Laanan, Amina Lemoine, Dominique
15	<120> Composiciones novedosas <130>VB64442A
20	<150> US61/422723 <151> 14-12-2010 <160> 17 <170> Patent In versión 3.5
25	<210> 1 <211> 391 <212> PRT <213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
30	<400> 1

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

Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr
 165 170 175
 Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser
 180 185 190
 Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu
 195 200 205
 Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val
 245 250 255
 Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala
 260 265 270
 Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala
 275 280 285
 Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly
 290 295 300
 Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val
 305 310 315 320
 Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg
 325 330 335
 Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly
 340 345 350
 Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly
 355 360 365
 Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met
 370 375 380
 Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
 385 390

<210> 2

<211> 1173

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

<400>2

5

```

atggtggatt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta cgccggcccc 60
gggtcggcct cgctgggtgg cgcggtcag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt 120
tcggcccggt cggcggtttca gtcggtggtc tggggtctga cggtggggtc gtggataggt 180
tcgtcggcgg gtctgatggt ggcggtcgcc tcgccgtatg tggcggtgat gagcgtcacc 240
gcggggcagg ccgagctgac cgccgccag gtccgggttg ctgcggcggc ctacgagacg 300
gcgtatgggc tgacggtgcc cccgccgtg atcgccgaga accgtgctga actgatgatt 360
ctgatagcga ccaacctctt ggggcaaaac acccgggcga tcgcggtcaa cgaggccgaa 420
tacggcgaga tgtgggcccc agacgcggcc gcgatgtttg gctacgcgc gcgacggcg 480
acggcgacgg cgacgttgc gccgttcgag gaggcgccgg agatgaccag cgcggtggg 540
ctcctcgagc aggcgcgcgc ggtcgaggag gcctccgaca ccgcgcggc gaaccagttg 600
atgaacaatg tgcccaggc gctgcaacag ctggcccagc ccaocgaggg caccacgcct 660
tcttccaagc tgggtggcct gtggaagacg gtctcgccgc atcggtcgcc gatcagcaac 720
atggtgtcga tggccaacaa ccacatgtcg atgaccaact cgggtgtgtc gatgaccaac 780
accttgagct cgatgttgaa gggctttgct ccggcgccgg ccgccaggc cgtgcaaacc 840
gcggcgcaaa acggggtccg ggcgatgagc tcgctgggca gctcgctggg ttcttcgggt 900
ctggcggtg ggggtggcgc caacttgggt cgggcgccct cggtcggttc gttgtcggtg 960
ccgcaggcct gggccgcggc caaccaggca gtcaccccg cggcgcgggc gctgccgctg 1020
accagcctga ccagcgccgc ggaaagagg ccggggcaga tgctgggcgg gctgccggtg 1080
gggcagatgg gcgccaggc cgggtgggg ctcagtgggt tgctgcgtgt tccgcgcga 1140
ccctatgtga tgccgcattc tccggcgcc ggc 1173

```

<210> 3

<211> 391

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis* F11

<400> 3

10

```

Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met
1           5           10           15

```

```

Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp
20           25           30

```

```

Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
35           40           45

```

15

Val 50	Val	Trp	Gly	Leu	Thr	Val 55	Gly	Ser	Trp	Ile	Gly 60	Ser	Ser	Ala	Gly
Leu 65	Met	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Tyr	Val	Ala	Trp	Met	Ser	Val	Thr 80
Ala	Gly	Gln	Ala	Glu 85	Leu	Thr	Ala	Ala	Gln 90	Val	Arg	Val	Ala	Ala 95	Ala
Ala	Tyr	Glu	Thr 100	Ala	Tyr	Gly	Leu	Thr 105	Val	Pro	Pro	Pro	Val 110	Ile	Ala
Glu	Asn	Arg 115	Ala	Glu	Leu	Met	Ile 120	Leu	Ile	Ala	Thr	Asn 125	Leu	Leu	Gly
Gln	Asn 130	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala	Val 135	Asn	Glu	Ala	Glu 140	Tyr	Gly	Glu	Met
Trp 145	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Met	Phe	Gly	Tyr 155	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala 160
Thr	Ala	Thr	Ala	Thr 165	Leu	Leu	Pro	Phe	Glu 170	Glu	Ala	Pro	Glu	Met 175	Thr
Ser	Ala	Gly	Gly 180	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala 185	Ala	Ala	Val	Glu	Glu 190	Ala	Ser
Asp	Thr 195	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu 200	Met	Asn	Asn	Val	Pro 205	Gln	Ala	Leu
Gln 210	Gln	Leu	Ala	Gln	Pro	Thr 215	Gln	Gly	Thr	Thr	Pro 220	Ser	Ser	Lys	Leu
Gly 225	Gly	Leu	Trp	Lys	Thr 230	Val	Ser	Pro	His	Arg 235	Ser	Pro	Ile	Ser	Asn 240
Met	Val	Ser	Met	Ala 245	Asn	Asn	His	Met	Ser 250	Met	Thr	Asn	Ser	Gly 255	Val
Ser	Met	Thr	Asn 260	Thr	Leu	Ser	Ser	Met 265	Leu	Lys	Gly	Phe	Ala 270	Pro	Ala
Ala	Ala	Ala 275	Gln	Ala	Val	Gln	Thr 280	Ala	Ala	Gln	Asn	Gly 285	Val	Arg	Ala
Met	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly

290		295		300											
Val 305	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly 310	Arg	Ala	Ala	Ser	Val 315	Gly	Ser	Leu	Ser	Val 320
Pro	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Arg 335
Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly 350	Pro	Gly
Gln	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Val	Gly	Gln	Met	Gly	Ala	Arg	Ala	Gly
		355					360					365			
Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Arg	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Tyr	Val	Met
		370					375					380			
Pro	His	Ser	Pro	Ala	Ala	Gly									
385						390									

<210> 4

<211> 1173

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis* F11

<400> 4

ES 2 574 403 T3

```

atggtggatt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta tgccggcccc 60
ggttcggcct cgctggtggc cgccgcgaag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt 120
tcggcccgct cggcggttca gtcggtggtc tggggtctga cgggtgggtc gtggataggt 180
tcgtcgggcg gtctgatggt ggcggcggcc tcgccgtatg tggcgtggat gagcgtcacc 240
gcggggcagg ccgagctgac cgccgcccag gtccgggttg ctgcggcggc ctacgagacg 300
gcgtatgggc tgacggtgcc cccgccggtg atcgccgaga accgtgctga actgatgatt 360
ctgatagoga ccaacctctt ggggcaaaac accccggcga tcgcggtcaa cgaggccgaa 420
tacggcgaga tgtgggcca agacgccgcc gcgatgtttg gctacgccgc ggcgacggcg 480
acggcgacgg cgacgttgct gccgttcgag gaggcgccgg agatgaccag cgcgggtggg 540
ctcctcgagc aggcccgccg ggtcgaggag gcctccgaca ccgcccggc gaaccagttg 600
atgaacaatg tgccccaggc gctgcaacag ctggcccagc ccacgcaggg caccacgcct 660
tcttccaagc tgggtggcct gtggaagacg gtctcgccgc atcggtcgcc gatcagcaac 720
atggtgtcga tggccaacaa ccacatgtcg atgaccaact cgggtgtgtc gatgaccaac 780
accttgagct cgatgttgaa gggctttgct ccggcgccgg ccgccaggc cgtgcaaacc 840
gcggcgcaaa acggggtccg ggcgatgagc tcgctgggca gctcgctggg ttcttcgggt 900

ctggggcggtg ggggtggcgc caacttgggt cgggcggcct cggtcggttc gttgtcggtg 960
ccgcaggcct gggccgcggc caaccaggca gtcaccccg cggcgcgggc gctgccgctg 1020
accagcctga ccagcgccgc ggaaagaggg cccgggcaga tgctgggcgg gctgccggtg 1080
gggcagatgg gcgccagggc cgggtggggg ctcagtgggt tgctgcgtgt tccgccgcga 1140
ccctatgtga tgccgcattc tccggcggcc ggc 1173

```

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

<220>
 <223> Proteína de fusión M72

<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

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

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
				645					650					655	
Gly	Gln	Gly	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Ala	Leu
			660					665					670		

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

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
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 M72

<400>6

atgacggccg	cgtccgataa	cttcagctg	tcccaggggtg	ggcagggatt	cgccattccg	60
atcgggcagg	cgatggcgat	cgcgggccag	atccgatcgg	gtggggggtc	acccaccgtt	120
catatcgggc	ctaccgcctt	cctcggttg	ggtgttgtcg	acaacaacgg	caacggcgca	180
cgagtccaac	gcgtggtcgg	gagcgctccg	gcggcaagtc	tcggcatctc	caccggcgac	240
gtgatcaccg	cggtcgacgg	cgctccgatc	aactcggcca	ccgcgatggc	ggacgcgctt	300
aacgggcctc	atcccggtga	cgctcatctc	gtgacctggc	aaaccaagtc	ggggggcacg	360
cgtacaggga	acgtgacatt	ggccgaggga	ccccggccg	aattcatggt	ggatttcggg	420
gcgttaccac	cggagatcaa	ctccgcgagg	atgtacgccg	gcccgggttc	ggcctcgctg	480
gtggcccgcg	ctcagatgtg	ggacagcgtg	gcgagtgaac	tgttttcggc	cgcgtcgggc	540
tttcagtcgg	tgggtctggg	tctgacgggt	gggtcgtgga	taggttcgtc	ggcgggtctg	600
atggtggcgg	cggcctcgcc	gtatgtggcg	tggatgagcg	tcaccgcggg	gcaggccgag	660
ctgaaccgcg	cccaggtccg	ggttgctcgc	gcggcctacg	agacggcgta	tgggctgacg	720
gtgccccgcg	cggatgatcg	cgagaaccgt	gctgaactga	tgattctgat	agcgaccaac	780
ctcttggggc	aaaacacccc	ggcgatcgcg	gtcaacgagg	ccgaatacgg	cgagatgtgg	840
gcccgaagacg	ccgccgcgat	gtttggctac	gccgcggcga	cggcgacggc	gacggcgacg	900
ttgctgcctg	tcgaggaggc	gccggagatg	accagcgcgg	gtgggctcct	cgagcaggcc	960
gccgcggctc	aggaggcctc	cgacaccgcc	gcggcggaacc	agttgatgaa	caatgtgcc	1020
caggcgctgc	aacagctggc	ccagcccacg	cagggcacca	cgccttcttc	caagctgggt	1080
ggcctgtgga	agacggtctc	gccgcctcgg	tcgccgatca	gcaacatggt	gtcgatggcc	1140

```

aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg      1200
ttgaagggct ttgctcgggc ggcgccggcc caggccgtgc aaaccggggc gcaaaacggg      1260
gtccggggcga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cggtaggggtg      1320
gccgccaaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtagccga ggcctggggc      1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgtgc cgtgaccag cctgaccagc      1440
gccgcggaaa gagggcccg gcagatgctg ggcgggctgc cggtagggca gatgggcgcc      1500
agggccggtg gtgggtcag tgggtgctg cgtgttcgc cgcgacctt tgtgatgccg      1560
cattctcggc cagccggcga tatcggcccg cggccttgt cgcaggaccg gttcggcgac      1620
ttccccgggc tgccctcga cccgtcggcg atggtcggcc aagtggggcc acagggtggtc      1680
aacatcaaca ccaactggg ctacaacaac gccgtgggcg cggggaccgg catcgtcatc      1740
gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcggcac cgacatcaat      1800
gcgttcagcg tcggctcgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc      1860
caggatgctg cggtagtgca gctgcggcgt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcggc      1920
ggcggcgtcg cggtagtgta gccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga      1980
acgccccgtg cggtagcctg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat      2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggtagatcc agttcgatgc cgcgatccag      2100
cccgtgatg cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg      2160
gccgcgtcct ag                                                                2172

```

<210> 7
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión de M72 con 2 restos de his adicionales
 <400>7

```

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
35          40          45

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

```

Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr
 65 70 75 80
 Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr
 85 90 95
 Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser
 100 105 110
 Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu
 130 135 140
 Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
 180 185 190
 Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
 195 200 205
 Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
 245 250 255
 Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
 260 265 270
 Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
 275 280 285
 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

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> 8

<211> 2178

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400>8

atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc	60
attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcggtg ggggtcacc	120
accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttggtg ttgtcgacaa caacggcaac	180
ggcgcacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc	240
ggcgacgtga tcaccgcgt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac	300
gcgcttaacg ggcacatcc cggtgacgtc atctcgtga cctggcaaac caagtcgggc	360

ES 2 574 403 T3

```

ggcacgcgta cagggaaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat      420
ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc      480
tcgctggtgg ccgcggtca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg      540
tcggcgtttc agtcgggtgt ctggggctctg acgggtgggt cgtggatagg ttcgtcggcg      600
ggtctgatgg tggcggcgcc ctcgccgtat gtggcggtga tgagcgtcac cgcggggcag      660
gccgagctga ccgccgccca ggtccgggtt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg      720
ctgacgggtgc ccccgccggt gatcgccgag aaccgtgtg aactgatgat tctgatagcg      780
accaacctct tggggcaaaa caccgcggcg atcgcggtca acgaggccga atacggcgag      840
atgtgggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg      900
gcgacgttgc tgccgttcga ggaggcggcg gagatgacca gcgcgggtgg gctcctcgag      960
caggcccgccg cggtcgagga ggcctccgac accgcccgcg cgaaccagtt gatgaacaat     1020
gtgcccaggg cgctgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag     1080
ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgccg catcggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg     1140
atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc     1200
tcgatgttga agggctttgc tccggcgggc gccgccaggg ccgtgcaaac cgcggcgcaa     1260
aacgggggtcc gggcgatgag ctgcgtgggc agctcgctgg gttcttcggg tctgggcggg     1320
ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttgtcggt gccgcaggcc     1380
tgggcgcggc ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgctgcgct gaccagcctg     1440
accagcgccg cggaaagagg gcccgggcag atgctggcg ggctgcgggt ggggcagatg     1500
ggcgccaggg ccggtggtgg gctcagtggt gtgctgcgtg ttccgcggcg accctatgtg     1560
atgccgcatt ctccggcagc cggcgatatc gcccgcggcg ccttgtcgca ggaccggttc     1620
gccgacttcc ccgcgctgcc cctcgaccgg tccgcgatgg tcgcccaagt ggggccacag     1680
gtggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacgcgc tgggcgcggc gaccggcatc     1740
gtcatcgatc ccaacgggtg cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg cgccaccgac     1800
atcaatgcgt tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac     1860
cgcacccagg atgtcgcggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcgggc     1920
atcgggtggc gcgtcgcggt tggtagccc gtcgtcgca tgggcaacag cggtgggcag     1980
ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggtcggc tcggccaaac cgtgcaggcg     2040
tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgcccg     2100
atccagcccg gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg     2160
aacacggccg cgtcctag                                     2178

```

<210> 9
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión de Mtb72f

<400>9

```

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

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
	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
 645 650 655

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

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

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> 10
 <211> 2172
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 10

atgacggccg	cgccgataa	ctccagctg	tcccagggtg	ggcagggtt	cgccattccg	60
atcggggcagg	cgatggcgat	cgcgggccag	atccgatcgg	gtggggggtc	acccaccgtt	120
catatcgggc	ctaccgcctt	cctcggtctg	ggtgtgtctg	acaacaacgg	caacggcgca	180
cgagtccaac	gcgtggtcgg	gagcgctccg	gcggcaagtc	tggcatctc	caccggcgac	240
gtgatcaccg	cggtcgacgg	cgctccgatc	aactcgcca	ccgcgatggc	ggacgcgctt	300
aacgggcctc	atcccggtga	cgctcatctg	gtgacctggc	aaaccaagtc	gggcggcacg	360
cgtacaggga	acgtgacatt	ggccgaggga	ccccggccg	aattcatggt	ggatttcggg	420
gcgttaccac	cggagatcaa	ctccgcgagg	atgtacccg	gcccgggttc	ggcctcgctg	480
gtggcccgcg	ctcagatgtg	ggacagcgtg	gcgagtgaac	tgttttcggc	cgcgtcggcg	540
tttcagtcgg	tggctcgggg	tctgacggtg	gggtcgtgga	taggttcgtc	ggcgggtctg	600
atggtggcgg	cggcctcgcc	gtatgtggcg	tggatgagcg	tcaccgcggg	gcaggccgag	660
ctgaccgcgg	cccaggctcc	ggttgctcgg	gcggcctacg	agacggcgta	tgggctgacg	720
gtgccccgcg	cggtgatcgc	cgagaaccgt	gctgaactga	tgattctgat	agcgaccaac	780
ctcttggggc	aaaacacccc	ggcgatcgcg	gtcaacgagg	ccgaatacgg	cgagatgtgg	840
gcccagagcg	ccgcgcgat	gtttggctac	gccgcggcga	ggcgacggc	gacggcgacg	900
ttgctgccgt	tcgaggaggc	gccggagatg	accagcgcg	gtgggctcct	cgagcaggcc	960
gccgcggctg	aggaggcctc	cgacaccgcc	gcggcgaacc	agttgatgaa	caatgtgccc	1020
caggcgctgc	aacagctggc	ccagcccacg	cagggcacca	cgccttcttc	caagctgggt	1080
ggcctgtgga	agacggtctc	gccgcacggg	tcgccgatca	gcaacatggt	gtcgatggcc	1140
aacaaccaca	tgtcgatgac	caactcgggt	gtgtcgatga	ccaacacctt	gagctcgatg	1200
ttgaagggct	ttgctccggc	ggcgggccgc	caggccgtgc	aaaccgcggc	gcaaaacggg	1260
gtccggggcg	tgagctcgct	gggcagctcg	ctgggttctt	cgggtctggg	cggtgggggtg	1320
gccgccaaact	tgggtcgggc	ggcctcggtc	ggttcgttgt	cggtgccgca	ggcctgggcc	1380
gcggccaacc	aggcagtcac	cccggcgggc	cgggcgctgc	cgctgaccag	cctgaccagc	1440
gccgcggaaa	gagggcccgg	gcagatgctg	ggcgggctgc	cggtggggca	gatggggcgc	1500

```

agggccggtg gtgggtcag tgggtgtctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg      1560
cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac      1620
ttccccgcgc tggccctcga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acaggtggtc      1680
aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc      1740
gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat      1800
gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc      1860
caggatgtcg cgggtctgca gctgcgcggt gccggtggcc tgcgctcggc ggcgatcggc      1920
ggcggcgctc cggttggtga gcccgctcgc gcgatgggca acagcggtag gcagggcgga      1980
acgccccgtg cggtgcttgg cagggtggtc gcgctcgcc aaaccgtgca ggcgtcggat      2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag      2100
cccggtgatt cgggcgggcc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg      2160
gccgcgtcct ag                                                    2172

```

<210> 11
 <211> 729
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión de Mtb72f con 6 restos de his adicionales

<400> 11

```

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

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
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	Ala	Tyr	Glu	225	230	235
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
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		
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> 12
 <211> 2190
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 12

atgcatcacc atcaccatca cagggccgcg tccgataact tccagctgtc ccaggggtggg	60
cagggattcg ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt	120
gggggggtcac ccaccgttca tatcgggcct accgccttcc tcggcttggg tgttgctgac	180
aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc	240
ggcatctcca ccggcgacgt gatcacccgc gtcgacggcg ctccgatcaa ctcggccacc	300
gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat cccggtgacg tcatctcggt gacctggcaa	360
accaagtcgg gcggcacgcg tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa	420
ttcatggtgg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgcgaggat gtacgccggc	480
ccgggttcgg cctcgctggt ggccgcggct cagatgtggg acagcgtggc gagtgacctg	540
ttttcggccg cgteggcggt tcagtcggtg gtctggggtc tgacgggtggg gtcgtggata	600
ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgccgt atgtggcgtg gatgagcgtc	660
accgcggggc agggcgagct gaccgcggcc caggtccggg ttgctgcggc ggcctacgag	720

acggcggtatg ggctgacggt gccccgcgcg gtgatcgccg agaaccgtgc tgaactgatg 780
 attctgatag cgaccaacct cttggggcaa aacaccccg cgatcgcggt caacgaggcc 840
 gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcggcgacg 900
 gcgacggcga cggcgacggt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcggggt 960
 gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctcgc acaccgccgc ggcgaaccag 1020
 ttgatgaaca atgtgcccc ggcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080
 ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acgggtctgc cgcacggtc gccgatcagc 1140
 aacatgggtg cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200
 aacaccttga gctcgatggt gaagggttt gctccggcgc cggccgccca ggcggtgcaa 1260
 accgcgggcg aaaacgggg cccggcgatg agctcgctgg gcagctcgct gggttcttcg 1320
 ggtctgggcg gtgggggtgg cgcgaacttg ggtcgggcgc cctcggtcgg ttcgttgtcg 1380
 gtgccgcagg cctggggccgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcggcgcg ggcgctgccg 1440
 ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggcccggc agatgctggg cgggctgccg 1500
 gtggggcaga tgggcgccag ggccggtggt gggctcagt gtgtgctgcg tgttcgccg 1560
 cgaccctatg tgatgccga ttctccgga gccggcgata tcgccccgc ggccttgtcg 1620
 caggaccggt tcgccgactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtccgcgat ggtcgccaa 1680
 gtggggccac aggtgggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc 1740
 gggaccggca tcgtcatcga tcccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800
 ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg 1860
 gtcgggtatg accgcaccca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgccggtgc cgggtggcctg 1920
 ccgtcggcgc cgatcggtgg cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980
 agcgggtggc agggcggaac gcccgtgcg gtgcctggca ggggtggtcg gctcggccaa 2040
 accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100
 ttcgatgccg cgatccagcc cggtgattcg ggcgggccc tcgtcaacgg cctaggacag 2160
 gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 13
 tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CpG Oligo 2 - CpG 1758

	<400> 14 tctcccagcg tgcgcat	18
5	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> CpG Oligo 3	
15	<400> 15 accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
20	<210> 16 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> CpG Oligo 4 - CpG 2006	
25	<400> 16 tcgtcgttt gtcgtttgt cggt	24
30	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> CpG Oligo 5 - CpG 1686	
35	<400> 17 tccatgacgt tcctgatgct	20

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende un antígeno relacionado con Rv1196, en la que el antígeno relacionado con Rv1196 comprende (a) una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID No: 1 o (b) un fragmento de SEQ ID No: 1 que tiene una longitud de al menos 350 aminoácidos y en la que la conductividad de la composición es de 5 mS/cm o menor y en la que el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,0 a 9,0.
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.
4. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 40 mM o menor.
5. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de cloruro sódico en dicha composición es de 40 mM o menor.
6. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un agente de tonicidad no iónico que es un poliol.
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).
9. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además uno o más inmunoestimulantes.
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 la reivindicación 10, en la que la composición inmunógena comprende monofosforil lípido A 3-des-O-acilado.
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 µl y 1 ml.
14. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la dosis unitaria contiene de 1 a 100 µg de la proteína relacionada con Rv1196.
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 µg 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 µg de QS21.
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 7,25 a 8,75.
18. 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.
19. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el antígeno relacionado con Rv1196 comprende 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 Rv1196 comprende la SEQ ID No: 1.
21. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el antígeno relacionado con Rv1196 comprende un fragmento de SEQ ID No: 1 que tiene una longitud de al menos 350 aminoácidos.
22. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el antígeno relacionado con Rv1196 contiene menos de 1.000 restos de aminoácidos.

23. La composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en medicina.

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

Figura 1

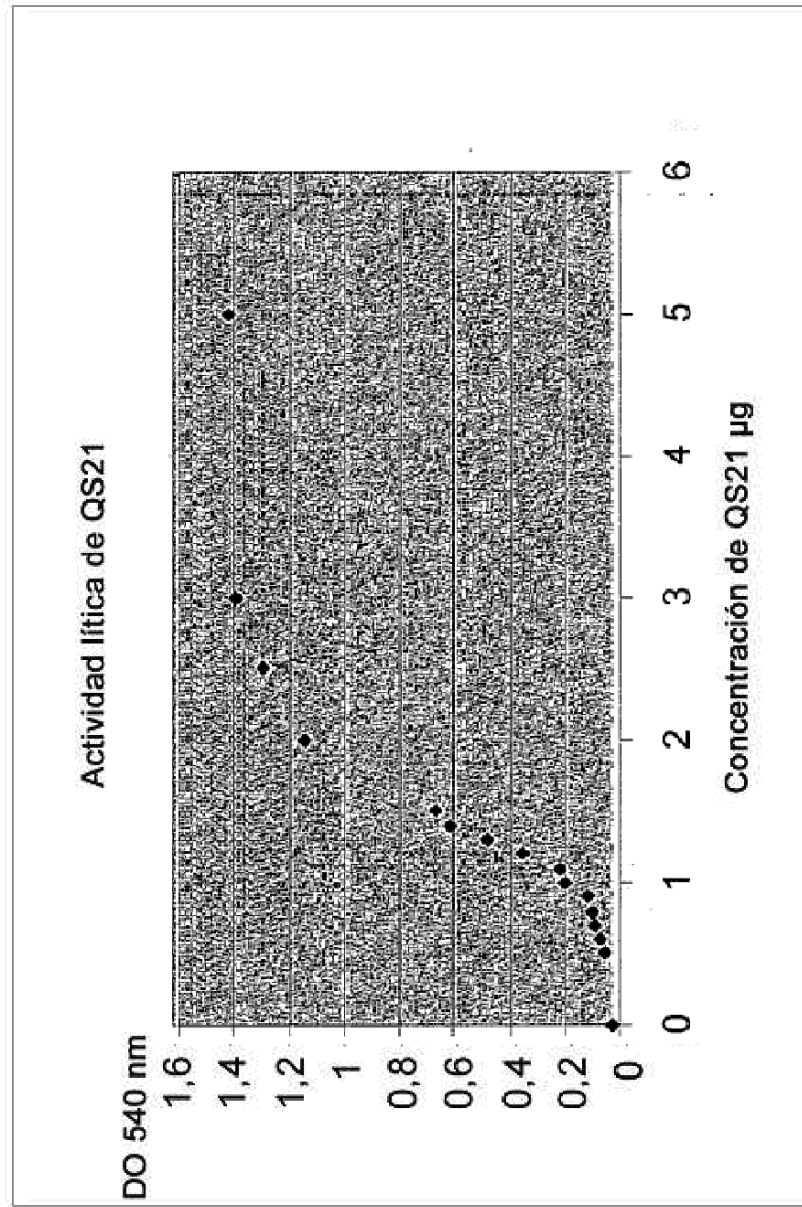


Figura 2

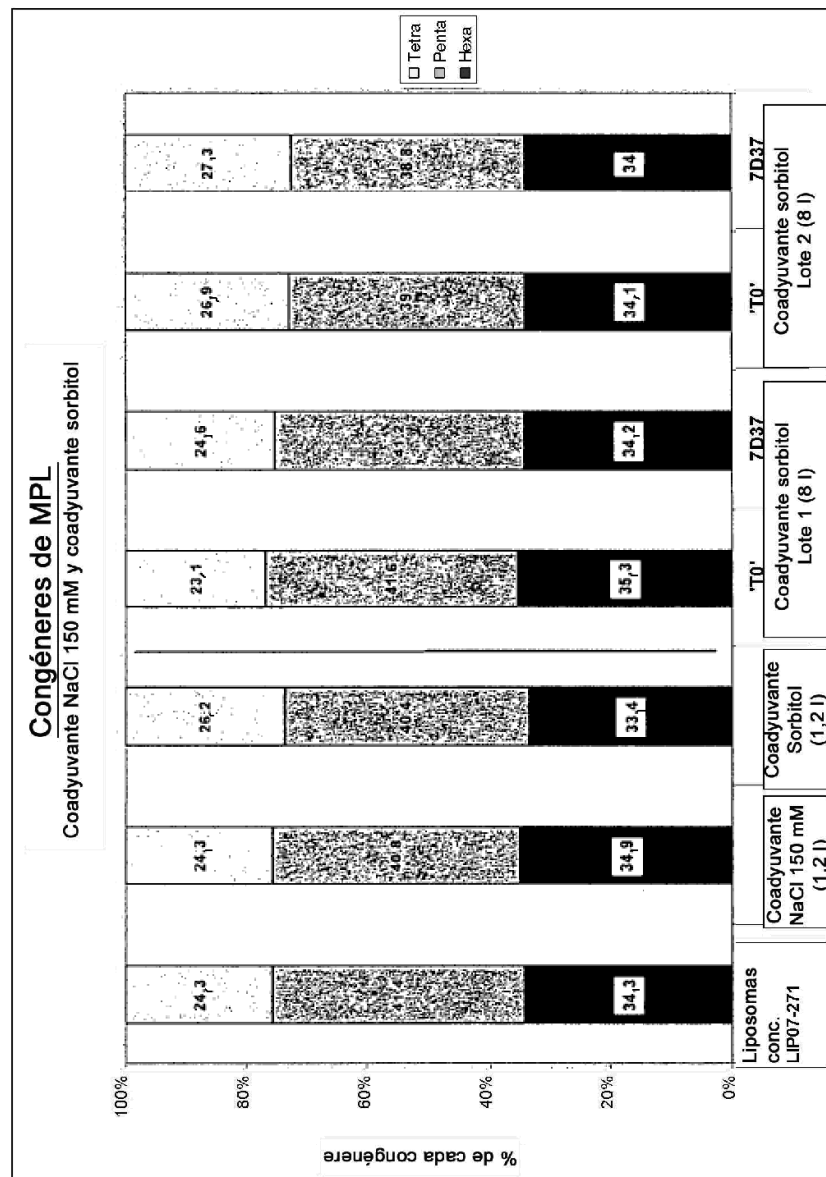


Figura 3

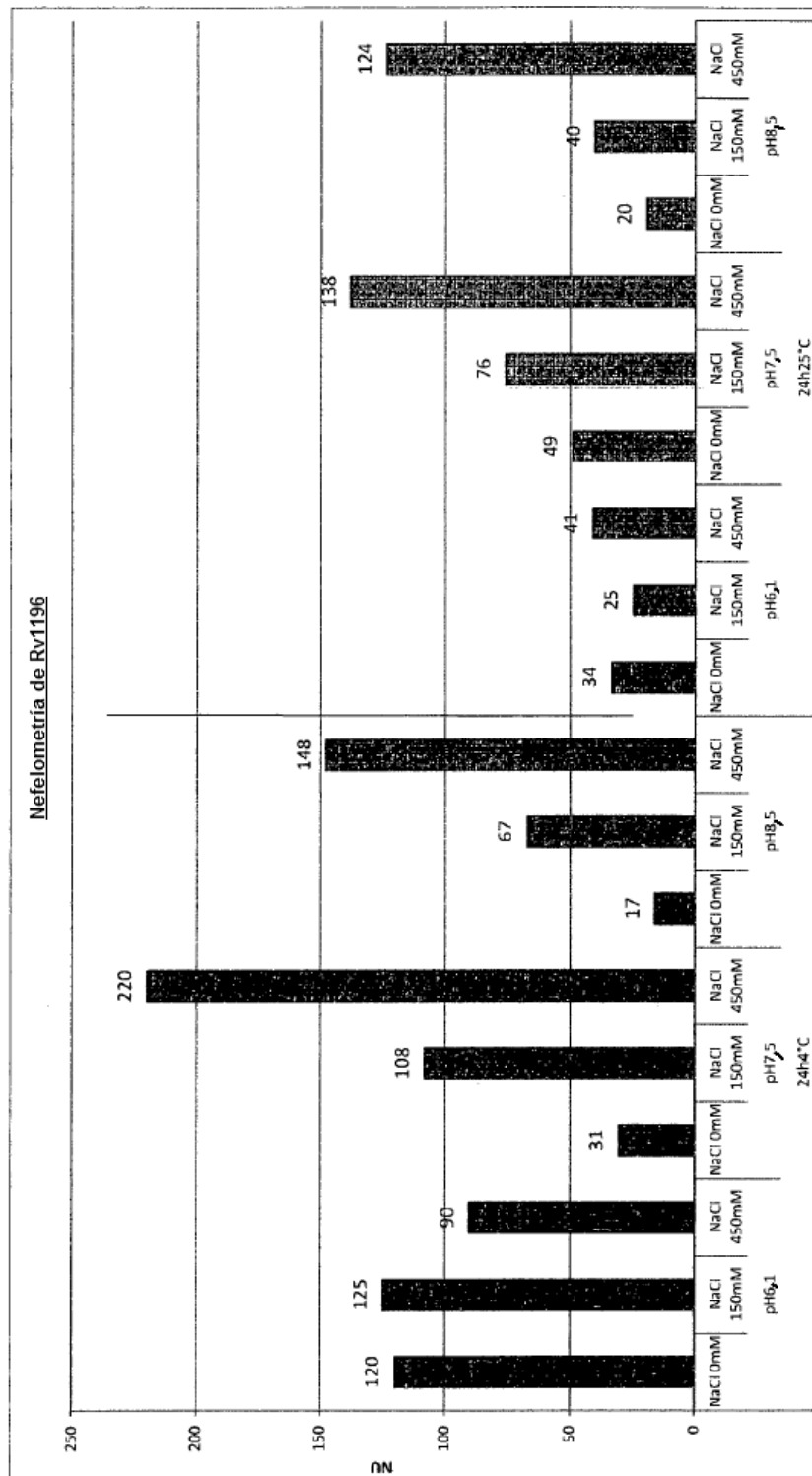


Figura 4

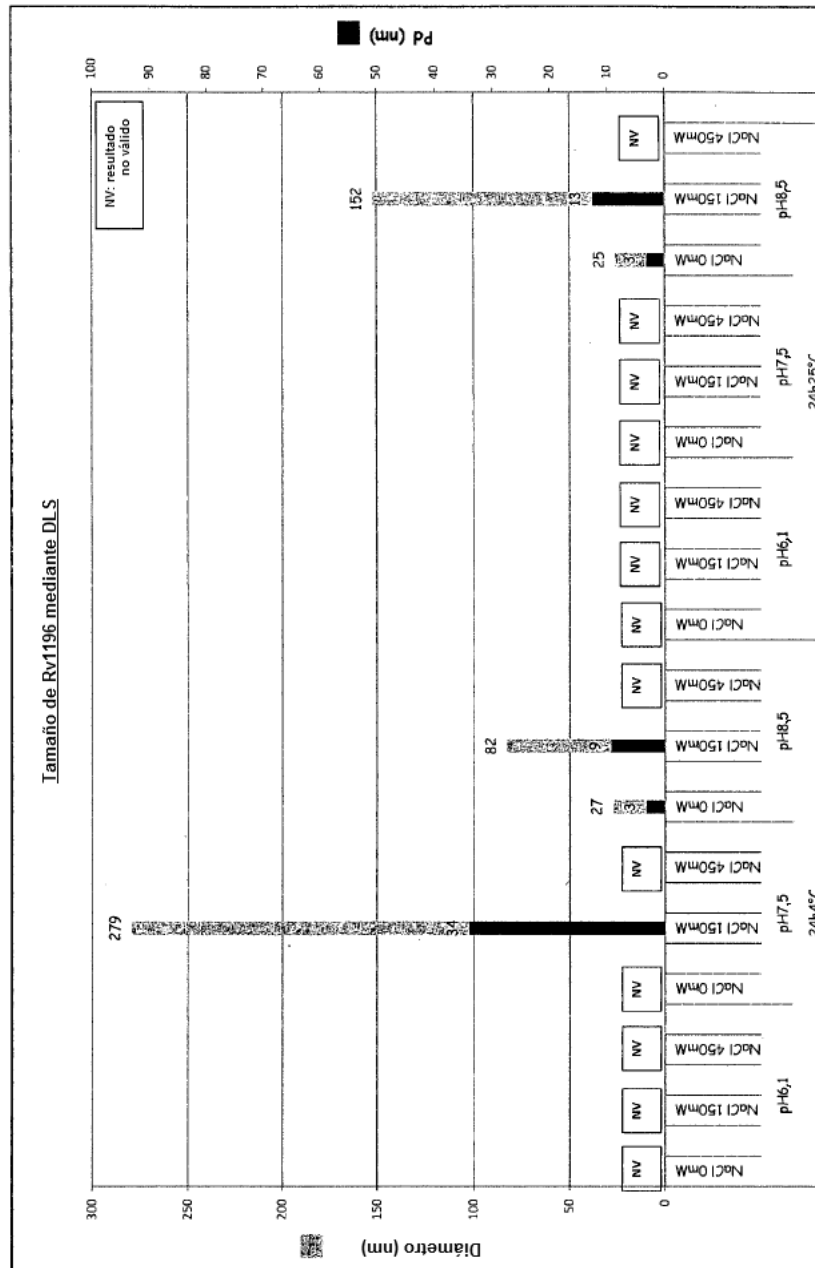


Figura 5

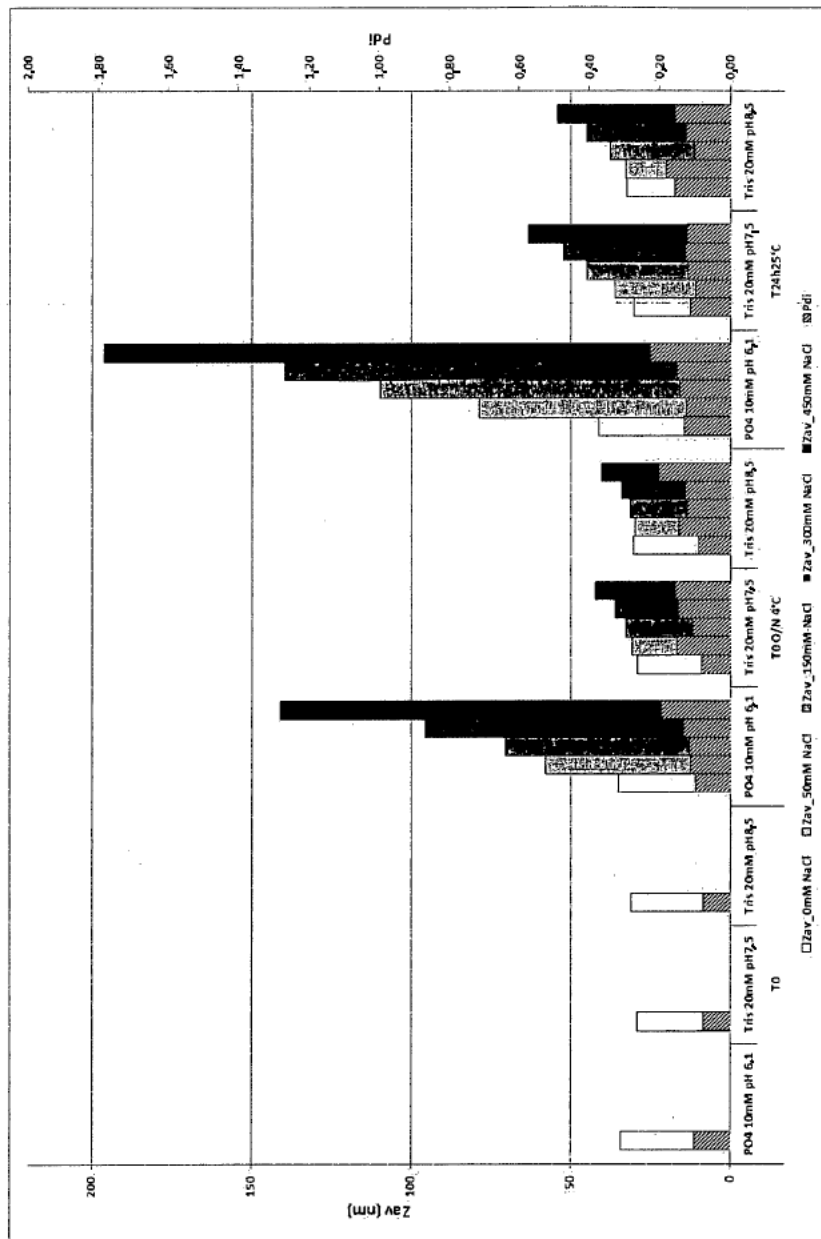


Figura 6

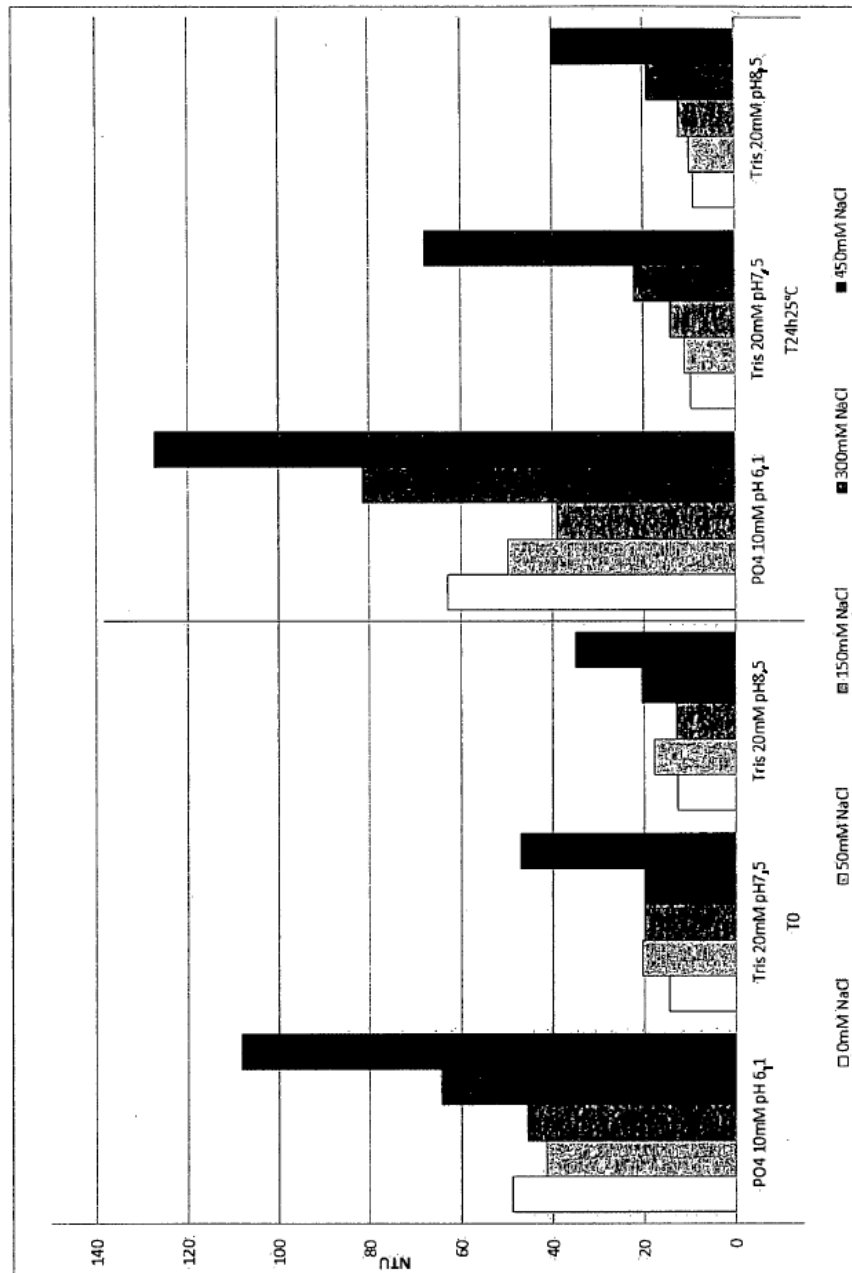


Figura 7

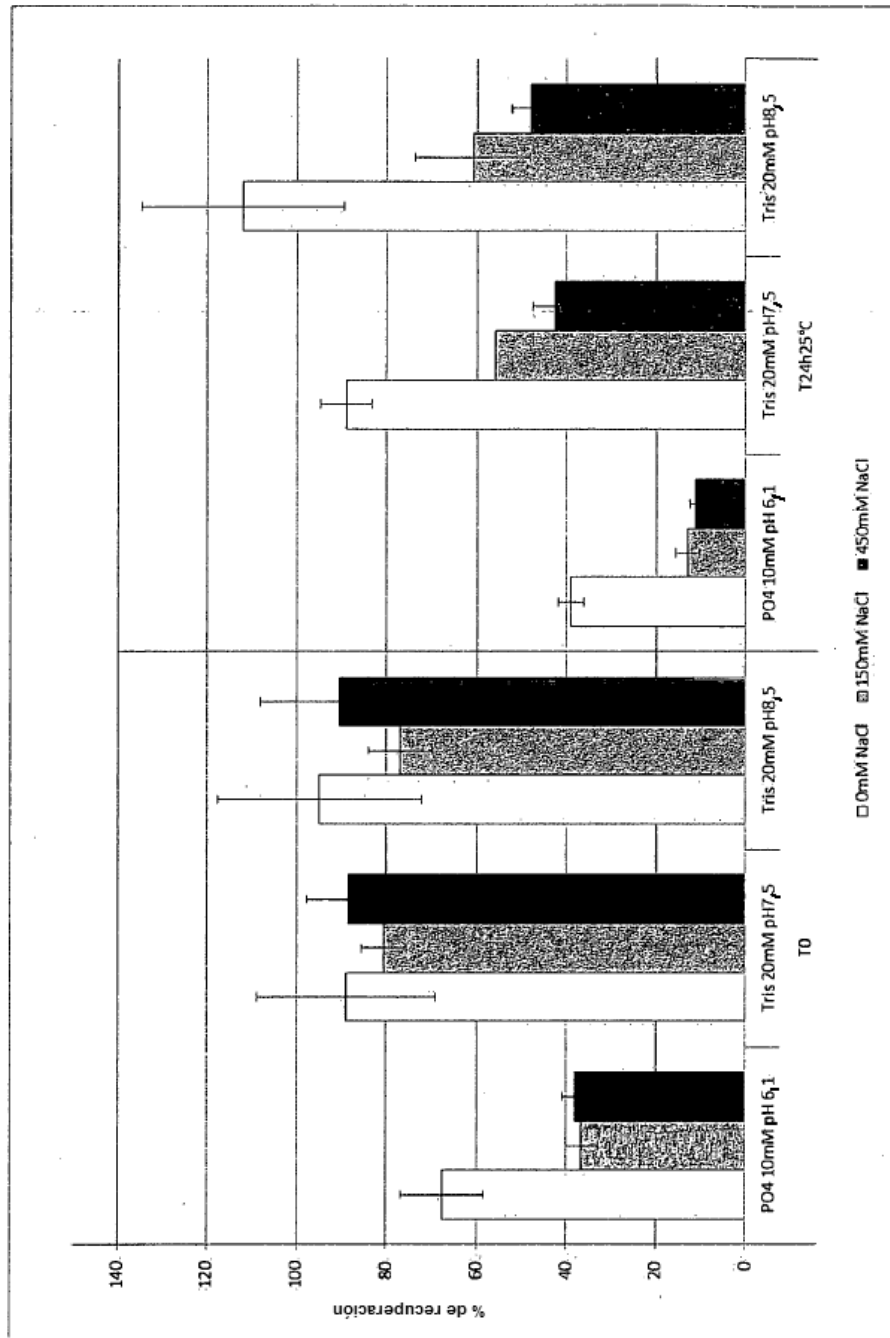
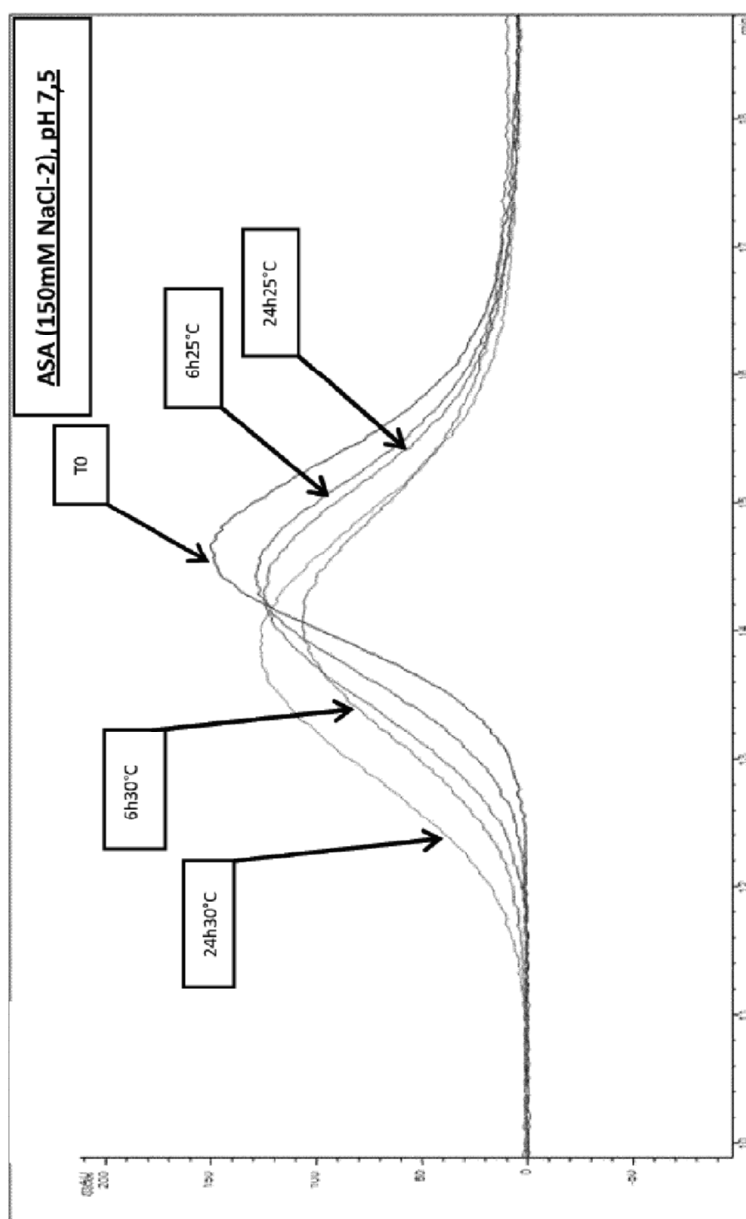
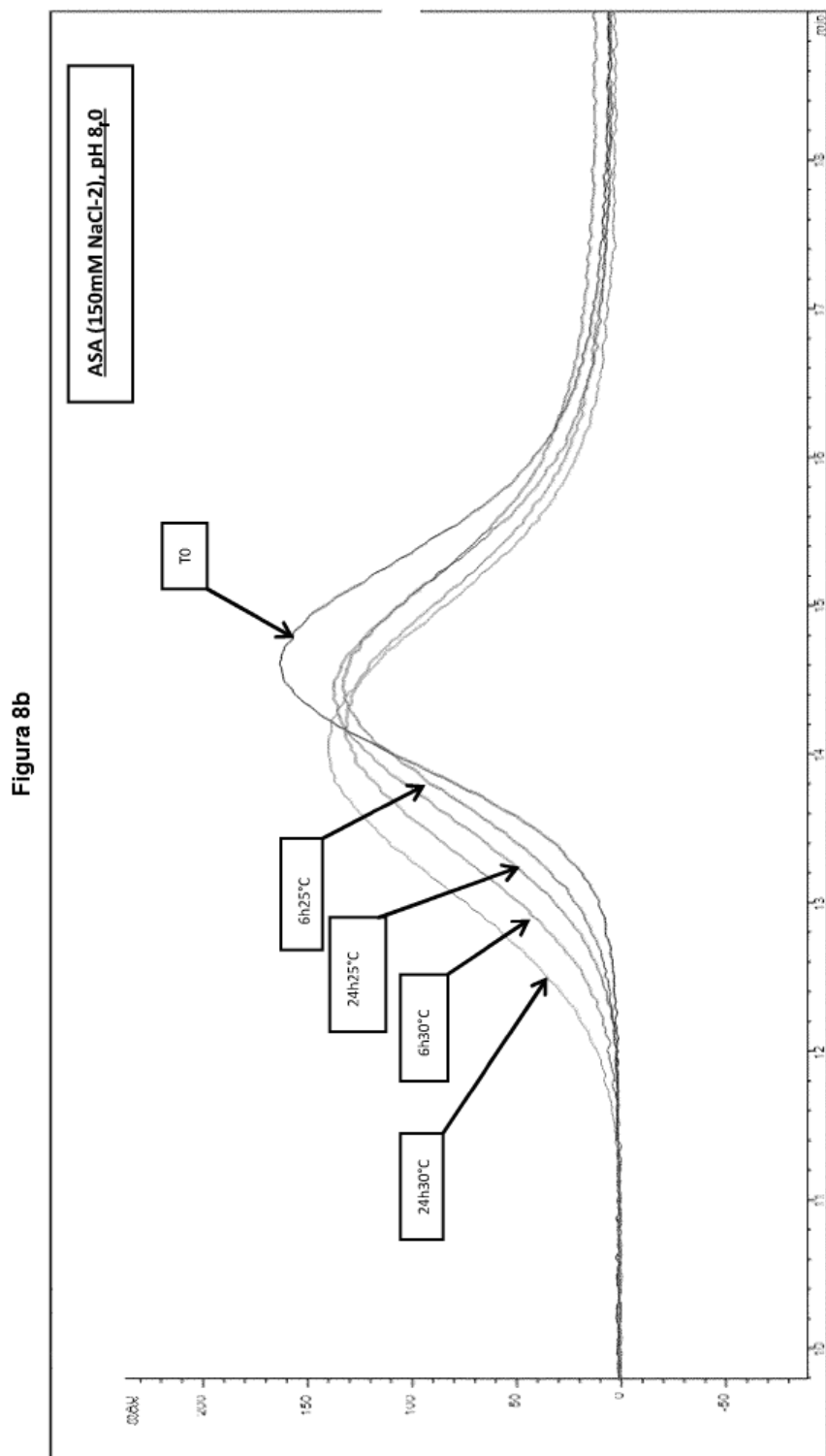


Figura 8a





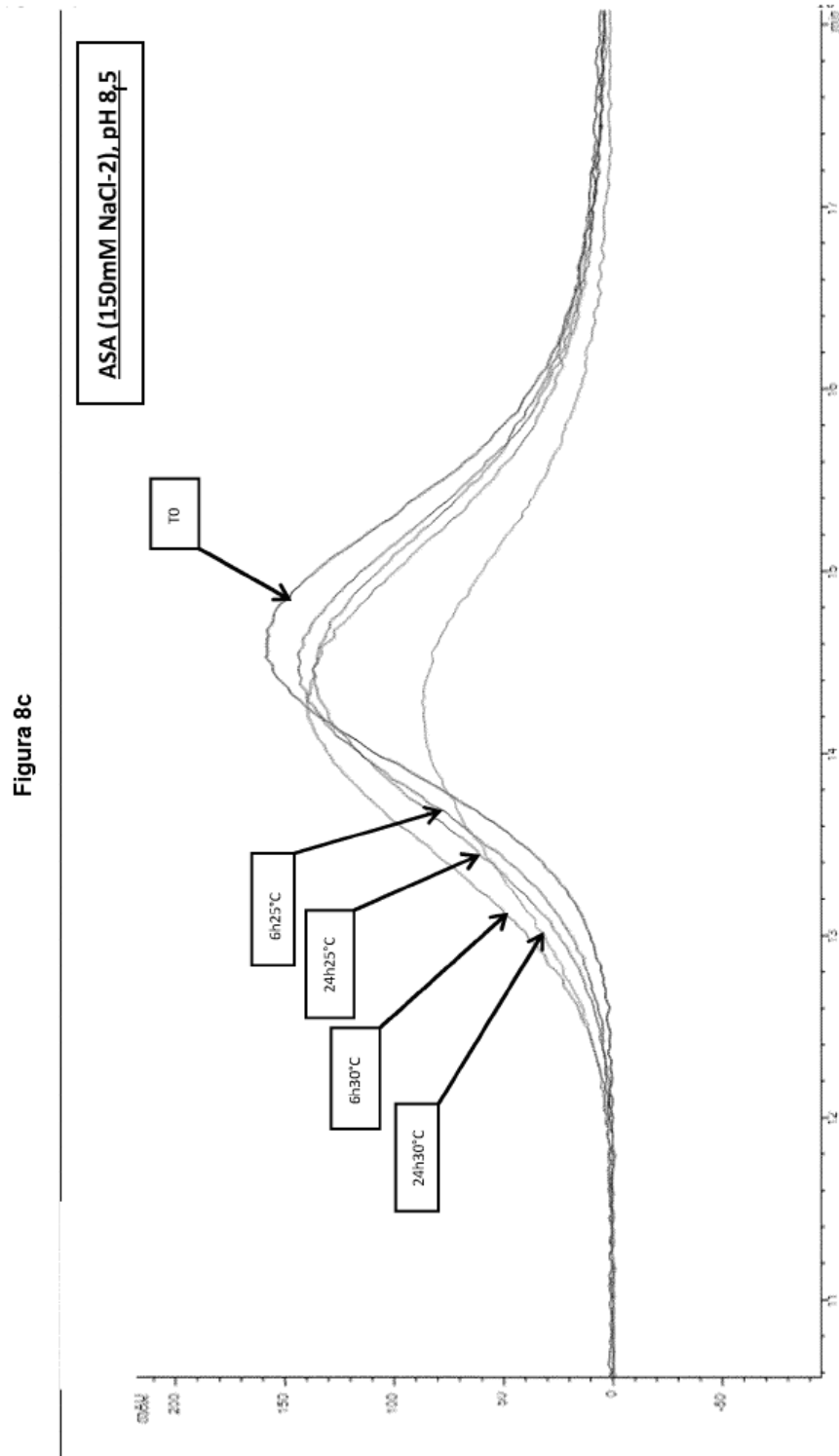


Figura 8d

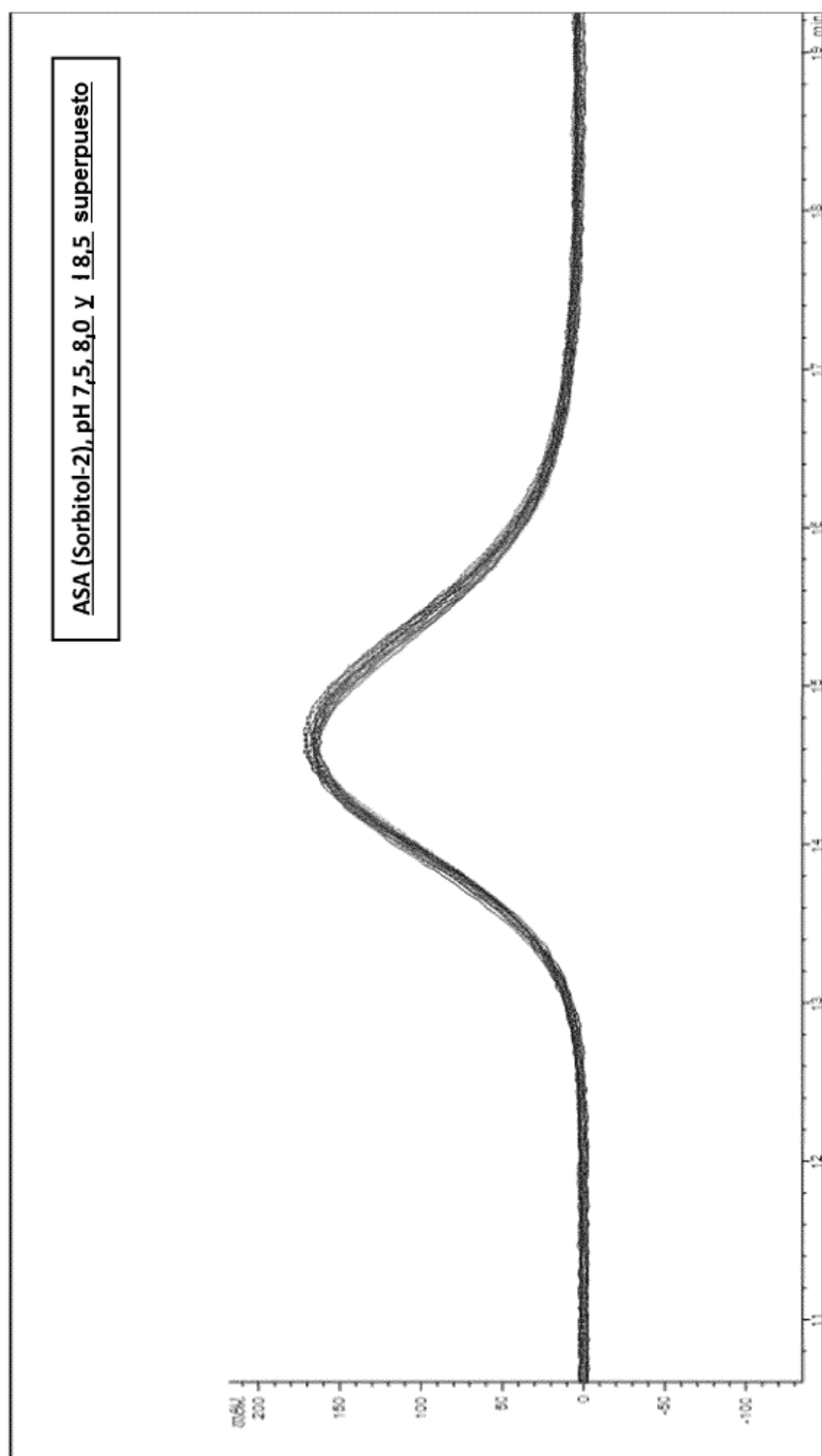


Figura 9

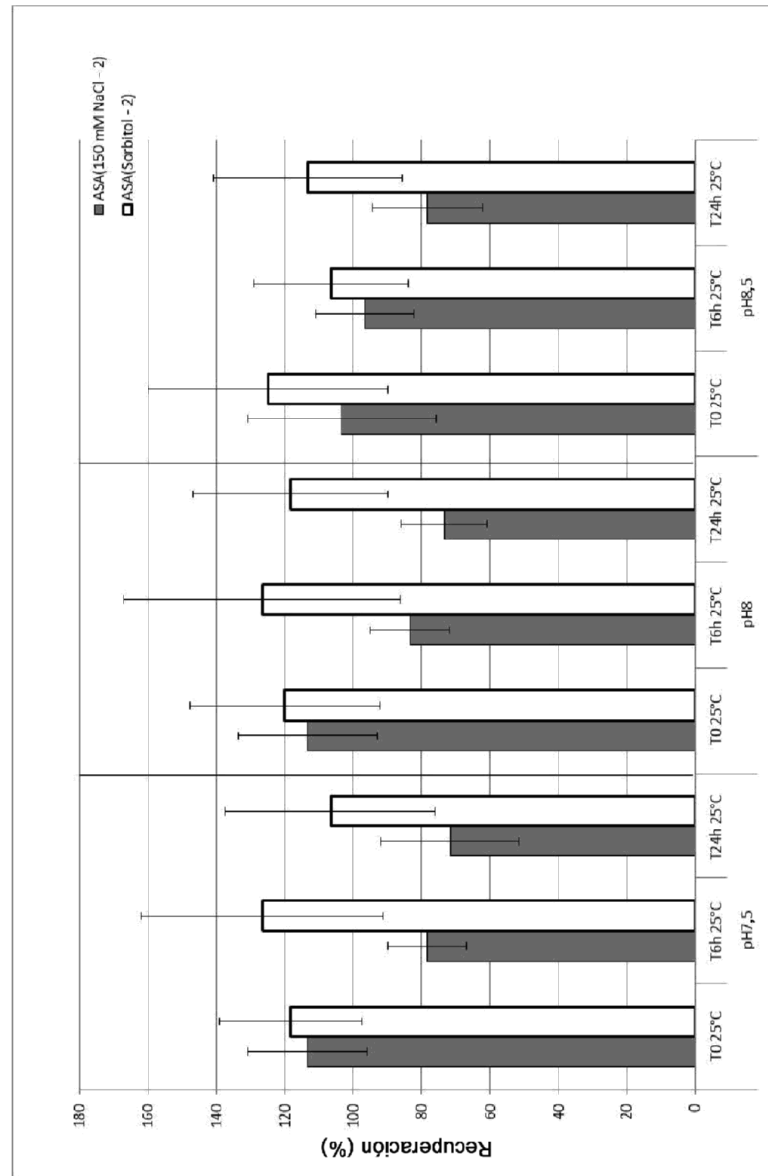


Figura 10

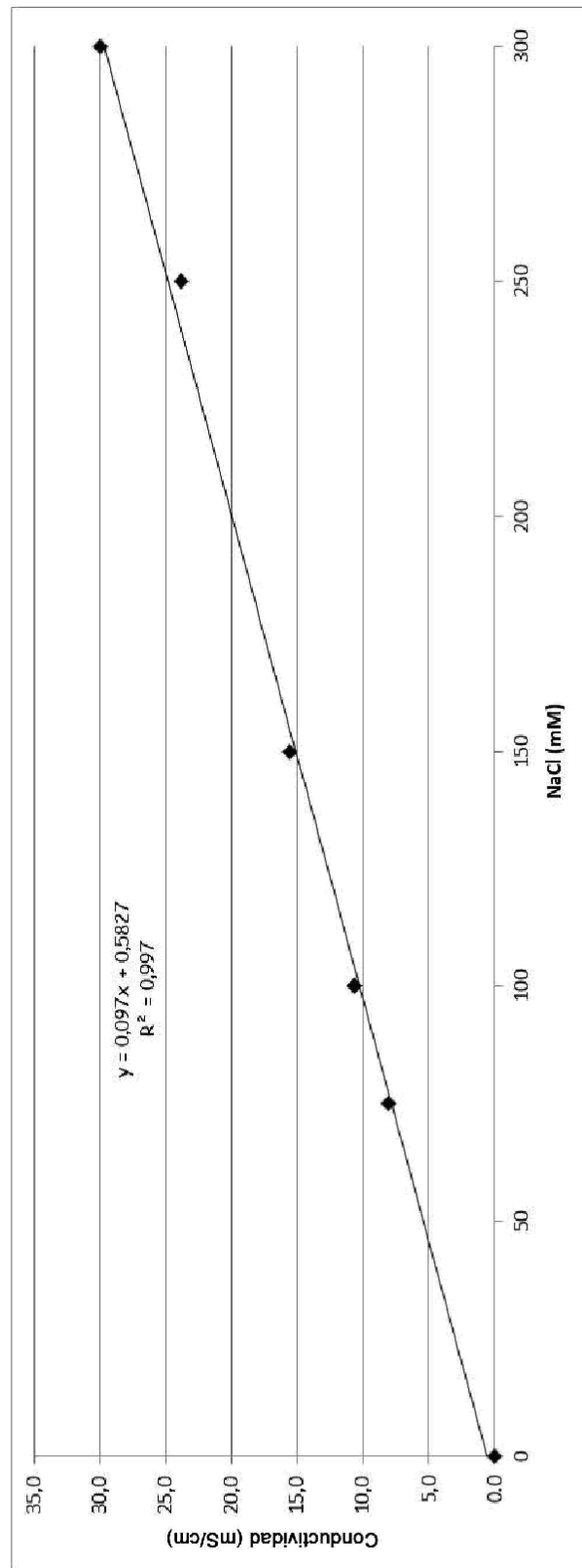


Figura 11

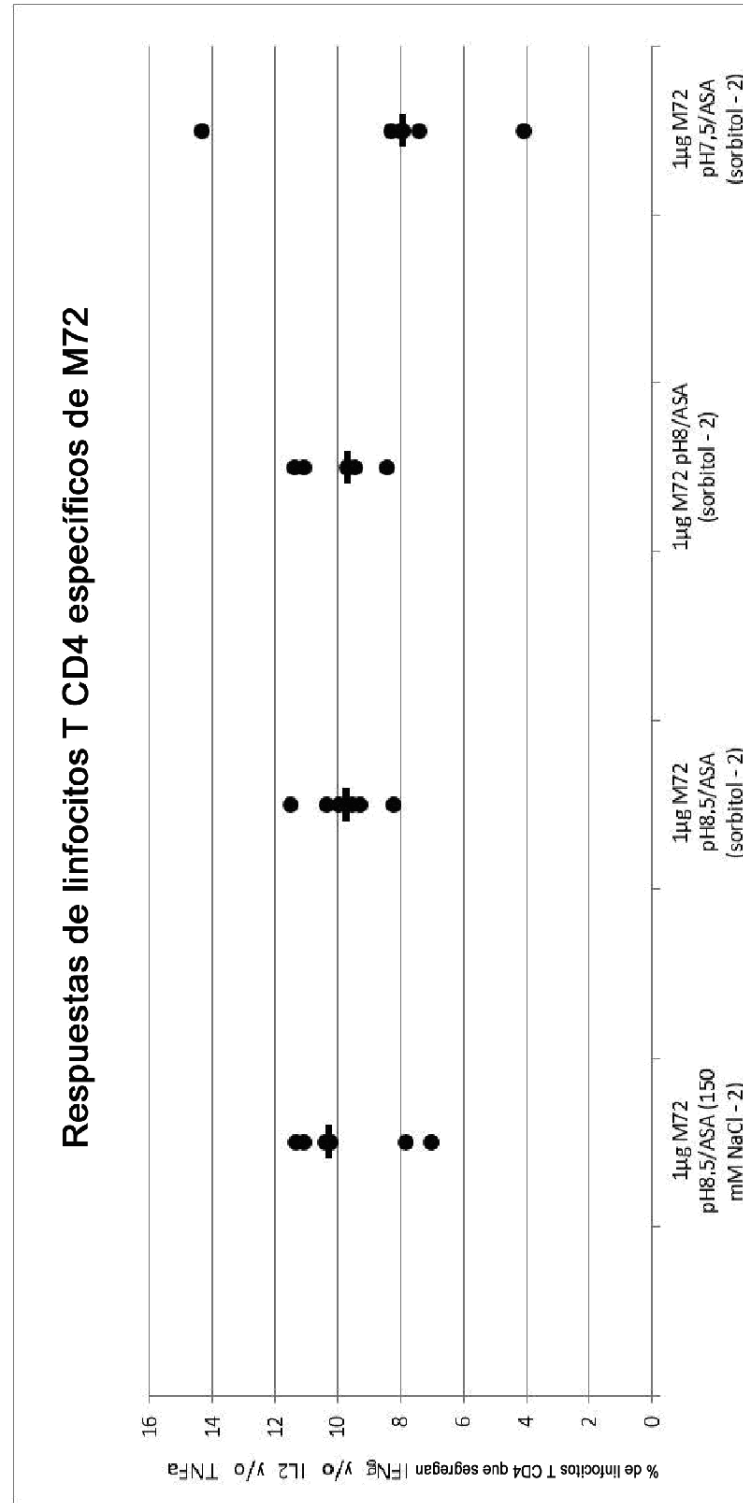


Figura 12

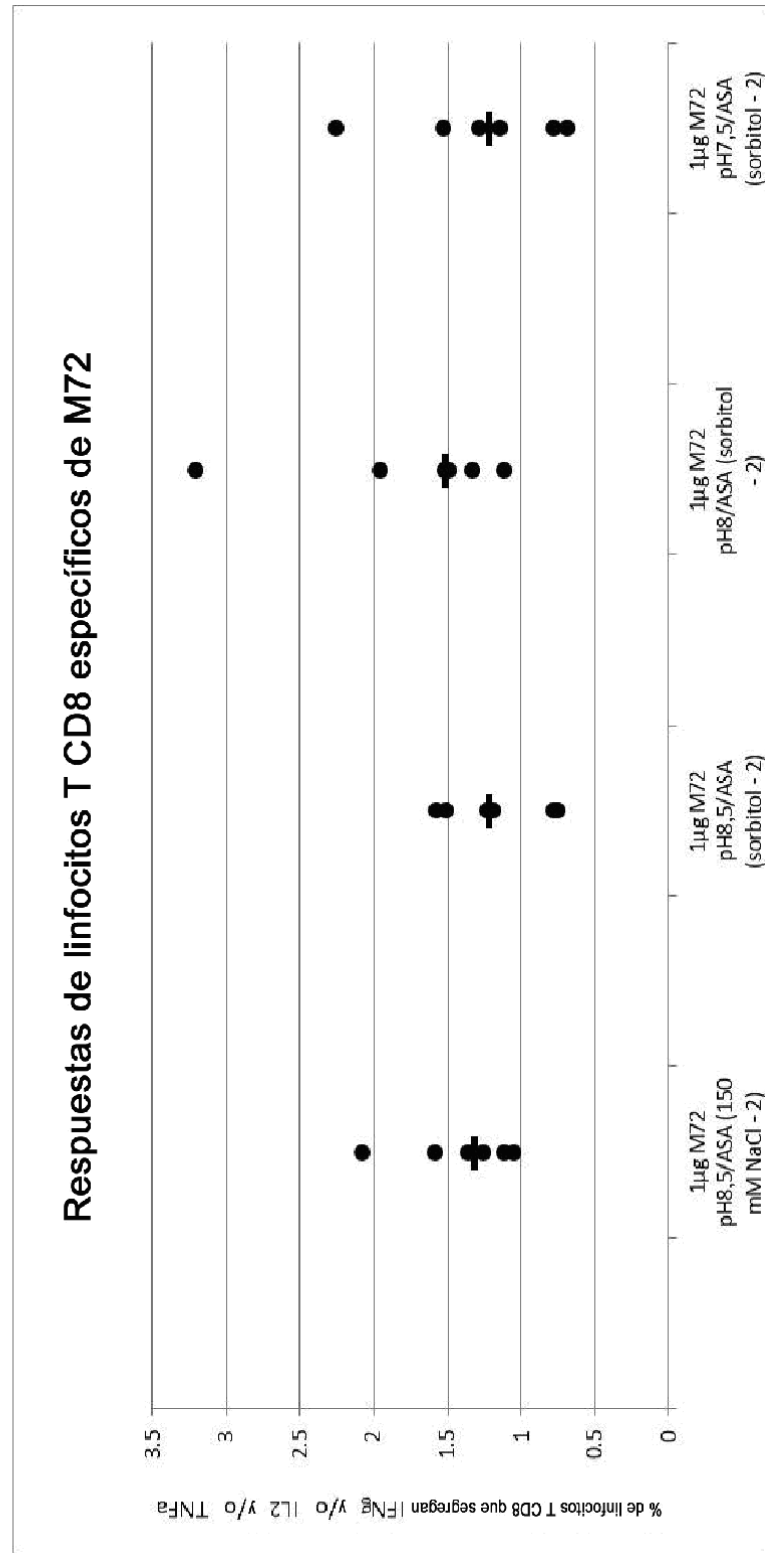


Figura 13

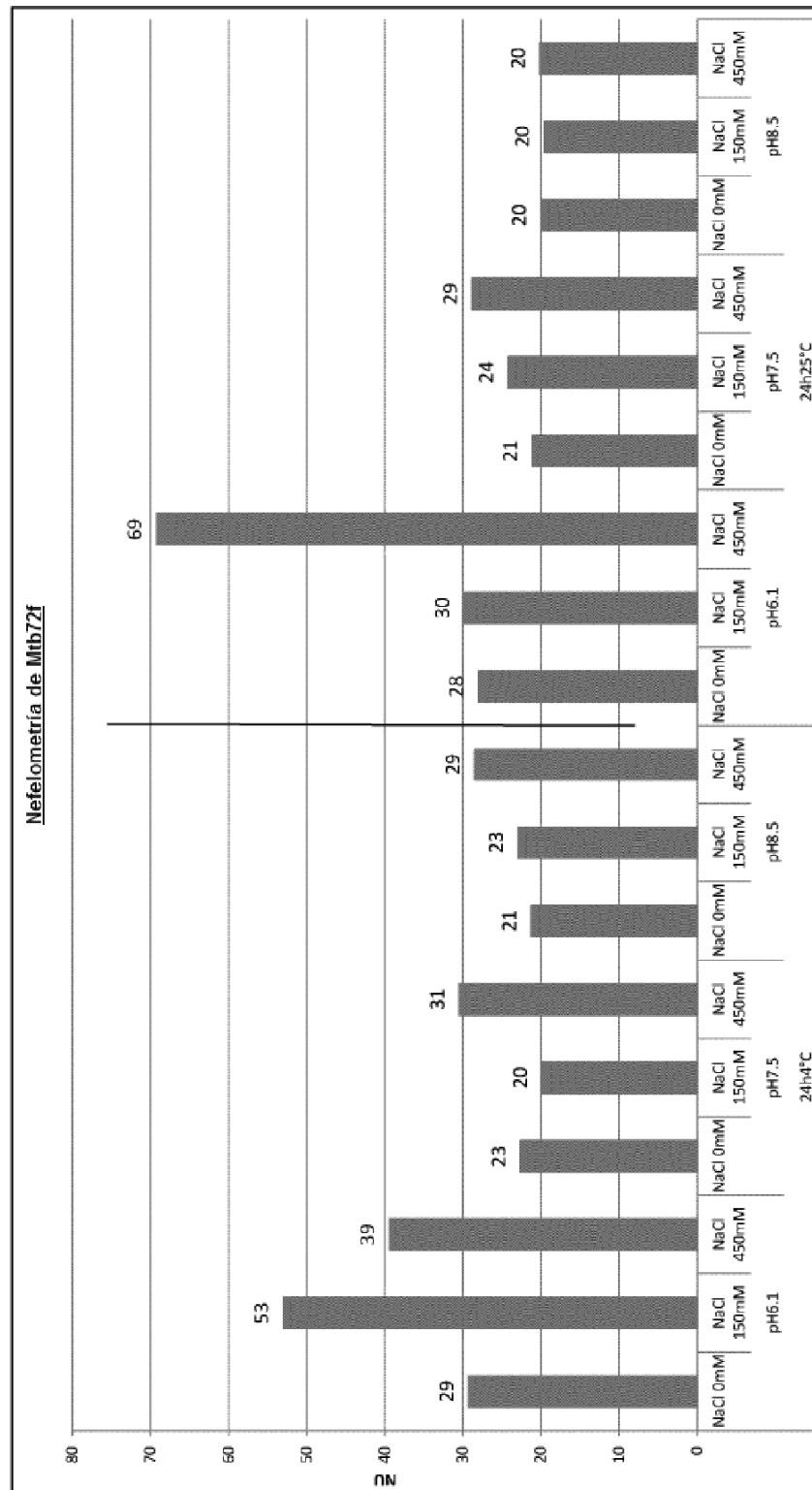


Figura 14

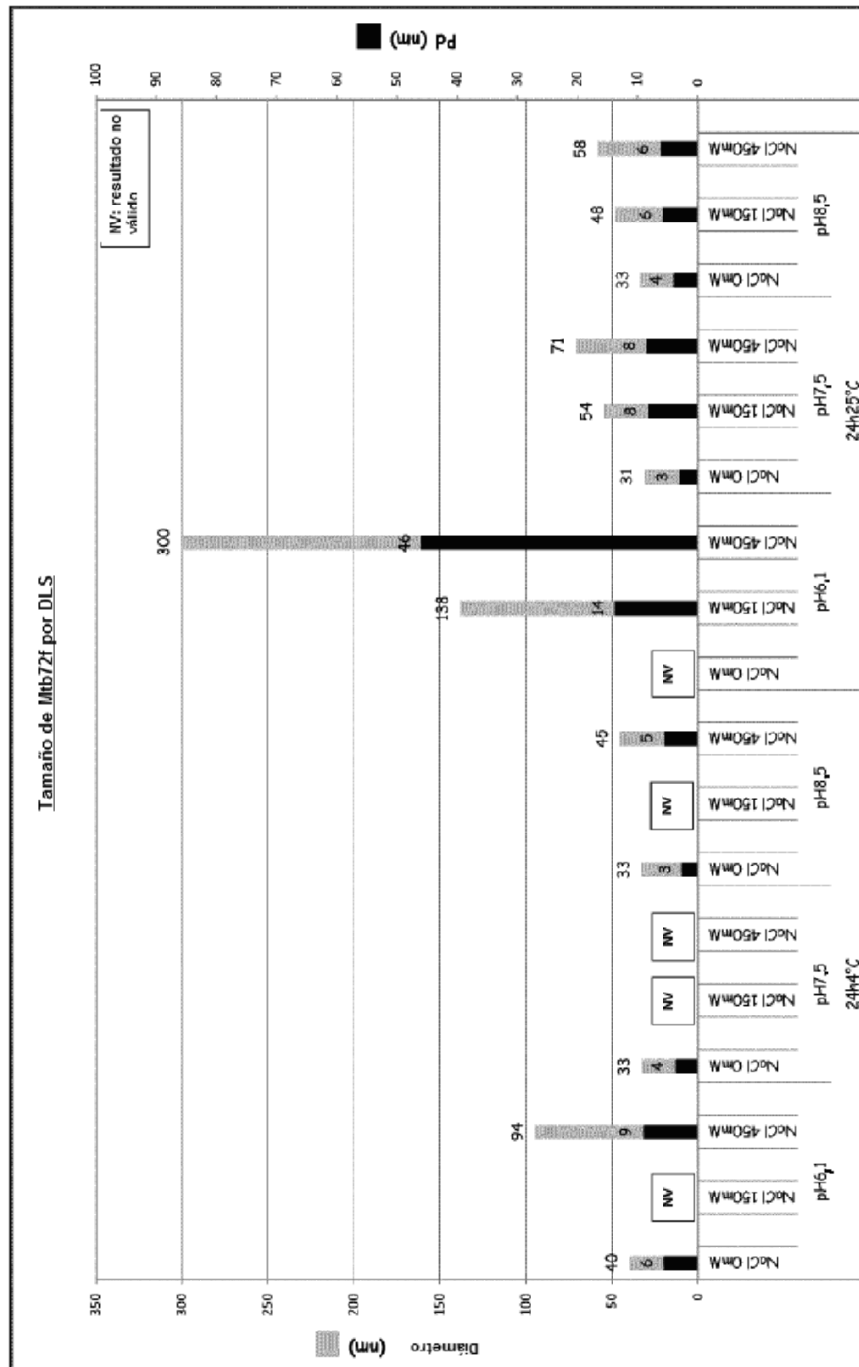


Figura 15

