

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 651**

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 15201196 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3023106**

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:

17.03.2020

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 2 748 651 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 inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72 y que tienen una fuerza iónica baja. En particular, la presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,5 a 8,5, y la concentración de cloruro de sodio es 50 mM o menor. La presente invención también se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden además uno o más inmunoestimulantes.

Antecedentes de la invención

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

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

20 La formulación de antígenos de proteína es extremadamente importante para asegurar que se mantiene la inmunogenicidad. A veces, se usan inmunoestimulantes para mejorar la respuesta inmunitaria elevada para cualquier antígeno dado. Sin embargo, la inclusión de coadyuvantes en una composición inmunogénica 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.

Sumario de la invención

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

30 La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en el que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID NO: 1, el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,5 a 8,5 y la concentración de cloruro de sodio es 50 mM o menor.

Breve descripción de los dibujos

- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Figura 1. Curva de actividad lítica de QS21
 - Figura 2. Porcentaje de cada congénere de 3D-MPL en las diferentes formulaciones de ASA
 - Figura 3. DLS de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
 - Figura 4. Nefelometría de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
 - Figura 5. Estabilidad antigénica de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
 - Figura 6^a-6d Análisis de SEC-HPLC de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento
 - Figura 7. Antigénicidad de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después

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

Breve descripción de identificadores de secuencia

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

Descripción detallada de la invención

30 En un primer aspecto de la presente divulgación hay una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que la conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor. En particular, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en las que la conductividad de la composición inmunogénica es de 12 mS/cm o menor, por ejemplo 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o 3 mS/cm o menor. En un ejemplo particular, la conductividad de la composición inmunogénica es de 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor. En un ejemplo específico adicional, la conductividad de la composición

35 inmunogénica es de 1,5 a 2,5 mS/cm.

En un segundo aspecto de la presente divulgación hay una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 130 mM o menor. En particular, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en las que la concentración de sales en dicha composición es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo 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 ejemplo específico adicional, la concentración de sales en dicha composición es de 20 a 40 mM, tal como de 25 a 35 mM.

40

En un tercer aspecto de la presente divulgación hay una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de cloruro de sodio es de 130 mM o menor. En particular, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en las que la concentración de cloruro de sodio es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, 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 inmunogénica 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 inmunogénica es de o es inferior a 5 mM. En otra realización específica, la composición inmunogénica 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).

45

50

De acuerdo con la presente invención hay una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,5 a 8,5 y la concentración de cloruro de sodio es de 50 mM o menor.

55

Adecuadamente, la concentración de CaCl₂ en las composiciones inmunogénicas será de 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor, 15 mM o menor o 10 mM o menor.

Adecuadamente, la concentración de MgSO₄ en las composiciones inmunogénicas será de 80 mM o menor, 60 mM o menor, 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor o 10 mM o menor.

Adecuadamente, la concentración de los iones NH₄⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ en las composiciones inmunogénicas será de 80 mM o menor, 60 mM o menor, 40 mM o menor, 30 mM o menor, 20 mM o menor o 10 mM o menor.

5 Las composiciones inmunogénicas de la invención serán preparaciones acuosas.

La conductividad de una composición inmunogénica 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).

10 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: BQ011EAEL) de Biosupply. El cloruro se puede determinar usando un kit tal como el kit de ensayo enzimático de cloruro (número de catálogo: BQ006EAEL) de Biosupply.

15 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).

20 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.

25 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 están localizadas en tipos de células no macrófagas 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).

30 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.

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

40 La TB 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).

45 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.

50 Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el procedimiento usado más ampliamente para inducir inmunidad protectora. La *Mycobacterium* empleada más comúnmente para este fin es *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), una cepa no virulenta de *M. bovis* que se desarrolló por primera vez hace unos 60 años. Sin embargo, la seguridad y la

eficacia de BCG es una fuente de controversia aunque protege contra la manifestación de la enfermedad grave en niños, BCG no evita el establecimiento de TB latente o la reactivación de enfermedad pulmonar en la vida adulta. Adicionalmente, algunos países, tales como los Estados Unidos, no vacunan a la población con este agente.

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

10 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).

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

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

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

30 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); Beiβbarth 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 inmunogénico de M72 que contenga la mayoría (o de forma adecuada todos) los epítomos de linfocitos T intactos.

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

40 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 inmunogénicas del antígeno. Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son normalmente sustituciones conservadoras entre sí:

- 45
- 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)
 5 (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 inmunogénicas del antígeno.

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

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

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

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

30 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.

35 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.)).

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

parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10), y huecos terminales pesados. PILEUP se puede obtener a partir del paquete de software de análisis de secuencias de GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux y col., *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).

5 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 10 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 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 15 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 20 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.

25 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.

30 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.

35 En cualquier acontecimiento, los derivados inmunogénicos 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 40 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 45 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.

50 Los derivados particulares de la proteína de M72 incluyen aquellos con restos de His adicionales en el extremo N terminal (por ejemplo, dos restos de His, como se proporciona en la SEQ ID NO: 3; o una marca de polihistidina de cinco o en particular seis restos de His, que se pueden usar para la purificación de afinidad del níquel). Mtb72f (SEQ ID NO: 5) que contiene el resto 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).

55 De forma adecuada, un antígeno relacionado con M72 comprenderá, tal como que consistirá en, una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con M72, tal como al menos un 80 %, en particular al menos un 90 %, especialmente al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 99 %. Opcionalmente, un antígeno relacionado con M72 comprenderá, tal como que consistirá en, una secuencia que tiene al menos un 98 % de identidad con M72. En la presente invención, el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

60 Los antígenos relacionados con M72 típicos comprenderán, tal como que consistirán en, un derivado inmunogénico

de la SEQ ID No 1 o 3, que tiene un número pequeño de deleciones, inserciones y/o sustituciones. Los ejemplos son los que tienen deleciones de hasta 5 restos en 0-5 localizaciones, inserciones de hasta 5 restos en 0-5 cinco localizaciones y sustituciones de hasta 20 restos.

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

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

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

15 Se pueden destinar los componentes antigénicos adicionales para fortalecer o complementar las respuestas inmunitarias solicitadas por el antígeno relacionado con M72 en el campo de la prevención o del tratamiento de la tuberculosis o se podrían asociar antígenos adicionales con otros patógenos y se destinan para su administración con el antígeno relacionado con M72 por razones de conveniencia. Cuando están presentes varios componentes antigénicos dentro de la formulación, éstos se pueden proporcionar en forma de polipéptidos individuales o proteínas de fusión. En algunas circunstancias, se pueden proporcionar componentes antigénicos adicionales como un polinucleótido (o polinucleótidos).

20 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 inmunogénicas 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.

25 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.

30 En general, se usa cloruro de sodio (NaCl) como agente de tonicidad. Los presentes inventores han demostrado por primera vez que esos antígenos relacionados con M72 son particularmente sensibles al "desplazamiento salino", un procedimiento 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 inmunogénicas de la invención tengan una osmolalidad farmacéuticamente aceptable.

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

40 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.

45 En una realización, una concentración adecuada de poliol dentro de la composición inmunogénica 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.

50 En otra realización, la composición inmunogénica comprende sacarosa y sorbitol. En estas circunstancias, la composición inmunogénica 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.

5 El pH de las composiciones inmunogénicas 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. El pH de la composición inmunogénica de la presente invención está en el intervalo de 7,5 a 8,5.

10 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 inmunogénica comprende uno o más inmunoestimulantes.

15 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+, linfocitos 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 inmunogénica 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.

25 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 %.

35 Los esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular, la composición inmunogénica comprende colesterol como esteroil. Estos esteroides son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se desvela en el Índice de Merck, 11ª Ed., página 341, como un esteroil natural que se encuentra en la grasa animal.

40 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.

45 En otra realización, la composición inmunogénica 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).

50 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 desvelados 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 inmunogénica. 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 inmunogénicas de la presente invención.

Otros antagonistas de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los desvelados en el documento WO98/50399 o en la patente de los EE.UU. 6.303.347 (también se desvelan procedimientos para la preparación de AGP), de forma adecuada RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se desvelan 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 desvelados en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y en particular los compuestos desvelados 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 inmunogénica comprende tanto una saponina como un agonista de TLR4. En un ejemplo específico, la composición inmunogénica 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 inmunogénica. 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 inmunogénica 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 inmunogénica. 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 inmunogénica 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 inmunogénica, 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 inmunogénica. Determinadas composiciones inmunogénicas 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 inmunogénicas 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 inmunogénicas 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 inmunogénicas descritas en el presente documento tienen las siguientes secuencias. En una realización, estas secuencias contienen uniones internucleótidos 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 TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
- OLIGO 5 (SEQ ID NO: 13): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores ya que tienen deleciones o

adiciones inconsecuentes de las mismas.

En una realización, el inmunestimulante 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).

5 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas de:

- a. liofilizar un antígeno relacionado con M72; y
- b. reconstituir el antígeno relacionado con M72 liofilizado de la etapa a) con una solución acuosa en la que la conductividad de la solución es de 13 mS/cm o menor.

10 En determinados ejemplos, la conductividad de la solución acuosa es de 12 mS/cm o menor, por ejemplo 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o 3 mS/cm o menor. En un ejemplo particular, la conductividad de la solución acuosa es de 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor.

15 Adecuadamente, la conductividad de la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una conductividad de 13 mS/cm o menor, como 12 mS/cm o menor, por ejemplo 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o 3 mS/cm o menor. En un ejemplo particular, la conductividad de la solución resultante es 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor.

20 Además, se proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas de:

- a. liofilizar un antígeno relacionado con M72; y
- b. reconstituir el antígeno relacionado con M72 liofilizado de la etapa a) con una solución acuosa en la que la concentración de sales en dicha solución es de 130 mM o menor.

25 En determinados ejemplos, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

30 Adecuadamente, la concentración de sales en la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una concentración de sales de 130 mM o menor, tal como 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en la solución resultante es 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

Adicionalmente, en la presente divulgación se proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas:

35 a. liofilizar un antígeno relacionado con M72; y
b. reconstituir el antígeno relacionado con M72 liofilizado de la etapa a) con una solución acuosa en la que la concentración de cloruro de sodio en dicha solución es de 130 mM o menor.

40 En determinados ejemplos, la concentración de cloruro de sodio en dicha solución acuosa es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, 20 mM o menor, o 15 mM o menor. Adecuadamente, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es o está por debajo de 5 mM.

45 Adecuadamente, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una concentración de cloruro de sodio de 130 mM o menor, tal como 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de cloruro de sodio en la solución resultante es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

50 En un ejemplo, las soluciones acuosas de la etapa b) (anterior) comprenden una saponina y/o un agonista de TLR4, por ejemplo QS21 y/o 3D-MPL. En ejemplo adicional, la saponina y/o el agonista de TLR4 están en una formulación liposomal. En un ejemplo, las soluciones acuosas comprenden un agonista de TLR4 y una saponina en una formulación liposomal, y un agente de tonicidad no iónico como se describe en el presente documento, tal como un poliol. En particular, las soluciones acuosas pueden comprender sorbitol.

En la divulgación también se proporciona un kit que comprende:

a. un antígeno relacionado con M72 liofilizado; y

b. una solución acuosa en la que la conductividad de la solución es 13 mS/cm o menor.

5 En determinados ejemplos, la conductividad de la solución acuosa es de 12 mS/cm o menor, por ejemplo 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o 3 mS/cm o menor. En un ejemplo particular, la conductividad de la solución acuosa es de 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor.

10 Adecuadamente, la conductividad de la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una conductividad de 13 mS/cm o menor, tal como 12 mS/cm o menor, por ejemplo 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 5 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o 3 mS/cm o menor. En un ejemplo particular, la conductividad de la solución resultante es de 2,5 mS/cm o menor, tal como 2,25 mS/cm o menor, o 2,0 mS/cm o menor.

Adicionalmente, en la divulgación se proporciona un kit que comprende:

a. un antígeno relacionado con M72 liofilizado; y

b. una solución acuosa en la que la concentración de sales en dicha solución es de 130 mM o menor.

15 En determinados ejemplos, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

20 Adecuadamente, la concentración de sales en la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una concentración de sales de 130 mM o menor, tal como 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en la solución resultante es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

Además, en la divulgación se proporciona un kit que comprende:

25 a. un antígeno relacionado con M72 liofilizado; y

b. una solución acuosa en la que la concentración de cloruro de sodio en dicha solución es de 130 mM o menor.

30 En determinados ejemplos, la concentración de cloruro de sodio en dicha solución acuosa es de 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, 20 mM o menor, o 15 mM o menor. Adecuadamente, la concentración de cloruro de sodio en la solución es igual o menor a 5 mM.

35 Adecuadamente, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es tal que cuando el antígeno liofilizado se reconstituye, la solución resultante tiene una concentración de cloruro de sodio de 130 mM o menor, tal como 100 mM o menor, por ejemplo 90 mM o menor, 80 mM o menor, 70 mM o menor, 60 mM o menor, 50 mM o menor, o 40 mM o menor. En un ejemplo particular, la concentración de cloruro de sodio en la solución resultante es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 25 mM o menor.

Los kits se pueden adaptar para proporcionar una dosis única de la composición inmunogénica, tal como una dosis humana única, o dosis múltiples de la composición inmunogénica.

40 Las soluciones acuosas utilizadas en los kits de la divulgación pueden ser cualquiera de las soluciones acuosas como se define en el presente documento. En un ejemplo específico de la divulgación, la solución acuosa comprende un agonista de TLR4 y/o una saponina en forma de liposomas. En un ejemplo particular, el agonista TLR4 es 3D-MPL y la saponina es QS21. Las soluciones acuosas usadas en el presente documento pueden comprender un agente de tonicidad, por ejemplo un poliol, tal como sorbitol.

45 Con respecto a los kits y procedimientos mencionados anteriormente para la producción de composiciones inmunogénicas de la divulgación, se puede apuntar que el inmunoestimulante (o inmunoestimulantes) y el agente de tonicidad (o agentes de tonicidad), si están presentes, se pueden coliofilizar con el antígeno o estar contenidos en la solución acuosa según se desee. La solución acuosa puede ser simplemente agua para inyección y todos los demás componentes de la composición inmunogénica se coliofilizan con el antígeno. Normalmente, se proporcionan en la solución acuosa al menos algún inmunoestimulante (o algunos inmunoestimulantes) y algún agente de tonicidad (o algunos agentes de tonicidad), lo que es particularmente apropiado si determinados componentes son poco compatibles con la liofilización, tal como los liposomas. En un ejemplo, la solución acuosa comprende un inmunoestimulante. En un segundo ejemplo, la solución acuosa comprende un agente de tonicidad, por ejemplo, un agente de tonicidad no iónico, tal como un poliol, en particular sorbitol. En un tercer ejemplo, la solución acuosa comprende un inmunoestimulante y un agente de tonicidad, tal como un poliol, en particular sorbitol.

Los kits pueden comprender además instrucciones que guían en cuanto a la reconstitución del antígeno relacionado con M72 liofilizado usando la solución acuosa.

5 Las composiciones inmunogénicas 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 inmunogénicas 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 inmunogénica 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*.

10 También se proporciona en la divulgación un procedimiento para la profilaxis, el tratamiento o la mejora de una infección por micobacterias, tal como la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende la administración de una cantidad segura y eficaz de una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención.

La composición inmunogénica se puede proporcionar para el fin de:

- tratar tuberculosis activa;
- 15 - 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
- 20 - 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.

La expresión "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.

25 Las expresiones "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.

30 La expresión "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).

Las expresiones "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).

35 La expresión "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 inmunogénica a un sujeto que no está infectado o que tiene una infección latente por micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

45 El volumen de la composición inmunogénica 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.

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

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

un 95 % después de su almacenamiento a 25 °C durante un periodo de 24 horas.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de composición coadyuvante ASA (sorbitol)

- 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 Etapa 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.

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

Etapa 4: Filtración estéril

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

Etapa 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.
- 45

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

5 Se añadió tampón de fosfato Na_2/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 $6,1 \pm 0,1$ Etapa 4: Filtración estéril

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

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

15 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.

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

- 40
- Mayor que el nivel de base ($\text{DO} > 0,1$)
 - 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} .

ES 2 748 651 T3

Curva de QS21 de ejemplo

| ug QS21 | DO | QS21 desactivado |
|--|-------|------------------|
| 0 | 0,029 | NA |
| 0,5 | 0,052 | < LOD |
| 0,6 | 0,073 | < LOD |
| 0,7 | 0,091 | < LOD |
| 0,8 | 0,096 | < LOD |
| 0,9 | 0,12 | > 98,2% |
| 1 | 0,195 | > 98% |
| 1,1 | 0,212 | > 97,8% |
| 1,2 | 0,348 | > 97,6% |
| 1,3 | 0,479 | > 97,4% |
| 1,4 | 0,612 | > 97,2% |
| 1,5 | 0,669 | > 97% |
| 2 | 1,139 | > 96% |
| 2,5 | 1,294 | > 95% |
| 3 | 1,391 | > 94% |
| 5 | 1,416 | > 90% |
| Adyuvante* | 0,03 | > 98,2 % |
| *50 ug de equivalente de QS21 sometido a prueba. Tampón de cloruro de sodio 150 mM. | | |

Los datos anteriores se muestran gráficamente en la figura 1.

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

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

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

| Muestra | Punto temporal | LDD | QS21 desactivado |
|--|-----------------|-------|------------------|
| Composición coadyuvante (ASA) NaCl 150 mM | T0 | < 1,4 | > 97,2 % |
| | 7 días a 37 °C | < 0,9 | > 98,2 % |
| Composición coadyuvante (ASA) sorbitol, NaCl 5 mM | T0 | < 2 | > 97,8 % |
| | 7 días a 37 °C | <1 | > 96 % |
| | 11 meses a 4 °C | <2 | > 97,8 %* |
| Equivalente de 50 ug de QS21 sometido a prueba excepto * equivalente de 90 ug de QS21 sometido a prueba. | | | |

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

Ejemplo 4: Congéneres de MPL.

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.

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).

También se examinó la composición de congénere en dos lotes de coadyuvante ASA (sorbitol) en el día 0 y 7 días después de la preparación y se mantuvo a 37 °C para asegurar que no se producía evolución con el tiempo (véanse las últimas cuatro columnas de la figura 2).

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

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

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

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

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

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

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

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

A. Procedimiento de preparación de liposomas:

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

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

Se añadió tampón de fosfato 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.

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

Etapa 2: Adición de QS21

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

- 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.

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

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

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

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

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

- 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 Etapa 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.

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

Etapa 4: Filtración estéril

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

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

- 45 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

5 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.

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

15 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.

Fermentación

20 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 predilución para inocular el precultivo líquido que consiste en 400 ml de medio precultivo complementado con 50 mg/l de sulfato de kanamicina y 10 g/l de glucosa.

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 | | |
| Glicerol al 87 % (p/p) | 14,54 ml/l | | |
| Solución de metal y sal ⁽¹⁾ : | 9,7 ml/l | | |
| -FeCl ₃ 6H ₂ O | | 3,3 g/l | |
| - MgSO ₄ 7H ₂ O | | 58 g/l | |
| - Solución de microelementos ⁽²⁾ : | | 116 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 |
| Solución de biotina y CaCl ₂ ⁽²⁾ : | 0,97 ml/l | | |
| - Biotina | | 0,05 g/l | |
| - CaCl ₂ 2 H ₂ O | | 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 um | | | |
| (1) | pH ajustado a 1,50 con solución de HCl (37 %); se filtra la solución a través de 0,22 um | | |
| (2) | Se filtra la solución a través de 0,22 um | | |

25

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

ES 2 748 651 T3

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.

Composición de medio de cultivo

| Ingrediente | Concentración | |
|---|---------------|----------|
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,63 g/l | |
| FeCl ₃ 6H ₂ O | 0,056 g/l | |
| - Solución de microelementos ⁽¹⁾ : | 1,91 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 % | 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⁾ : | 0,22 ml/l | |
| - Biotina | | 1 g/l |
| 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 | |

(continuación)

| Ingrediente | Concentración | |
|---|---------------|-------|
| Glutamato de sodio | 5 g/l | |
| Extracto de levadura | 40 g/l | |
| Glicerol 87 % | 590 ml/l | |
| Solución de biotina ⁽²⁾ : - Biotina | 2 ml/l | 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 | | |

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.

10 Aislamiento de cuerpos de inclusión

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

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

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

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

Procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

Para comparar la estabilidad de composiciones inmunogénicas 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

20 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

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

30 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

35 Se añadió un 15,75 % (p/v) de solución de sacarosa (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6,3 %. Después, se añadió un 3 % (p/v) de solución de Tween80 (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0,025 %. Después, se añadió tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 20 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta 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.

40 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

45 Se añadió un 15,75 % (p/v) de solución de sacarosa (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6,3 %. Después, se añadió un 3 % (p/v) de solución de Tween80 (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0,025 %. Después, se añadió tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 12,5 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta 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.

50 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 inmunogénicas:

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

ES 2 748 651 T3

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

Fosfato 10 mM
pH 8,0

(vi) M72 con dos restos de His N terminales – ASA (sorbitol – 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
10 25 ug de 3D-MPL
25 ug de QS21
NaCl 5 mM
4,7 % p/v de sorbitol
15 Fosfato 10 mM
pH 7,5

Análisis de la muestra

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

20 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.

25 **Resultados**

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

30 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 inmunogénicas 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.

35 **Ejemplo 11: Determinación de la conductividad para composiciones inmunogénicas de la invención.**

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

Procedimiento

40 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.

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

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

Resultados

Conductividad de soluciones estándar de cloruro de sodio

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

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

Conductividad de soluciones de prueba

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

5

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.

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

10 Ejemplo 12: Prueba de inmunogenicidad de composiciones inmunogénicas de la invención.

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

Procedimiento

15 Se evaluaron cuatro composiciones inmunogénicas:

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)
3. M72 con dos restos de His N terminales pH 8/ASA (sorbitol – 2)
4. M72 con dos restos de His N terminales pH 7,5/ASA (sorbitol – 2)

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

5 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.

10 **Resultados**

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

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

20 **Ejemplo 13: 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.

25 **Procedimiento**

Se diluyó antígeno a granel purificado (M72 con dos restos de His N terminales, SEQ ID NO: 3) hasta una concentración de 100 ug/ml en dos tampones diferente (tampón succinato 10mM a pH 6,1, tampón Tris 10 mM a pH 8,0) que contenían cantidades especificadas de sales (NaCl 0 mM; 150 mM o 300 mM; CaCl₂ 40 mM, 80 mM o 160 mM; MgSO₄ 87,5 mM, 175 mM o 430 mM).

30 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 10 mM | 6,1 | 1,1 | 6,3 | Transparente |
| B | NaCl 150 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 13,4 | 6,1 | Transparente |
| C | NaCl 300 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 20,0 | 6,1 | Transparente |
| D | CaCl ₂ 40 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 8,0 | 6,1 | Opalescente |
| E | CaCl ₂ 80 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 11,2 | 5,8 | Opalescente + partículas grandes |
| F | CaCl ₂ 160 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 20,2 | 5,8 | Opalescente + partículas grandes |
| G | MgSO ₄ 87,5 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 7,7 | 6,1 | Opalescente |

(continuación)

| Grupo | Sal | Tampón | pH (teórico) | Conductividad (mS / cm) | pH (medido) | Observación Visual |
|-------|------------------------------|--------------------|--------------|-------------------------|-------------|--------------------------------------|
| H | MgSO ₄ 175 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 12,4 | 5,9 | Opalescente + partículas muy grandes |
| I | MgSO ₄ 430 mM | Succinato 10 mM | 6,1 | 20,4 | 5,9 | Opalescente + partículas muy grandes |
| J | 0 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 0,463 | 8,0 | Transparente |
| K | NaCl 150 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 12,13 | 8,0 | Transparente |
| L | NaCl 300 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 21,1 | 8,0 | Transparente |
| M | CaCl ₂ 40 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 6,7 | 8,1 | Partículas grandes |
| N | CaCl ₂ 80 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 10,8 | 8,0 | Opalescente + partículas grandes |
| O | CaCl ₂ 160 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 19,7 | 8,0 | Opalescente + partículas grandes |
| P | MgSO ₄ 87,5 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 7,5 | 8,0 | Partículas grandes |
| Q | MgSO ₄ 175 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 10,9 | 8,2 | Opalescente + partículas muy grandes |
| R | MgSO ₄ 430 mM | Tris 10 mM | 8,0 | 21,7 | 8,1 | Opalescente + partículas muy grandes |

5 Los resultados demuestran que las soluciones que contienen un antígeno relacionado con M72 pueden ser sensibles a otras sales aparte de cloruro del sodio. El impacto del CaCl₂ o el MgSO₄ parece ser mucho más pronunciado que para el cloruro sódico a concentraciones o conductividad comparables.

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

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

10 **Procedimiento**

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

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

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

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

20 **Resultados**

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

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

25

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

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

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

Procedimiento

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

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

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

- 15 10 ug de antígeno (20 ug/ml)
5 % p/v de sacarosa
Tris 40 mM
0,02 % p/v de Tween80
20 500 ug de DOPC
125 ug de colesterol
25 ug de 3D-MPL
25 ug de QS21
NaCl 150 mM
Fosfato 10 mM
25 pH 8,5

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

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

40 Las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente reconstituidas se caracterizaron después de almacenamiento a 30 °C (T24h) y se compararon con una muestra preparada extemporáneamente (T0).

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

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

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

15 En resumen, los Ejemplos 9, 10 y 15 demuestran por primera vez que el impacto perjudicial resultante del pH y la concentración de NaCl sobre la estabilidad de composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno relacionado con M72. Ejemplo 13 extiende este trabajo para demostrar que otras sales también pueden tener un impacto perjudicial sobre la estabilidad de composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno relacionado con M72, demostrando el Ejemplo 14 que el efecto es también aplicable a secuencias relacionadas con M72.

La reformulación de las composiciones inmunogénicas 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 inmunogénica y su sustitución con sorbitol como un agente de tonicidad no tiene un impacto perjudicial sobre la estimulación de respuestas de linfocitos T.

20 La estabilidad de composiciones inmunogénicas 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 inmunogénicas, los presentes inventores han sido capaces de reducir la extensión de los cambios observados cuando se almacenan las composiciones inmunogénicas.

25 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra 'comprenden' y variaciones tales como 'comprende' y 'que comprende(n)', implican la inclusión de un elemento integrante, etapa, grupo de elementos integrantes o grupo de etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante, etapa, grupo de elementos integrantes o etapas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals sa Godart, Stephane Laanan, Amina Lemoine, Dominique
- 30 <120> Composiciones novedosas
- <130>VB64442
- <150> US61/422723
- <151> 14-12-2010
- <160> 13
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 723
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Proteína de fusión M72
- <400> 1

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 748 651 T3

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400

ES 2 748 651 T3

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415

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

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

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

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

Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly

ES 2 748 651 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | 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> 2
 <211> 2172
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante para la fusión de M72

<400> 2

```

atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tccaggggtg ggcagggatt cgccattcog      60
atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtggggggtc acccaccggt      120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgttctcg acaacaacgg caacggcgca      180
cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgctccg gcggaagtc tcggcatctc caccggcgac      240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcggcca ccgcatggc ggacgcgctt      300
aacgggcatac atcccggtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg      360
cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga ccccgggccg aattcatggt ggatttcggg      420
gogttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccggttc ggctcgcctg      480
gtggccgcgg ctcagatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg      540
tttcagtcgg tggctcgggg tctgacggtg gggctcgtga taggttcgtc ggcgggtctg      600
atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag      660
ctgaccgccg cccaggtccg ggttgctcgc gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg      720
gtgccccgcg cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac      780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg      840
gcccagacg ccgcgcgat gtttgctac gcccgggcga cggcgacggc gacggcgacg      900
ttgctgccgt tcgaggagcc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc      960
    
```

ES 2 748 651 T3

gcccgcggctc aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020
 caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
 ggctgtgga agacggtctc gccgatcggc tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140
 aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200
 ttgaagggtt ttgctccggc ggcgccggcc caggccgtgc aaaccggggc gcaaacggg 1260
 gtcggggcga tgagctcgtt gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320
 gccgccaact tgggtcgggc ggectcggtc ggttcggtgt cggtgccgca ggectgggcc 1380
 gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgtgaccag cctgaccagc 1440
 gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggccgggtgc cggtggggca gatgggcgcc 1500
 agggccgggtg gtgggtcag tgggtgtgctg cgtgttcgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560
 cattctccgg cagccgggga tctgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcggccac 1620
 ttccccgcgc tgcccctcga 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 cgggtcgtgca gctgcgcggt gccgggtggc tgccgtcggc ggcgatcggg 1920
 ggccggcgtc cggttggtga gcccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcggg 1980
 acgccccgtg cgggtcctgg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
 tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
 cccgggtgat cgggcggggc cgtcgtcaac ggectaggac agtggtcgg tatgaacacg 2160
 gccgcgtcct ag 2172

- <210> 3
- <211> 725
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fusión de M72 con 2 restos de his adicionales
- <400> 3

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly
 1 5 10 15
 Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln
 20 25 30
 Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala

ES 2 748 651 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 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 | | | |

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Ala Ala Ser
 725

<210> 4

<211> 2178

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 4

atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60

attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120

accgttcata tcgggectac cgccttctctc ggcttggggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180

10

ES 2 748 651 T3

ggcgacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240
 ggcgacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300
 gcgottaacg ggcatcatcc cggtgacgtc atctcgggtga cctggcaaac caagtccggc 360
 ggcacgcgta cagggaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
 ttccggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc ggggtccggc 480
 tcgctggtgg ccgcggctca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttccggccgcg 540
 tcggcgtttc agtcggtggt ctggggtctg acgggtgggt cgtggatagg ttccgtccgcg 600
 ggtctgatgg tggcggcggc ctcccgctat gtggcgtgga tgagcgtcac ccgggggcag 660
 gccgagctga ccgccgcca ggtccgggtt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg 720
 ctgacggtgc ccccgcggt gatcccgag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780
 accaacctct tggggcaaaa cccccggcg atcgcggtca acgaggccga atacggcgag 840
 atgtgggccc aagacgcgc cgcgatggtt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg 900
 gcgacgttc tgcggttcga ggaggcggc gagatgacca gcgcgggtgg gctcctcgag 960
 caggccgccg cggtcgagga ggcctccgac accgccgcgg cgaaccagtt gatgaacaat 1020
 gtgcccagg cgctgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080
 ctgggtggcc tgtggaagac ggtctgcgg catcgggtgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140
 atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgacca caccttgagc 1200
 togatgttga agggcttgc tccggcggcg gccgccagg ccgtgcaaac ccgggcgcaa 1260
 aacggggtcc gggcgatgag ctccgtgggc agctccgtgg gttcttcggg tctgggcggt 1320
 ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttgtcggg gccgcaggcc 1380
 tgggccgcgg ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgtgcgcgt gaccagcctg 1440
 accagcgccg cggaaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg 1500
 ggccagggg ccggtggtgg gctcagtggg gtgctgcgtg ttccgccgcg accctatgtg 1560
 atgcgcatt ctccggcagc cggcgatata gccccgcgg ccttgtcgca ggaccggttc 1620
 gcgacttcc ccgcctgcc cctcgaccog tccgcgatgg tcgccaagt ggggccacag 1680
 gtggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacgccg tggcgccgg gaccggcatc 1740
 gtcacgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccag tgatcgggg gccaccgac 1800
 atcaatgcgt tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac 1860
 cgcaccagg atgtccggt gctgcagctg ccgggtgccg gtggcctgcc gtcggcggcg 1920
 atcgggtggc gcgtccggt tggtgagccc gtcgtccgga tgggcaacag ccggtgggcag 1980
 ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggtcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040

ES 2 748 651 T3

tcggattcgc tgaccgggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccgcg 2100
 atccagcccc gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg 2160
 aacacggccg cgtcctag 2178

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

<220>
 <223> Fusión de Mtb72f

<400> 5

5

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415

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

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala

ES 2 748 651 T3

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

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

Ala Ala Ser

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

<220>
 <223> Secuencia codificante para la fusión de Mtb72f

<400> 6

atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccagggtg ggcagggatt cgccattccg 60
 atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtggggggtc acccaccggt 120
 catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgtgtcgc acaacaacgg caacggcgca 180
 cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgcctcg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240
 gtgatcaccg cggctogacgg cgctccgata aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300
 aacgggcatc atcccgggtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360
 cgtacagggg acgtgacatt ggccgagggg cccccggccg aattcatggt ggatttcggg 420
 gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtaccgag gcccggttc ggcctcgcctg 480
 gtggccgagg ctcagatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgctcggc 540
 tttcagtcgg tggctctgggg tctgacggtg gggtcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600
 atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag 660
 ctgaccgccc cccaggtccg ggttgcctcg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720
 gtgccccgc cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
 ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
 gcccaagacg ccgcgcgat gtttggctac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
 ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcggcg gtgggctcct cgagcaggcc 960
 gccgcggctg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020
 caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
 ggctctgga agacggctct gccgcacggt tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140
 aacaaccaca tgtcagtgac caactcgggt gtgtcagatg ccaacacctt gagctcagtg 1200
 ttgaagggct ttgctccggc ggcggccgccc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaacggg 1260

ES 2 748 651 T3

gtccgggoga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320
gcccgaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcggtgt cggtgccgca ggcctgggccc 1380
goggccaacc aggcagtcac cccggogggcg ogggcgctgc cgctgaccag octgaccagc 1440
gcccgggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cgggtggggca gatggggccc 1500
agggccgggtg gtgggctcag tgggtgctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560
cattctccgg cagccgggca tatcgcctcg cggccttgt cgcaggaccg gttcggccgac 1620
ttccccggc tgcctcga cccgtccgag atggctgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680
aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gcogtggggc cggggaccgg catcgtcatc 1740
gatccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800
gcgttcagcg toggctccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860
caggatgctg cgggtgctgca gctgcgcggt gccgggtggcc tgccgtcggc ggcgatcggc 1920
ggcggcgtcg cggttgggtga gcccgctcgc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980
acgccccgtg cgggtgcctgg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
cccggtgatt ogggcgggccc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtgggtcgg tatgaacagc 2160
gccgcgtcct ag 2172

<210> 7
<211> 729
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fusión de Mtb72f con 6 restos de his adicionales
10 <400> 7

Met His His His His His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu
1 5 10 15
Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala
20 25 30
Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile
35 40 45
Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn
50 55 60
Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu
65 70 75 80

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 748 651 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser
 725

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

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

<400> 8

atgcatcacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg 60
 cagggatcgc ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt 120
 ggggggtcac ccaccgttca tategggcct accgccttcc tcggttggg tgttgtcgac 180
 aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc 240
 ggcatctoca ccggcgacgt gatcaccgcy gtogacggcg ctccgatcaa ctcgccacc 300
 gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat ccgggtgacg tcatctcggg gacctggcaa 360
 accaagtcgg gcggcacgcy tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa 420
 ttcatggtgg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgcgaggat gtacgccggc 480

ES 2 748 651 T3

ccgggttcgg cctcgcctggt ggccgcggct cagatgtggg acagcgtggc gagtgacctg 540
 ttttcggccg cgtcggcgtt tcagtcgggtg gtctggggtc tgacgggtggg gtcgtggata 600
 ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgcctg atgtggcgtg gatgagcgtc 660
 accgcggggc aggccgagct gaccgcgcgc caggtccggg ttgctgoggc ggcctacgag 720
 acggcgtatg ggctgacggt gccccgcgcg gtgatcgccg agaaccgtgc tgaactgatg 780
 attctgatag cgaccaacct cttggggcaa aacaccccg cgtcgcggt caacgaggcc 840
 gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcggcgacg 900
 gcgacggcga cggcgacggt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcgggt 960
 gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctccg acaccgccgc ggcgaaccag 1020
 ttgatgaaca atgtgcccc aagcgtgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080
 ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcctcggtc gccgatcagc 1140
 aacatggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200
 aacacctga gctcgtggtt gaagggttt gctccggcgg cggccgccca ggcctgcaa 1260
 accgcggcgc aaaacggggt ccgggcgatg agctcgtcgg gcagctcgtt gggttcttcg 1320
 ggtctgggcg gtggggtggc cgccaacttg ggtcggggcg cctcgggtcg ttcgttgtcg 1380
 gtgccgcagg cctgggccgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcggcgcg ggcgctgccg 1440
 ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggccccggc agatgctggg cgggctgccg 1500
 gtggggcaga tgggcgccag ggccgggtggt gggctcagtg gtgtgctcgc tgttccgccg 1560
 cgaccctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggccttgtcg 1620
 caggaccggt tcgccgactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtcccgcat ggtcgcccaa 1680
 gtggggccac aggtggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc 1740
 gggaccggca tcgtcatcga tcccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800
 ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgtatgtg 1860
 gtcgggtatg accgcacca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgcgcggtgc cggtggcctg 1920
 ccgtcggcgg cgatcgggtg cggcgtcgcg gttgggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980
 agcgggtggc agggcggaac gccccgtcgc gtgcctggca ggggtggtcgc gctcggccaa 2040
 accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100
 ttcgatgccg cgatccagcc cgggtgattcg ggcggggccc tcgtcaacgg cctaggacag 2160
 gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

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

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

 <400> 9
 tccatgacgt tcctgacgt 20
 5 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CpG Oligo 2 - CpG 1758
 10 <400> 10
 tctcccagcg tgcgcat 18

 <210> 11
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CpG Oligo 3
 20 <400> 11
 accgatgacg tcgccgtga cgcaccacg 30

 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CpG Oligo 4 - CpG 2006

 <400> 12
 tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt 24
 30 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CpG Oligo 5 - CpG 1686
 35 <400> 13
 tccatgacgt tcctgatgct 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, el pH de dicha composición está en el intervalo de 7,5 a 8,5 y la concentración de cloruro de sodio es de 50 mM o menor.
2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 40 mM o menor.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un agente de tonicidad no iónico.
- 10 4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el agente de tonicidad no iónico es un poliol.
5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el poliol es sorbitol y en la que la concentración de sorbitol está entre aproximadamente el 4 y aproximadamente el 6 % (p/v).
- 15 6. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición inmunogénica comprende un agonista de TLR-4 que es un lipopolisacárido.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el lipopolisacárido es monofosforil lípido A 3-des-O-acilado y la composición inmunogénica también comprende QS21.
- 20 8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición se proporciona como una dosis unitaria de entre 50 µl y 1 ml y la dosis unitaria contiene de 5 a 50 µg de antígeno relacionado con M72.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la dosis unitaria es una dosis humana y contiene entre 1 y 100 µg de 3D-MPL y entre 1 y 100 µg de QS21.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
- 25 11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
- 30 13. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en medicina.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en la profilaxis, el tratamiento o la mejora de una infección por micobacterias.
15. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, para la administración a un ser humano.

35

Figura 1

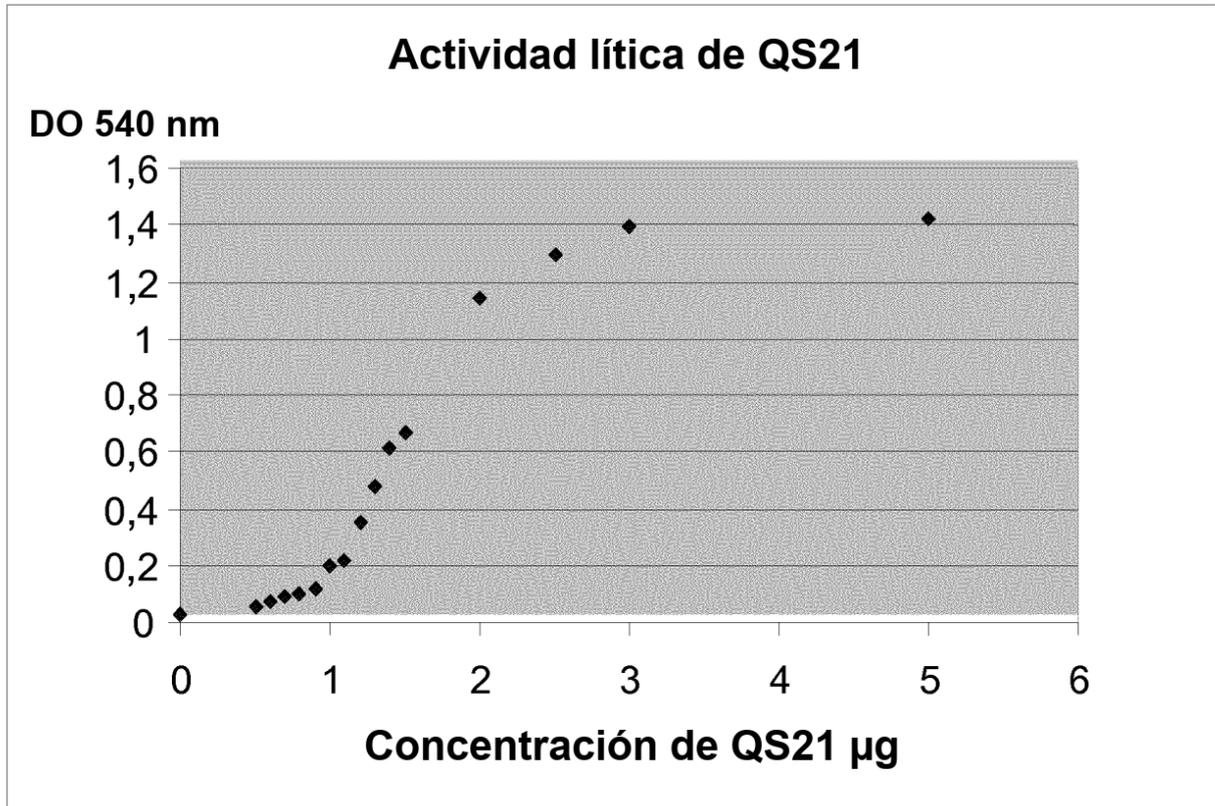


Figura 2

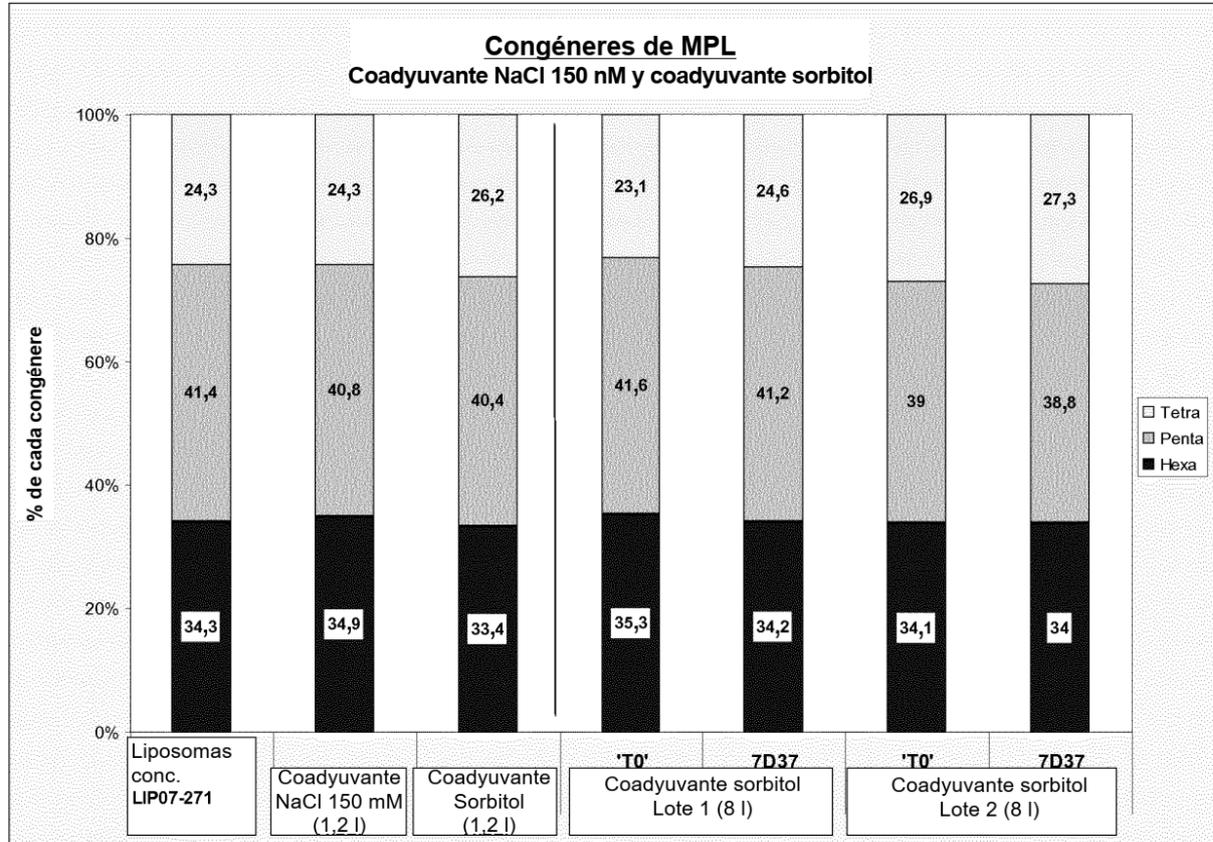


Figura 3

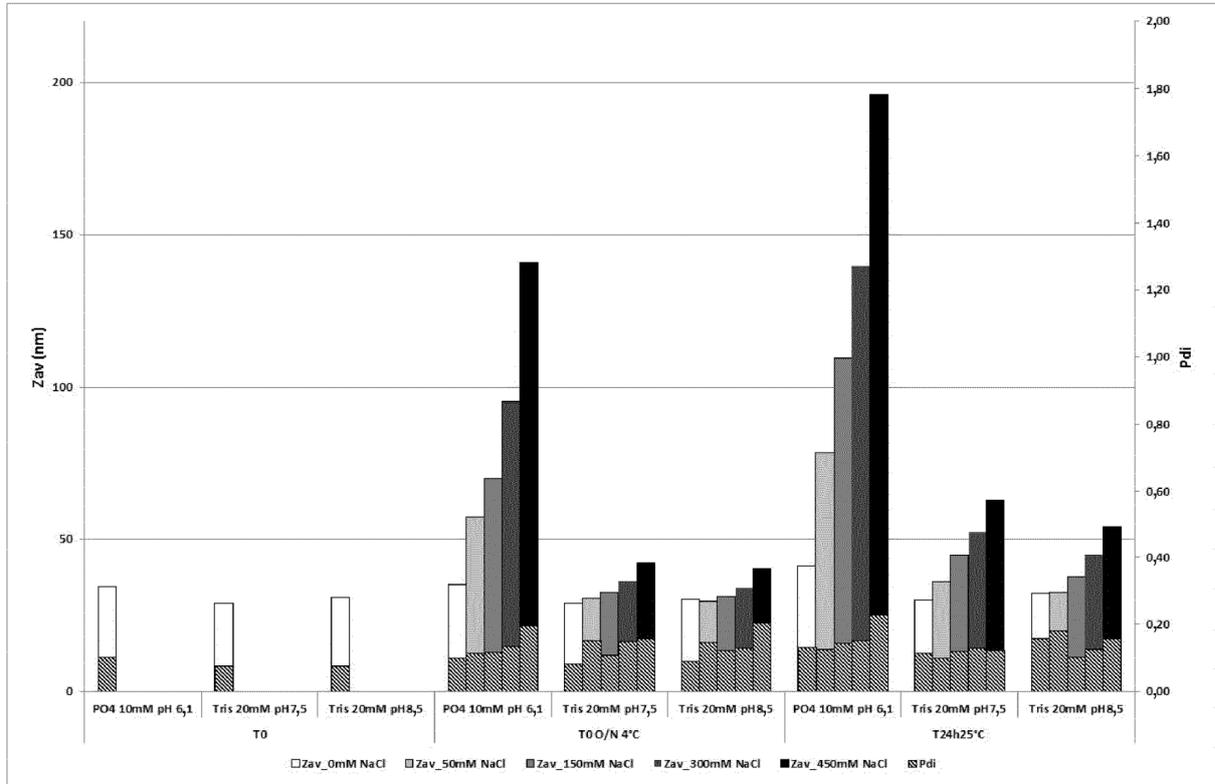


Figura 4

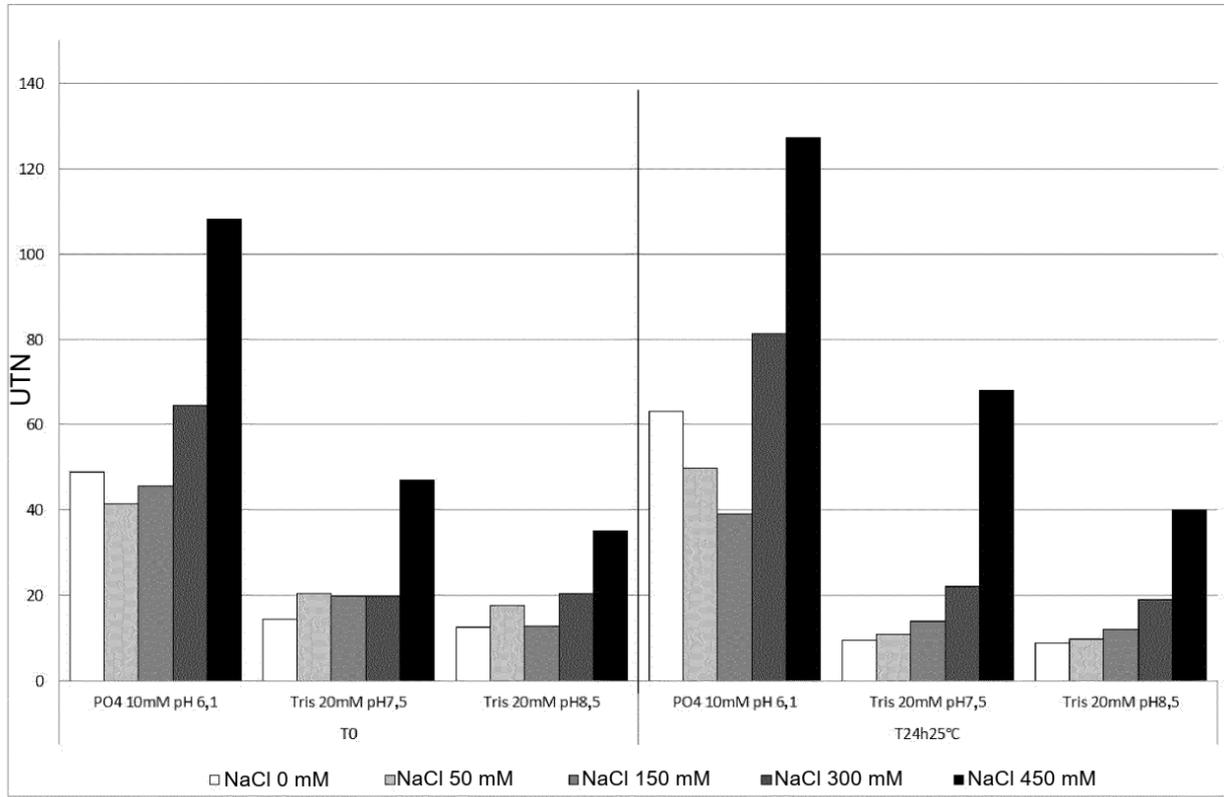


Figura 5

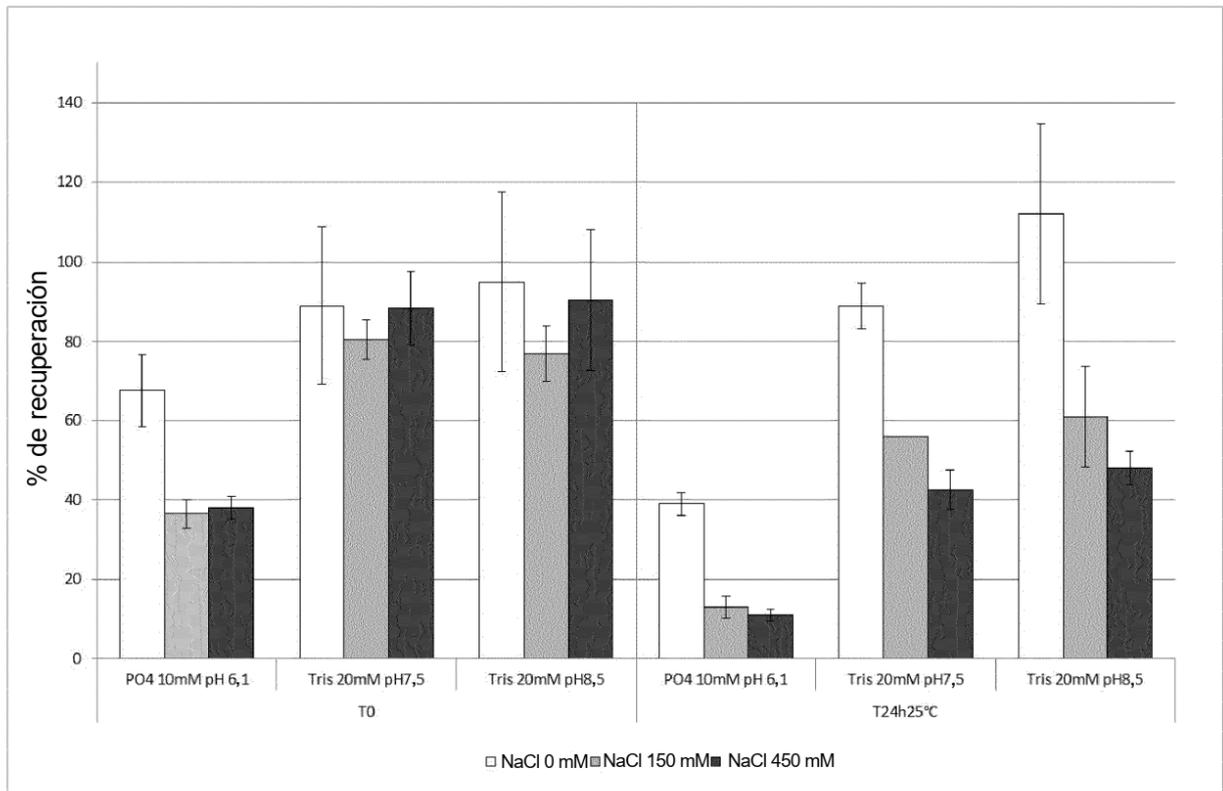


Figura 6a

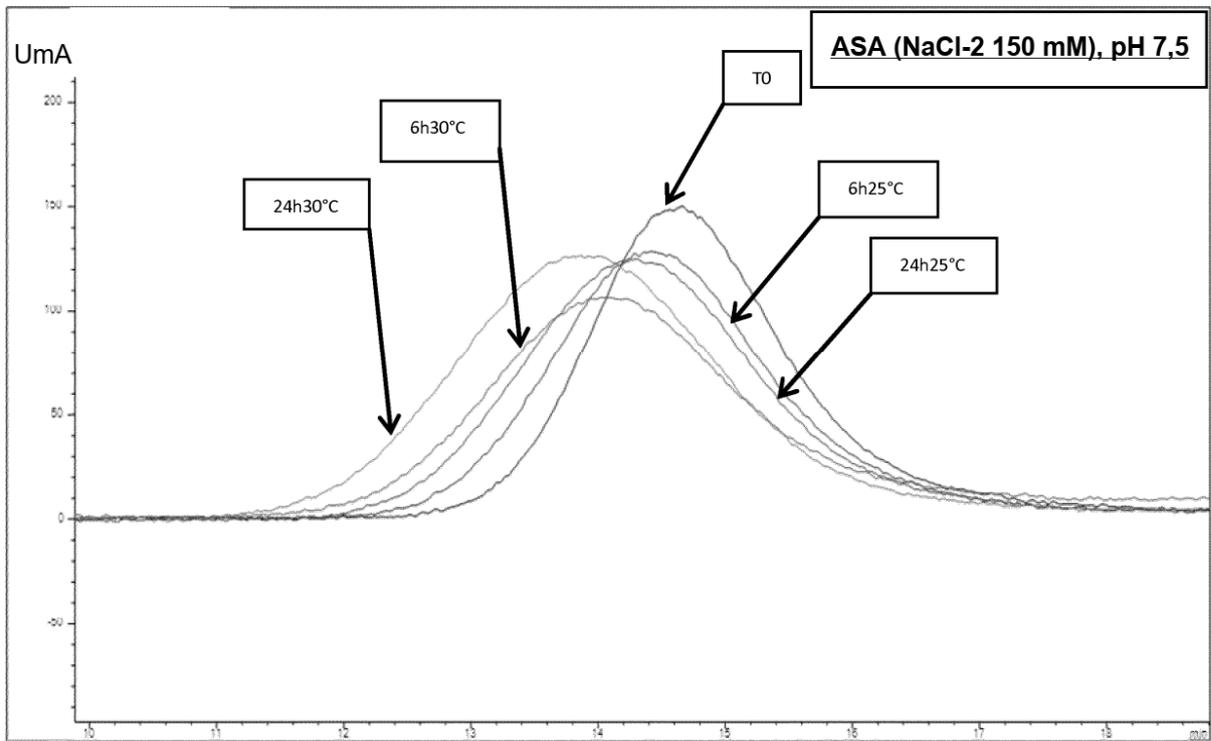


Figura 6b

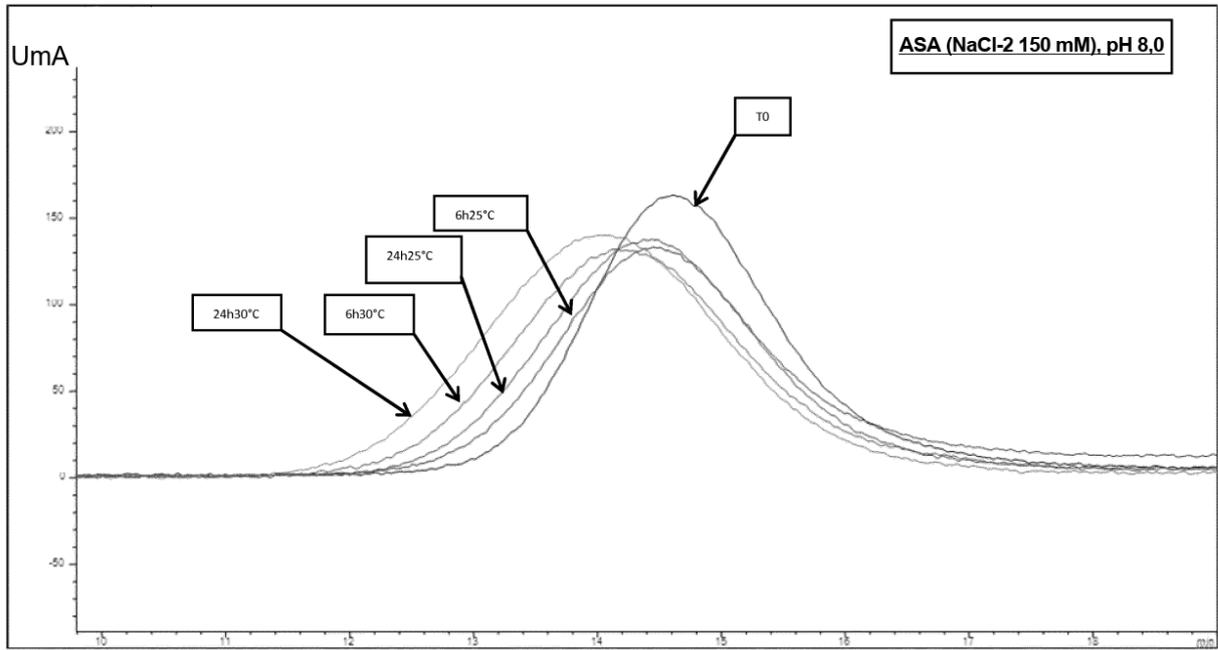


Figura 6c

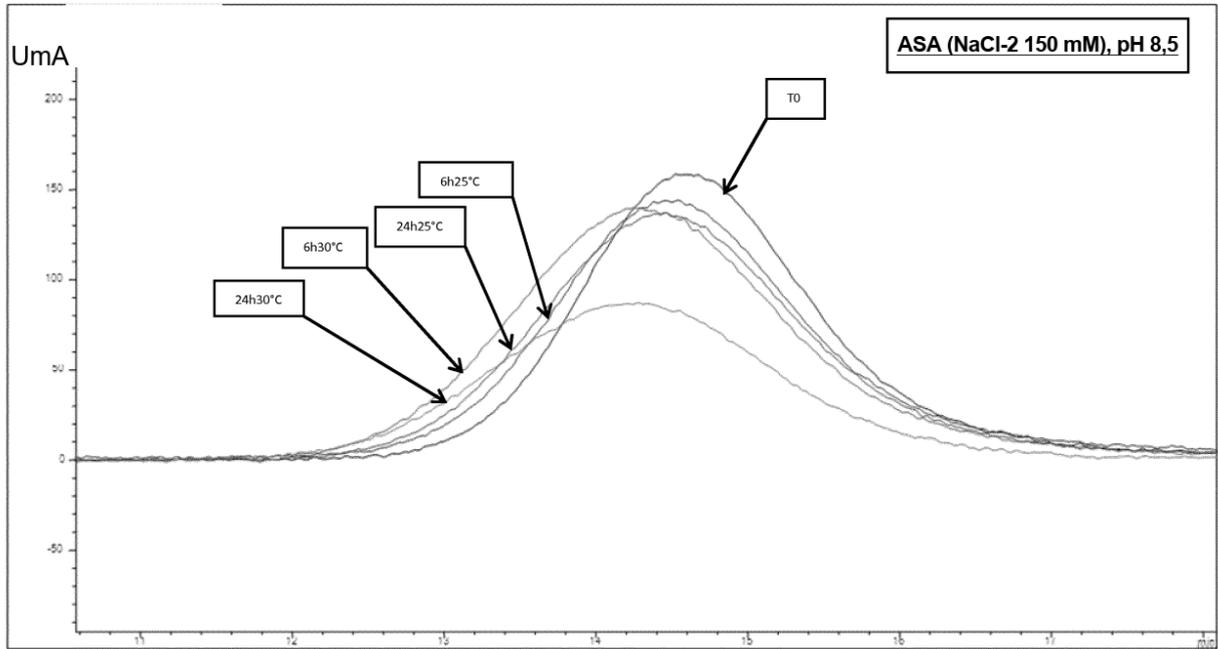


Figura 6d

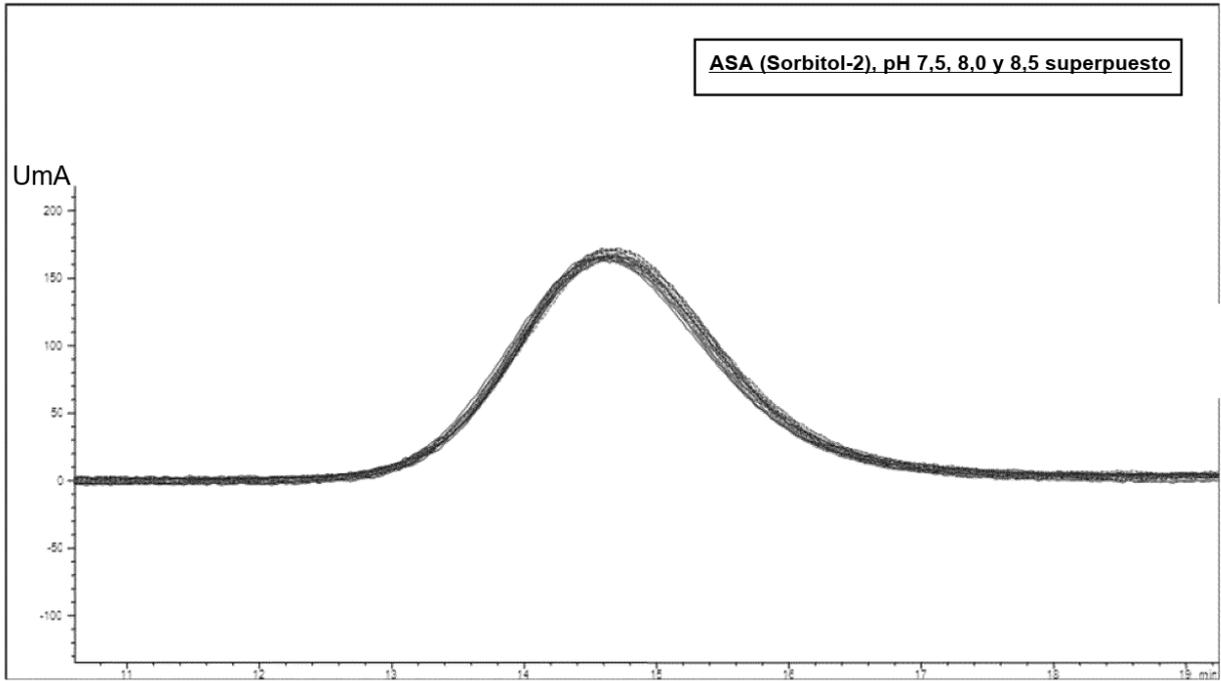


Figura 7

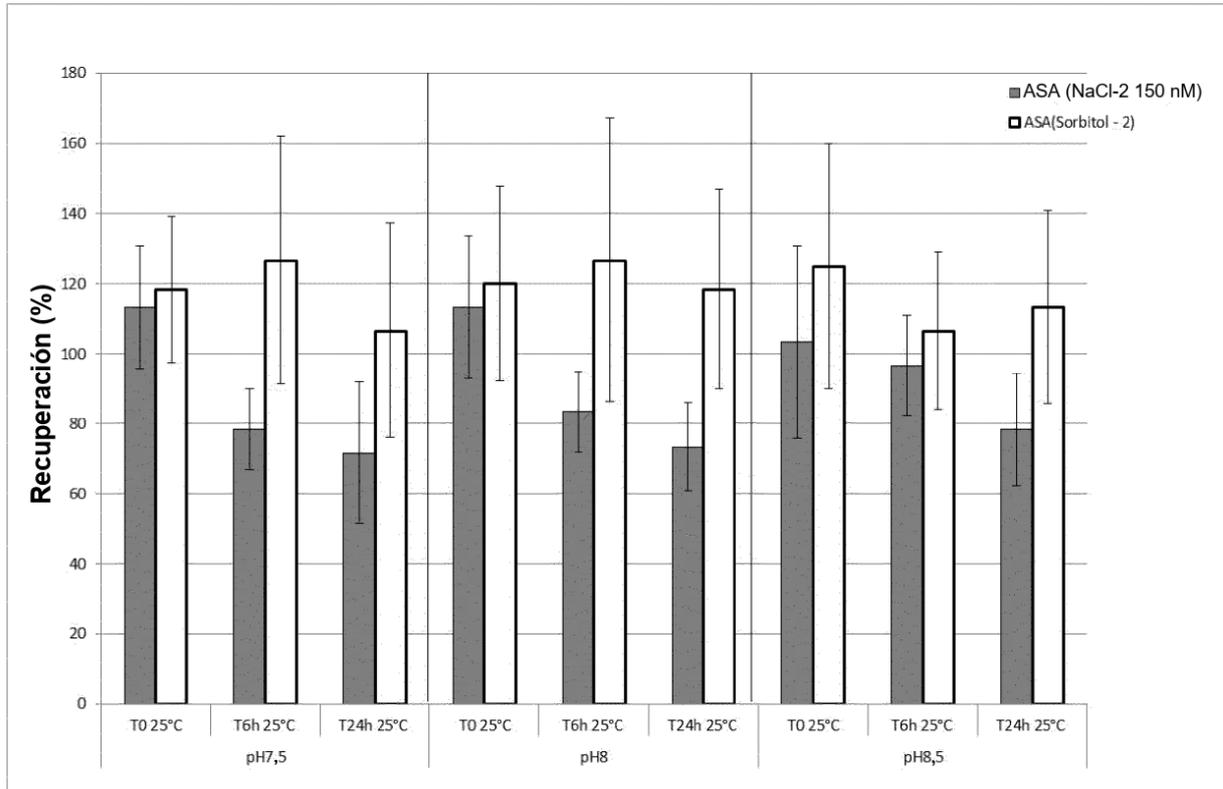


Figura 8

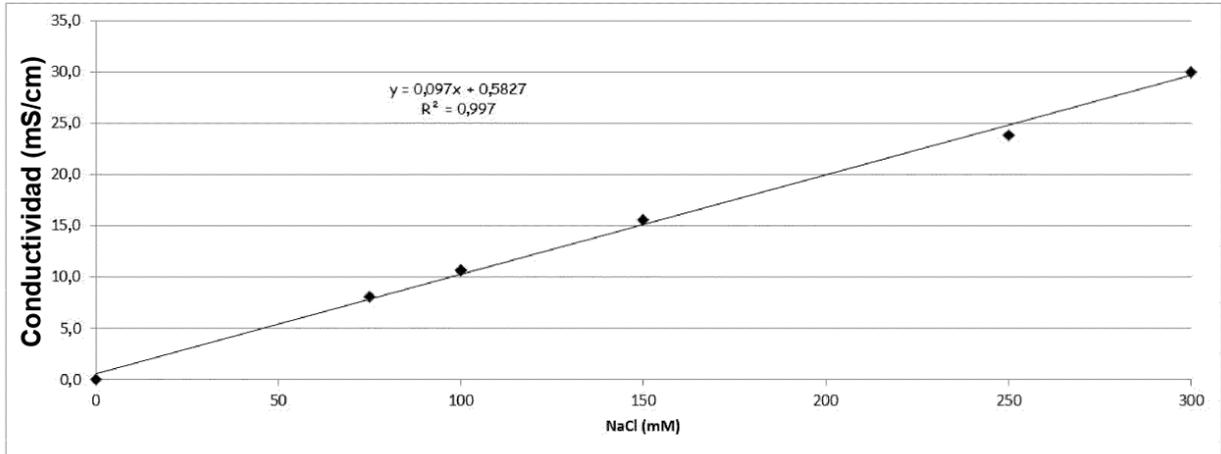


Figura 9

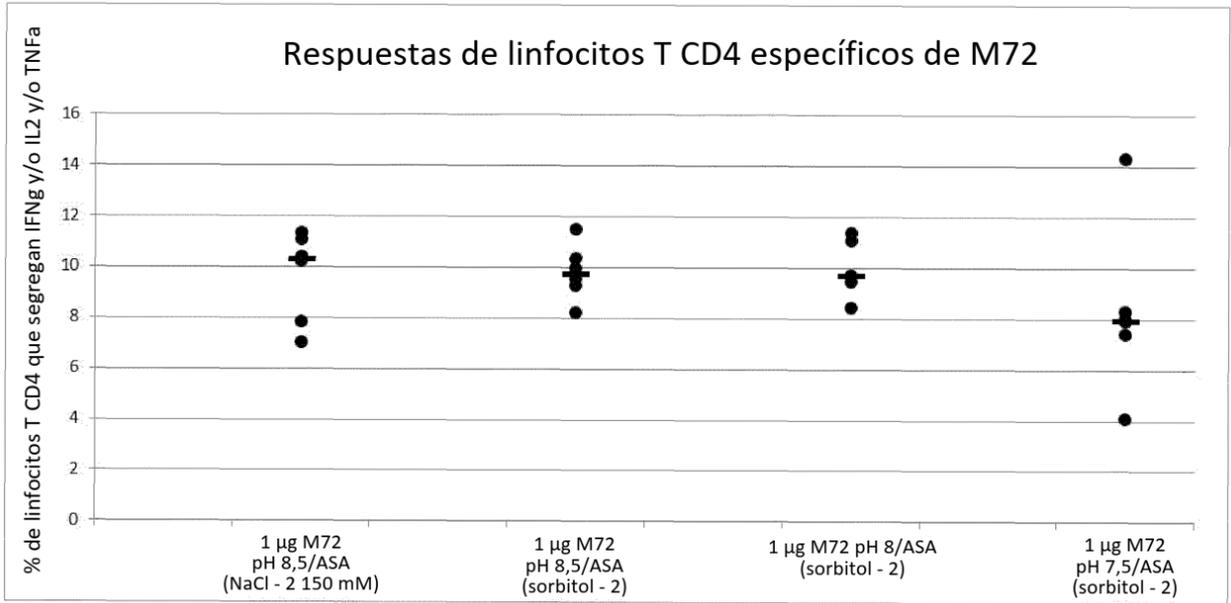


Figura 10

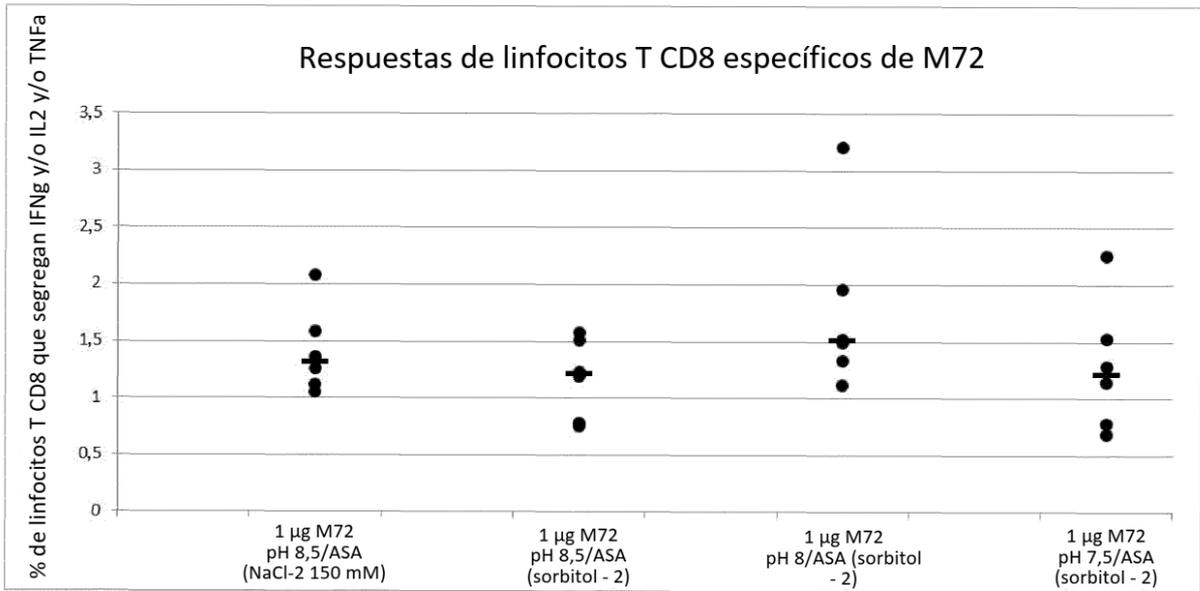


Figura 11

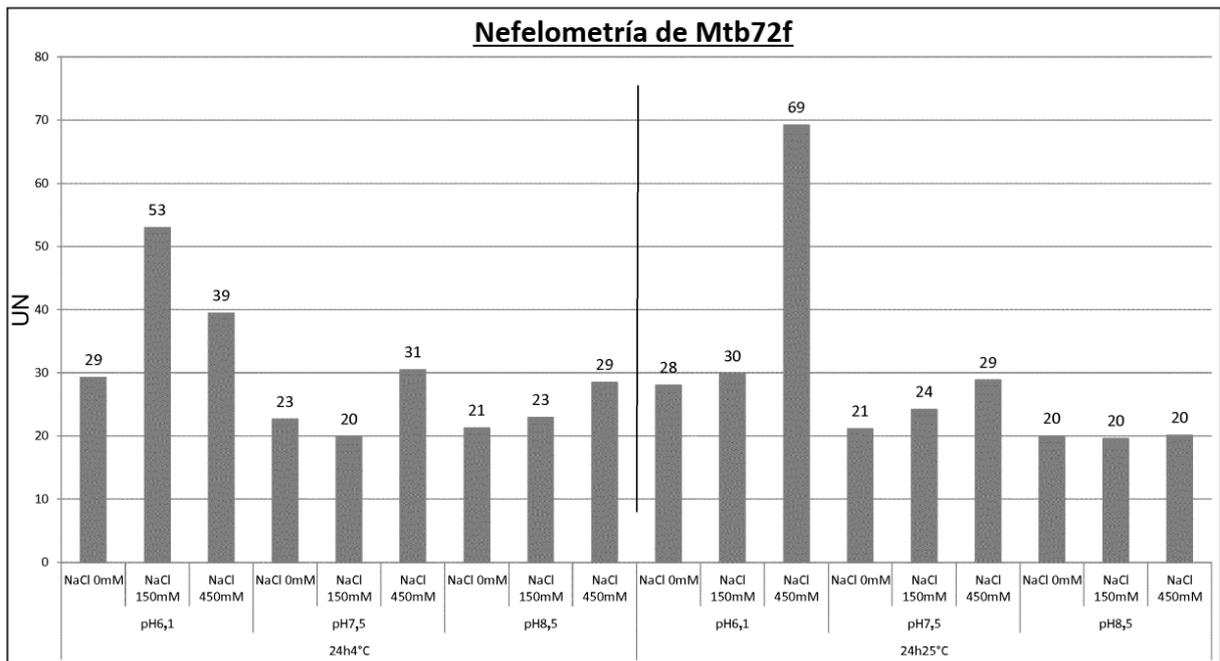


Figura 12

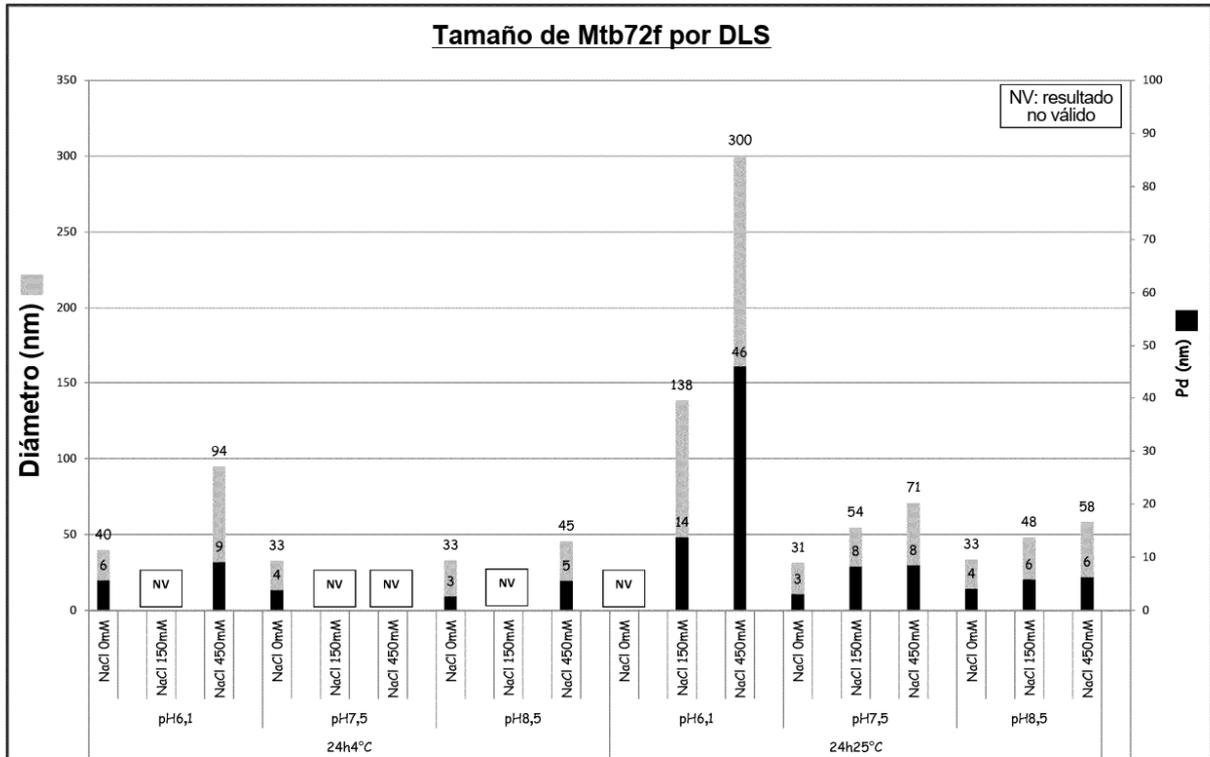


Figura 13

