

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-146307-00000-0000

Fecha: 2013-06-19 16:20:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 34

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/04**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO **RIXENSART, BÉLGICA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 19 JUN 2013

(FORMA P 10)

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-146307- -00000-0000 Fecha: 2013-06-19 16:20:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 24
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/072816	Fecha 14/12/11
Publicación Internacional No.		WO 2012/080369 A1	Fecha 21/06/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/04			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4.	GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Rixensart	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Bélgica
PAÍS DE RESIDENCIA		Bélgica	
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. GODART 2. LAANAN 3. LEMOINE		Stephane Andre Georges Amina Dominique Ingrid	Bélgica
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Bélgica		Rixensart	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgica.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P.53.215
DIRECCIÓN	Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Bogotá	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

Sbm

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/422,723	10/12/14
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0048223	Fecha 20-05-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 96		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 47		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 16		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

●

VER ANEXO CD

●

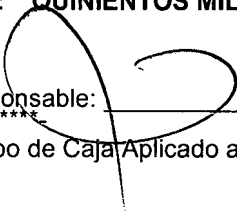
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0048223
		Bogotá D.C., Mayo 20 de 2013 - 13:32:24

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.					NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	534292765	20/05/2013	6.456.000.00	

*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00	\$500.000.00
			=====		

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-146307- -00000-0000
Fecha: 2013-06-19 16:20:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3/4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-146307-00000-0000

Fecha: 2013-06-19 16:20:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

PI02-F08 (2009-11-18)

COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA
RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proporcionan composiciones inmunogénicas que
5 comprenden un antígeno relacionado con M72, en donde la
conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor, o la
concentración de sales de la composición es de 130 mM o menor, y
su uso en medicina.

10 **SECTOR:** Industria farmacéutica, en particular preparaciones
medicinales que comprenden antígenos bacterianos, específicamente
antígenos de *Mycobacterium*, métodos de obtener dichas
composiciones y kits que las incluyen.

15

20

25

COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA

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. La presente invención también se refiere a composiciones inmunogénicas como las mencionadas que comprenden además uno o más inmunoestimulantes. También se
10 proporcionan métodos para la preparación de composiciones inmunogénicas como las mencionadas y kits relacionados.

Antecedentes de la invención

 La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica provocada por infección con *Mycobacterium tuberculosis* y otras
15 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
20 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
25 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 (Organización Mundial de la Salud))

Tuberculosis Facts 2010).

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.

La formulación de antígenos de proteína es extremadamente importante para asegurar que se mantenga 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, éste es el caso cuando se pretende que los antígenos o las preparaciones antigénicas liofilizadas se reconstituyan con una preparación coadyuvante. En una circunstancia de este tipo, es importante que el regulador del pH de la preparación coadyuvante sea adecuado para el antígeno y que la inmunogenicidad o solubilidad del antígeno no se vea afectada por el coadyuvante.

Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han identificado por primera vez que

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

En consecuencia, La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado
15 con M72, en la que la conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor.

Se proporciona además una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en el que la concentración de sales en dicha composición es de 130 mM o menor.

20 La presente invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de cloruro de sodio en dicha composición es de 130 mM o menor.

Breve descripción de los dibujos

25 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.

5 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
10 del almacenamiento.

Figuras 6a-6d. Análisis de SEC-HPLC de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento.

Figura 7. Antigenicidad de composiciones inmunogénicas con
15 pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento.

Figura 8. Conductividad de soluciones estándar de NaCl.

Figura 9. Inducción de respuestas de células T CD4 en ratones usando las composiciones inmunogénicas de la invención.

20 Figura 10. Inducción de respuestas de células T CD8 en ratones usando las composiciones inmunogénicas de la invención.

Figura 11. Nefelometría de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento.

25 Figura 12. DLS de composiciones inmunogénicas con pH y

concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento.

Figura 13. Antigenicidad de composiciones inmunogénicas con pH y concentraciones de NaCl variadas después del almacenamiento.

5 Breve descripción de identificadores de secuencias

	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.
10	SEQ ID NO: 3	Secuencia de aminoácidos para la proteína de M72 con dos residuos His N-terminales.
	SEQ ID NO: 4	Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de M72 con dos residuos His N-terminales.
	SEQ ID NO: 5	Secuencia de aminoácidos para la proteína de Mtb72f.
15	SEQ ID NO: 6	Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de Mtb72f.
	SEQ ID NO: 7	Secuencia de aminoácidos para la proteína de Mtb72f con seis residuos His N-terminales.
20	SEQ ID NO: 8	Secuencia de nucleótidos que codifican la proteína de Mtb72f con seis residuos 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).
25	SEQ ID NO: 11	Secuencia de nucleótidos para CpG Oligo 3.

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).

5 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona 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 invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en la que la conductividad de la composición es de 12 mS/cm o menor, por ejemplo de 10 mS/cm o menor, 8 mS/cm o menor, 6 mS/cm o menor, 4 mS/cm o menor, o de 3 mS/cm o menor. En una modalidad particular, la conductividad de la composición inmunogénica es de 2.5 mS/cm o menor, tal como de 2.25 mS/cm o menor, o de 2.0 mS/cm o menor. En otra modalidad específica, la conductividad de la composición inmunogénica es de 1.5 a 2.5 mS/cm.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona 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 invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de las sales en dicha composición es de 100 mM o menor, por ejemplo de

90 mM o menor, de 80 mM o menor, de 70 mM o menor, de 60 mM o menor, de 50 mM o menor, o de 40 mM o menor. En una modalidad particular, la concentración de sales en dicha composición es de 35 mM o menor, tal como de 30 mM o menor, o de 25 mM o menor. En
5 otra modalidad específica, la concentración de sales en dicha composición es de 20 a 40 mM, tal como de 25 a 35 mM.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de cloruro de sodio es de 130
10 mM o menor. En particular, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en la que la concentración de cloruro de sodio es de 100 mM o menor, por ejemplo de 90 mM o menor, de 80 mM o menor, de 70 mM o menor, de 60 mM o menor, de 50 mM o menor,
15 de 40 mM o menor, de 30 mM o menor, de 20 mM o menor, o de 15 mM o menor. En una modalidad particular, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica es de 10 mM o menor, tal como de 7.5 mM o menor. De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica
20 es de, o es inferior a, 5 mM. En otra modalidad 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 de 3 mM o menos, de 2 mM o menos o de 1 mM o menos).

25 De una manera adecuada, la concentración de CaCl_2 en las

composiciones inmunogénicas será de 40 mM o menor, de 30 mM o menor, de 20 mM o menor, de 15 mM o menor, o de 10 mM o menor.

De una manera adecuada, la concentración de MgSO_4 en las composiciones inmunogénicas será de 80 mM o menor, de 60 mM o menor, de 40 mM o menor, de 30 mM o menor, de 20 mM o menor, o de 10 mM o menor.

De una manera adecuada, la concentración total de iones de NH_4^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} en las composiciones inmunogénicas será de 80 mM o menor, de 60 mM o menor, de 40 mM o menor, de 30 mM o menor, de 20 mM o menor, o de 10 mM o menor.

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 este campo, por ejemplo usando un medidor de conductividad dedicado u otro instrumento con la capacidad para medir la conductividad. Un instrumento adecuado es el Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments (Reino Unido).

El experto puede someter a prueba fácilmente la concentración de ambos iones de sodio (Na^+) 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.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa 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 (Organización Mundial de la Salud) *Tuberculosis Facts* 2010).

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

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 la *Mycobacterium tuberculosis* viva en un estado de letargo, privada de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, se ha sugerido recientemente que

5 la mayoría de las bacterias en el estado de letargo están localizadas en tipos de células que no son macrófagos, repartidas por todo el cuerpo (Locht *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11):1665-1677). El desarrollo de la TB activa se produce cuando el equilibrio entre la

10 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).

También se ha propuesto una hipótesis dinámica que describe el equilibrio entre la TB latente y la TB activa (Cardana P-J

15 *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,

20 dando como resultado fatiga, pérdida de peso, fiebre y una tos persistente. Si no se trata, normalmente resultan complicaciones graves y muerte.

En general, la tuberculosis se puede controlar usando tratamiento antibiótico prolongado, aunque este tratamiento no es

25 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 monitorear. Algunos pacientes no completan el
5 curso del tratamiento, lo que conduce a un tratamiento ineficaz y al desarrollo de resistencia al fármaco.

La TB resistente a múltiples fármacos (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
10 de MDR-TB cada año. La TB extensamente resistente a fármacos (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 (World Health Organisation (Organización
15 Mundial de la Salud) *Tuberculosis Facts* 2010).

Incluso aunque se complete un curso total de tratamiento con 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
20 de la tuberculosis, un programa de vacunación efectivo y un diagnóstico temprano preciso de la enfermedad son de suma importancia.

Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el método usado más ampliamente para inducir inmunidad protectora. La
25 *Mycobacterium* empleada más comúnmente para este propósito es

Bacillus Calmette-Guerin (BCG), una cepa no virulenta de *M. bovis* que se desarrolló por primera vez hace más de 60 años. Sin embargo, la seguridad y la eficacia de la BCG es una fuente de controversia - aunque protege contra la manifestación de la enfermedad grave en niños, la 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 en general con este agente.

Varias de las proteínas que se expresan fuertemente durante las etapas tempranas de la infección por *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 las etapas tardías de la infección. El control adecuado durante la infección latente puede requerir de células T que sean específicas para los antígenos particulares que se expresen 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 la TB latente podría reducir significativa y económicamente las tasas de infección de TB globales.

También se pueden utilizar vacunas subunitarias basadas en antígenos de estadio tardío en combinación con antígenos de estadio

temprano para proporcionar una vacuna multifase. De forma alternativa, se pueden usar antígenos de estadio temprano y/o tardío para complementar y mejorar la vacunación de BCG (reforzando la respuesta a BCG o bien a través del desarrollo de cepas de BCG recombinantes avanzadas).

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 *et al. Infect. Immun.* 2004 72(11): 6622-6632; Skeiky *et al. J. Immunol.* 2004 172: 7618-7628; Tsenova *et al. Infect. Immun.* 2006 74(4): 2392-2401; Reed *et al. PNAS* 2009 106(7): 2301-2306). Mtb72f también ha sido el objeto de investigaciones clínicas (Von Eschen *et al.* 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 valiosos en el modelo de TB latente (solicitud de patente internacional WO2006/117240).

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno relacionado con M72" se refiere a la proteína de M72 proporcionada en la SEQ ID NO: 1 o un derivado inmunógeno de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a un antígeno que está modificado con relación a la secuencia de referencia. Los derivados inmunógenos son suficientemente similares

a la secuencia de referencia como para retener las propiedades 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
5 modificada de la secuencia de referencia o alternativamente puede consistir en una versión modificada de la secuencia de referencia.

El antígeno relacionado con M72, por ejemplo, puede contener menos de 1,500 residuos de aminoácidos, tal como menos de 1,200 residuos de aminoácidos, en particular menos de 1,000 residuos de
10 aminoácidos, en especial menos de 800 residuos de aminoácidos.

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

El experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a la proteína de M72 que alteren, añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos son un "derivado inmunógeno" en el que la(s)
5 alteración/alteraciones da(n) como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido funcionalmente similar o la sustitución/delección/adición de residuos que no imparten sustancialmente la función inmunogénica.

Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan
10 aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica.

En general, estas sustituciones conservadoras caerán dentro de una de las agrupaciones de aminoácidos especificadas a continuación, aunque en algunas circunstancias pueden ser posibles
15 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:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 20 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);
- 25 7) Serina (S), treonina (T); y

8) Cisteína (C), metionina (M)

(véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* 1984).

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

Los derivados inmunógenos también pueden incluir aquéllos 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
10 impacto significativo sobre las propiedades inmunogénicas del antígeno. Un ejemplo de inserciones incluye tramo corto de residuos de histidina (por ejemplo, de 2 a 6 residuos) para ayudar en la expresión y/o purificación del antígeno en cuestión.

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

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

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", 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
25 un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son los

mismos (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 una
5 región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante 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 de cuando menos 500 aminoácidos de longitud, tal como de cuando menos 600 aminoácidos o de cuando
10 menos 700 aminoácidos. De forma adecuada, la comparación se realiza sobre una ventana correspondiente a la longitud entera de la secuencia de referencia (al contrario que la secuencia derivada).

Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa como
15 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 la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de
20 algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula las identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros
25 del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se hayan alineado de forma
5 óptima las dos secuencias. Los métodos 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, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante
10 el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de semejanzas de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de
15 software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 Supl.)).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una
20 alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por parejas, para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencias. También representa un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear la alineación.
25 PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresivo

de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El método usado es similar al método 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 o grupo de secuencias alineadas más relacionadas. Se alinean dos grupos de secuencias mediante una extensión sencilla de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una serie de alineaciones progresivas, por parejas. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos para las regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar la relación del porcentaje de identidad de secuencia 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 *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395 (1984)).

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la semejanza de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen

en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), respectivamente. El software para llevar a cabo análisis de BLAST está públicamente disponible por el National Center for Biotechnology Information (página web en www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que pueden coincidir o satisfacer alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs 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 puntuación de alineación acumulable. Las puntuaciones acumulables se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos 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 palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulable baja por 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 residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN
5 (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase,
10 Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la semejanza entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y
15 Altschul, *Proc. Nat'l. 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
20 por 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
25 preferentemente de menos de aproximadamente 0.001.

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

Los derivados particulares de la proteína de M72 incluyen aquéllos con residuos His adicionales en el extremo N-terminal (por ejemplo, dos residuos His, como se proporcionan en la SEQ ID NO: 3; o una marca de polihistidina de cinco o en particular seis residuos

His, que se puede usar para la purificación de afinidad de níquel). Mtb72f (SEQ ID NO: 5) que contiene el residuo de serina original que se ha mutado en M72, es otro derivado de M72, así como las proteínas de Mtb72f con residuos His adicionales en el extremo N-terminal (por ejemplo, dos residuos His; o una marca de polihistidina de cinco o en particular seis residuos His, que se pueden usar para la purificación de afinidad de níquel).

De forma adecuada, un antígeno relacionado con M72 comprenderá, tal como que consistirá en, una secuencia que tenga 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 tenga al menos un 98 % de identidad con M72.

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

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

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

5 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.

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 de la terapia 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
10 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 la administración parenteral, las soluciones tendrían que tener 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
25

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.

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

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

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

 En una modalidad 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
25 composición inmunogénica necesitará él 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).

5 En una modalidad 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 modalidad, el poliol es un alcohol de azúcar, especialmente un alcohol de azúcar C3-6. Los alcoholes de azúcar
10 ejemplares incluyen glicerol, eritritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, sorbitol, manitol, dulcitol e iditol. En un ejemplo específico de esta modalidad, 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
15 tonicidad. En una modalidad particular de la invención, el agente de tonicidad no iónico en las composiciones de la invención incorpora sacarosa y/o sorbitol.

 En una modalidad, una concentración adecuada de poliol dentro de la composición inmunogénica es de entre
20 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
25 modalidad, el poliol es sorbitol.

En otra modalidad, 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.

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.

Se puede controlar el pH mediante el uso de reguladores del pH, incluyendo, por ejemplo, reguladores de Tris o de fosfato.

En una modalidad particular de la invención, la composición inmunogénica comprende uno o más inmunoestimulantes.

En una modalidad, 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 fue descrita por primera vez por Dalsgaard *et al.* 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 mediante HPLC que retienen la actividad coadyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento WO88/09336), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidas como QA7 y QA21). La QS21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce células T citotóxicas (CTL) CD8+, células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante. QS21 es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

En una forma adecuada de la presente invención, el coadyuvante de saponina dentro de la composición 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.

De forma deseable, QS21 se proporciona en una composición menos reactógena en la que se desactiva con un esteroide exógeno, tal como colesterol, por ejemplo. Existen varias formas concretas de composiciones menos reactógenas en las que QS21 se desactiva con colesterol. En una modalidad específica, la saponina/esteroide está en

la forma de una estructura de liposoma (tal como la descrita en el documento WO 96/33739, ejemplo 1). En esta modalidad, 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 dilaúril-fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la estructura de liposoma-QS21 para los 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 esterol con respecto al fosfolípido es de un 1-50 % (mol/mol), de forma adecuada de un 20-25 %.

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

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

adecuada, el esteroles es colesterol.

En otra modalidad, 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
5 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 *et al*, J Immunol 2003 p1630-5). Un agonista de TLR4 puede provocar una respuesta de señalización a través de un
10 camino de señalización de TLR-4. Un ejemplo adecuado de un agonista de TLR4 es un lipopolisacárido, de forma adecuada, un derivado no tóxico de lípido A, en particular, monofosforil-lípido A o más en particular monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL).

3D-MPL se comercializa con el nombre MPL por
15 GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y en la memoria descriptiva se denomina como MPL o 3D-MPL, véanse, 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 células T CD4+ con un fenotipo de IFN-gamma (Th1). 3D-MPL se puede producir de acuerdo
20 con los métodos dados a conocer en el documento GB2220211A. Químicamente es una mezcla de un monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado con 3, 4, 5 ó 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
25 pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar para la

esterilización a través de un filtro de 0.22 micras. 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.

5 Otros agonistas de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil-glucosaminida (AGP) tales como los dados a conocer en el documento WO98/50399 o en la patente de los EE.UU. 6,303,347 (también se dan a conocer procesos para la preparación de AGP), de forma adecuada RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente
10 aceptables de AGP como se dan a conocer en la patente de los EE.UU. N.º 6,764,840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4.

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

 En una modalidad particular, la composición inmunogénica comprende tanto una saponina como un agonista de TLR4. En un ejemplo específico, la composición inmunogénica comprende QS21 y
25 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 microgramos por dosis humana de la composición inmunogénica. Se puede usar 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 50 microgramos, por ejemplo de entre 40 y 60 microgramos, de forma adecuada de entre 45 y 55 microgramos o de entre 49 y 51 microgramos o de 50 microgramos. En otra modalidad, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 25 microgramos, por ejemplo, de entre 20 y 30 microgramos, de forma adecuada de entre 21 y 29 microgramos o de entre 22 y 28 microgramos o de entre 23 y 27 microgramos o de entre 24 y 26 microgramos, o de 25 microgramos.

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

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 la saponina es de forma adecuada de entre 1:5 y 5:1, de forma adecuada de entre 1:2 y 2:1, tal como de aproximadamente 1:1. Por ejemplo, cuando 3D-MPL está presente en una cantidad de 50 microgramos o 25 microgramos, entonces QS21 también puede estar presente de forma adecuada en una cantidad de 50 microgramos o 25 microgramos, 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 microgramos de cada una por dosis humana, tales como en una cantidad de entre 10 y 75 microgramos de cada una 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 microgramos de cada una por dosis humana, tales como en una cantidad de entre 20 y 30 microgramos de cada una por dosis humana.

En una modalidad, 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 inmunoestimulante, 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

oligonucleótidos que contienen CpG, 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.

5 En una modalidad, el enlace internucleótido en el oligonucleótido es un enlace de fosforoditioato, o posiblemente de fosforotioato, aunque también se pueden usar enlaces de fosfodiéster y otros internucleótidos, incluyendo oligonucleótidos con uniones de internucleótidos mezclados. Los métodos para producir
10 oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos 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
15 estabilicen el oligonucleótido.

 Los ejemplos de oligonucleótidos de CpG adecuados para su inclusión en las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento tienen las siguientes secuencias. En una modalidad, estas secuencias contienen uniones internucleótidos
20 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)

25 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)

5

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

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

La presente invención también proporciona un proceso para
15 preparar una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas:

- 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
20 solución es de 13 mS/cm o menor.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad particular, la
25 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.

De forma adecuada, la conductividad de la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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.

Se proporciona además un proceso para preparar una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas:

- 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.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad 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.

De forma adecuada, la concentración de sales en la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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.

Adicionalmente, se proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica de la invención que comprende las etapas:

- 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.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 20 mM o menor, o 15 mM o menor. De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es de o inferior a 5 mM.

De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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.

En una modalidad, 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 una modalidad adicional, la saponina y/o el agonista de TLR4 están en una formulación liposomal. En una modalidad, 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.

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 de 13 mS/cm o menor.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad 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.

De forma adecuada, la conductividad de la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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, 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.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad 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.

De forma adecuada, la concentración de sales en la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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, se proporciona un kit que comprende:

- 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.

En determinadas modalidades, 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 una modalidad particular, la concentración de sales en dicha solución acuosa es de 35 mM o menor, tal como 30 mM o menor, o 20 mM o menor, o 15 mM o menor. De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la solución es de o inferior a 5 mM.

De forma adecuada, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa es tal que cuando se reconstituye el antígeno liofilizado, 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 una modalidad 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 única dosis de la composición inmunogénica, tal como una única dosis humana, o múltiples dosis de la composición inmunogénica.

Las soluciones acuosas usadas en los kits de la invención pueden ser cualesquiera de las soluciones acuosas, como se definen en el presente documento. En una modalidad específica de la invención, la solución acuosa comprende un agonista de TLR4 y/o

una saponina en forma de liposomas. En una modalidad particular, el agonista de 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.

5 Con respeto a los kits y métodos para la producción de composiciones inmunogénicas de la invención mencionados anteriormente, se puede observar que el/los inmunoestimulante(s) y agente(s) de tonicidad, si están presentes, se pueden liofilizar junto con el antígeno o pueden ser contenidos con la solución acuosa
10 como se desee. La solución acuosa puede ser sencillamente agua para inyección y todos los demás componentes de la composición inmunogénica se liofilizan junto con el antígeno. Normalmente, se proporcionan al menos algún/algunos inmunoestimulante(s) y agente(s) de tonicidad en la solución acuosa, que es particularmente
15 apropiada si determinados componentes son poco compatibles con la liofilización, tales como liposomas. En una modalidad, la solución acuosa comprende un inmunoestimulante. En una segunda modalidad, la solución acuosa comprende un agente de tonicidad, por ejemplo, un agente de tonicidad no iónico, tal como un poliol, en
20 particular, sorbitol. En una tercera modalidad, 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 dirijan la reconstitución del antígeno relacionado con M72 liofilizado usando
25 la solución acuosa.

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 para su 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 elaboración 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*.

También se proporciona un método para la profilaxis, el tratamiento o la mejora de infección por micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium tuberculosis*, el cual 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 propósito de:

- tratar tuberculosis activa;
- profilaxis de tuberculosis activa, tal como mediante su administración a un sujeto que esté infectado, o alternativamente a un sujeto que tenga infección latente;
- tratar tuberculosis latente;

- profilaxis de tuberculosis latente, tal como mediante su administración a un sujeto que no esté infectado; o

- evitar o retrasar la reactivación de la tuberculosis, especialmente el retraso de la reactivación de TB, por ejemplo, durante un periodo de meses, años o incluso indefinidamente.

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

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

El término "tuberculosis primaria" se refiere a la 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, et al., eds., 2005).

Los términos "tuberculosis secundaria" o "tuberculosis

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

5 El término "reactivación de tuberculosis" se refiere a la manifestación más tardía de los síntomas de enfermedad en un individuo que se evalúe como positivo para una prueba de infección (por ejemplo, en una prueba cutánea para tuberculina, de forma adecuada en un ensayo basado en células T *in vitro*) pero que no
10 tenga los 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 los síntomas de la enfermedad activa que se hayan tratado
15 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 esté infectado o que tenga una infección latente por micobacterias, tal como infección por
20 *Mycobacterium tuberculosis*.

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
25 en una única inyección (la dosis unitaria) para un ser humano estará

en el intervalo de 50 microlitros a 1 mililitro, tal como de 100 microlitros a 750 microlitros, especialmente de 400 a 600 microlitros, por ejemplo de aproximadamente 500 microlitros.

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

10 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 mediante las técnicas descritas en el presente documento, permanece al menos en un 80 % de la antigenicidad antes de su
15 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. Para composiciones de interés particular, permanece al menos un 80 % de la antigenicidad de la composición,
20 tal como al menos un 85 %, al menos un 90 % y especialmente al menos un 95 % después de su almacenamiento a 30°C durante un periodo de 24 horas.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de composición coadyuvante ASA (sorbitol)

Se preparó una composición coadyuvante que comprendía
5 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. Método de preparación de liposomas:

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y
10 monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado en un disolvente orgánico al
vacío. Después, se añadió una solución acuosa (solución salina
regulada con fosfato [NaCl 100 mM, fosfato 50 mM, pH de 6.1]) y se
agitó el recipiente hasta que todo el lípido estaba en suspensión.
Después, se prehomogeneizó esta suspensión con un mezclador de
15 alto cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el
tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm $\pm$ 10 nm
medido mediante DLS. Después, se filtraron los liposomas para
esterilizarse.

B. Formulación ASA:

20 Etapas 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió un regulador de fosfato de Na₂/K 100 mM, pH de 6.1,
diluido 10 veces, a agua para inyección hasta alcanzar una
concentración de regulador de fosfato de 10 mM en la formulación
final. Después se añadió una solución de sorbitol al 30 % (p/v) en
25 agua para inyección (WFI) hasta alcanzar una concentración de un

4.7 % en la formulación final, esto se agitó durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

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

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

10 Etapas 2: Adición de QS21

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

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

Etapas 3: Se comprobó que el PH era de 6.1 ± 0.1

20 Etapas 4: Filtración de esterilización

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

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

25 La composición coadyuvante obtenida, que comprendía MPL 3-des-O-acilado y QS21 en una formulación liposomal y que contenía

sorbitol como agente de tonicidad (designado como ASA (sorbitol)), se almacenó después a 4°C.

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

5 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. Método de preparación de liposomas:

10 Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) en un disolvente orgánico al vacío. Después, se añadió solución salina regulada con fosfato (NaCl 100 mM, fosfato 50 mM, pH de 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
15 cizallamiento y se homogeneizó con alta presión hasta que el tamaño de los liposomas se redujo hasta alrededor de 90 nm ± 10 nm medido mediante DLS. Después se filtraron los liposomas para esterilizarse sobre una membrana de PES de 0.22 micras.

B. Formulación ASA:

20 **Etapas 1: Dilución de liposomas concentrados**

 Se añadió regulador de fosfato de Na₂/K 100 mM, pH de 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
25 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 microgramos/mililitro 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 100 microgramos/mililitro en la formulación final. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente.

Etapa 3: Se comprobó el pH para que fuera de 6.1 ± 0.1

Etapa 4: Filtración de esterilización

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

Etapa 5: Almacenamiento de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$.

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

Ejemplo 3: Actividad lítica de QS21

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 desactivara 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)).

Se midió la actividad lítica de QS21 mediante 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
5 cuidadosamente el sedimento en regulador de 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 3 a 4 días como máximo si no se usó directamente (y se lavó de nuevo el día que se usó) o se diluyó
10 alrededor de 10 veces en el regulador si se usó el mismo día.

Se preparó una curva de intervalo de dosis de QS21 en un regulador ASA (en sal o en regulador de sorbitol seguido de la muestra ASA sometida a prueba) de forma extemporánea y se prepararon muestras de coadyuvante (que contenían un equivalente
15 de 50 microgramos o 90 microgramos de QS21 es decir el equivalente de 500 microlitros o 900 microlitros de ASA). Se ajustó el volumen final hasta 900 microlitros en los estándares y las muestras con el regulador adecuado (que contenían o no sorbitol como función del regulador de la muestra sometida a prueba). Debido a su
20 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 regulador. No se
25 añadieron RBC a estos blancos. Después, se incubaron los

estándares y las muestras con RBC (100 microlitros de RBC diluidos añadidos a 900 microlitros de estándares y muestras) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Después, se centrifugaron las muestras durante 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:

- Mayor que el nivel de base ($DO > 0.1$)
- Alrededor de tres veces mayor que el regulador de DO (el "0 μg " de QS21)
- En la parte ascendente de la curva
- Determinado para cada prueba.

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} .

20

25

Curva de QS21 de ejemplo

	µg QS21	DO	QS21 desactivado
5	0	0.029	NA
	0.5	0.052	< LDD
	0.6	0.073	< LDD
	0.7	0.091	< LDD
	0.8	0.096	< LDD
10	0.9	0.12	> 98.2 %
	1	0.195	> 98 %
	1.1	0.212	> 97.8 %
15	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 %
20	Coadyuvante*	0.03	> 98.2 %

* 50 microgramos de equivalente de QS21 sometido a prueba.

Regulador 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 microgramos

de QS21, y DO de 0.12

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 microgramos de QS21 sometido a prueba. En el caso de un equivalente de 90 microgramos sometido a prueba, la conclusión es más de un 99 %.

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

15	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 %
20	Composición coadyuvante (ASA) sorbitol, NaCl 5 mM	T0	< 2	> 97,8 %
25		7 días a 37°C	<1	> 96 %

Muestra	Punto temporal	LDD	QS21 desactivado
	11 meses a 4°C	<2	> 97,8 %*

5 Equivalente de 50 microgramos de QS21 sometido a prueba excepto

* equivalente de 90 microgramos de QS21 sometido a prueba.

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

10 **Ejemplo 4: Congéneres de MPL.**

Químicamente, 3D-MPL es una mezcla de un monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Cada molécula de 3D-MPL separada se denomina como un congénere. Es importante que la composición del congénere permanezca constante, sin cambios entre la proporción de congéneres. También es importante que cualquier regulador usado permita que la composición de congénere sea la misma que en los liposomas concentrados usados para preparar la composición coadyuvante.

20 Como se muestra en la figura 2, se examinó la composición de congénere en liposomas concentrados de 3D-MPL (liposomas concentrados LIP07-217, primera columna de la figura 2), una composición coadyuvante que comprendía liposomas de 3D-MPL y QS21 en un regulador de NaCl 150 mM (coadyuvante de NaCl 150 mM, o ASA (NaCl 150 mM), segunda columna), y una composición coadyuvante que comprendía liposomas de 3D-MPL y QS21 en un

regulador de sorbitol y NaCl 5 mM (coadyuvante de sorbitol, o ASA (sorbitol), columnas 3-7).

También se examinó la composición de congénere en dos lotes de coadyuvante de ASA (sorbitol) en el día 0, y 7 días después de la
5 preparación, y se mantuvo a 37°C para asegurar que no se produjera desprendimiento 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
10 muestras de ASA (sorbitol) mediante 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
15 tetrabutilamonio (TBAOH) como reactivo de par iónico. Se eluyeron los congénere que contenían el mismo número de grupos acilo grasos en distintos grupos (tetraacilo, pentaacilo y hexaacilo). Se deduce la distribución de congénere comparando el área de pico de cada grupo con el área de pico total de todos los congénere de
20 MPL.

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

25 **Ejemplo 5: Preparación de composición coadyuvante de**

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 de 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 un pH de 6.1.

La formulación final de ASA (sorbitol - 2) contenía 1 mg de DOPC, 250 microgramos de colesterol, 50 microgramos de 3D-MPL/ml y 50 microgramos 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. Método de preparación de liposomas:

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado en un disolvente orgánico al vacío. Después, se añadió una solución acuosa (solución salina regulada con fosfato [NaCl 100 mM, fosfato 50 mM pH 6,1]) y se agitó el recipiente hasta que todo el lípido estuvo 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 $90 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ medido mediante DLS. Después, se filtraron los liposomas para esterilizarse.

B. Formulación de ASA:

Etapas 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió regulador de fosfato de Na_2/K 100 mM, pH de 6.1, diluido 10 veces, a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de regulador de fosfato de 10 mM en la formulación final. Después se añadió una solución de sorbitol al 30 % (p/v) en agua para inyección (WFI) hasta alcanzar una concentración de un 4.7 % en la formulación final - ésta se agitó durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

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

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

Etapas 2: Adición de QS21

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

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

5 Etapla 3: Se comprobó que el pH era de 6.1 ± 0.1

Etapla 4: Filtración de esterilización

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

Etapla 5: Almacenamiento de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$.

10 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 como ASA (sorbitol-3)), se almacenó después a 4°C .

Ejemplo 7: Preparación de composición coadyuvante de
15 **ASA (NaCl 150 mM - 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 2, en una formulación liposomal usando cloruro de sodio como agente de tonicidad. Ésta se preparó como
20 sigue:

A. Método de preparación de liposomas:

Se secó una mezcla de lípido (DOPC), colesterol y monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) en un disolvente orgánico al vacío. Después, se añadió solución salina regulada con
25 fosfato (NaCl 100 mM, fosfato 50 mM, pH de 6.1) y se agitó el

recipiente hasta que todo el lípido estuvo 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 $90 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ medido mediante DLS. Después se filtraron los liposomas para esterilizarse sobre una membrana de PES de 0.22 micras.

B. Formulación de ASA:

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

Se añadió regulador de fosfato de Na_2/K 100 mM, pH de 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 esta 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 microgramos/mililitro 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 microgramos/mililitro en la formulación final. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente.

Etapa 3: Se comprobó el pH para que fuera de 6.1 ± 0.1

Etapa 4: Filtración de esterilización

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

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

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

Ejemplo 8: Preparación de antígenos de proteínas

M72 con dos residuos His N-terminales (SEQ ID NO: 3)

10 Construcción del vector de expresión de M72

Se generó un plásmido que codificaba para la secuencia de aminoácidos de Mtb72f con una marca de 6-His adicional en el extremo N-terminal mediante la unión secuencial en tándem de los marcos de lectura abiertos (ORF) que codificaban el fragmento C-
 15 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-
 20 terminales (en el caso del fragmento C-terminal de Mtb32a y Mtb39a) para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico de la cepa de *M. Tuberculosis* H37Rv. Usando este vector como plantilla, se realizó una mutación de Ser706 a Ala mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se verificó la orientación apropiada de
 25 los insertos así como la mutación Ser706Ala mediante secuenciación

del ADN.

Para obtener el vector que codifica para M72, que sólo tiene 2 residuos His en el extremo N-terminal, se suprimieron cuatro His haciendo uso de un sistema comercial de mutagénesis dirigida al sitio. Después de la verificación de la secuencia, se extirpó la secuencia de codificación de M72 del plásmido mediante 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 la polimerasa de ARN T7 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 canamicina.

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 método de electroporación. Se secuenciaron la secuencia de codificación del inserto de M72 y las regiones flanqueantes en ambas cadenas y se encontró que eran idénticas a la secuencia determinada a partir de la construcción del plásmido original.

Fermentación

Se descongeló un vial de semilla de procesamiento sedimentada a temperatura ambiente. Se preparó una predilución mezclando la semilla de procesamiento con 4.9 ml de medio de

precultivo. Se usó 1 ml de la pre-dilución para inocular el pre-cultivo líquido que consistió en 400 ml de medio de precultivo complementado con 50 mg/l de sulfato de canamicina y 10 g/l de glucosa.

5

Composición del medio de precultivo

	Ingrediente	Concentración		
10	KH_2PO_4	14.83 g/l		
	K_2HPO_4	1.65 g/l		
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.82 g/l		
15	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		
20	- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		3.3 g/l	
	- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		58 g/l	
	- Solución de microelementos ⁽²⁾ :		116 ml/l	
25	- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			7.65 g/l
	- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			5.28 g/l
	- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			1.1 g/l

	Ingrediente	Concentración		
5	- 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
10	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	
15	El pH del medio se ajusta a 6.5 con solución de NaOH (25 %)			
	Se filtra el medio a través de 0.22 micras			

(1) pH ajustado a 1.50 con solución de HCl (37 %); se filtra la solución a través de 0.22 micras.

(2) Se filtra la solución a través de 0.22 micras.

20

Se incubó el precultivo en un matraz de agitación de 2 litros a 30°C bajo agitación (200 RPM) hasta que la $\text{DO}_{650\text{nm}}$ alcanzó un valor de entre 2 y 4 (tiempo de incubación aproximado: 16 horas). En ese estadio, un fermentador de 72 litros (volumen total) que contenía 45

25 litros de medio de cultivo complementado con 34 mg/l de sulfato de

canamicina se inoculó con 52 ml de precultivo líquido.

Composición del medio de cultivo

	Ingrediente	Concentración	
5	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	
10	- 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
15	- 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
20	HCl 37 %	0.40 ml/l	
	Extracto de levadura	35 g/l	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.10 g/l	
25	KH ₂ PO ₄	18.70 g/l	

5

10

Ingrediente		Concentración	
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 micras			

(1) Se filtra la solución a través de 0.22 micras.

15

(2) pH ajustado a 11.0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0.22 micras.

20

Durante la fase de crecimiento, se mantuvo el pH a 6.8 ± 0.2 mediante la 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 el medio de alimentación.

Composición del medio de alimentación

25

Ingrediente		Concentración	
-------------	--	---------------	--

	Ingrediente	Concentración	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.98 g/l	
5	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
10	- 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
15	- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
	- HCl 4N		6.2 ml/l
	HCl 37 %	1.24 ml/l	
	Glutamato de sodio	5 g/l	
20	Extracto de levadura	40 g/l	
	Glicerol 87 %	590 ml/l	
	Solución de biotina ⁽²⁾ :	2 ml/l	

5

Ingrediente	Concentración	
- Biotina		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.66 g/l	
Se filtra la solución a través de 0.22 micras		

(1) Se filtra la solución a través de 0.22 micras.

(2) pH ajustado a 11.0 con solución de NaOH (25 %); se filtra la solución a través de 0.22 micras.

10

Se mantuvo la temperatura a 30°C durante 2 horas adicionales, después se elevó hasta 37°C hasta el final de la fermentación. Se fijó de forma constante el flujo de aire a 75 litros/minuto, y se mantuvo el oxígeno disuelto a un 17 % de saturación mediante el control de retroalimentación de la agitación y la presión. Se añadieron pequeñas cantidades de solución antiespumante según la demanda automáticamente. En el momento en 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 del 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.

15

20

Aislamiento de cuerpos de inclusión

25

Se descongelaron los sedimentos celulares recolectados de la

cosecha a temperatura ambiente y se rompieron en regulador de lisis (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH de 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, 5 IB) con regulador de lavado que contenía urea, Tris y NaCl. Se solubilizaron los IBs con regulador de solubilización que contenía urea 8 M y se filtraron a través de una membrana de 0.2 micras. En primer lugar, se purificó esta solución filtrada mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de flujo 10 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 de 7.0.

Se purificó adicionalmente el M72 recogido mediante cromatografía de hidroxapatita (HA), de la que se eluye con una 15 solución de urea 6 M, bis-Tris-propano 20 mM, NaCl 250 mM, pH de 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 de 7.5. Después, se esterilizó el M72 a través de un filtro de 0.22 micras. Después, se puso en alícuotas la masa purificada y se 20 almacenaron a -70°C.

Ejemplo 9: Investigación de "desplazamiento salino" en composiciones que comprenden M72 con diferentes concentraciones de sal a un pH de 6.1, 7.5 y 8.5.

Se investigó el impacto de la concentración de cloruro del 25 sodio y del pH en la estabilidad del antígeno de M72, evaluado por

tamaño y antigenicidad.

Método

Se diluyó el antígeno a granel purificado (M72 con dos residuos His N-terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta una concentración de 100 microgramos/mililitro en tres reguladores diferentes (regulador de fosfato 10 mM a un pH de 6.1, regulador de Tris 20 mM a un pH de 7.5, y regulador de Tris 20 mM a un pH de 8.5) que contenían concentraciones de cloruro de sodio finales de 0, 50, 150, 300 y 450 mM.

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

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

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

Se cuantificó la antigenicidad mediante un ELISA de tipo sándwich en el que se captura el antígeno mediante un anticuerpo

policlonal de conejo específico de M72 y posteriormente se revela mediante 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 3 a 5.

Los resultados demuestran por primera vez que la estabilidad de las 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 y la antigenicidad del antígeno es mucho más notable cuando el pH es menor.

El tamaño y la antigenicidad del antígeno no son estables a un pH de 6.1, incluso en ausencia de cloruro de sodio. La adición de cloruro de sodio 50 mM a un pH de 6.1 condujo a un incremento de tamaño de desde 35 nm (cloruro de sodio 0 mM en T0) hasta 58 nm (T0) o 79 nm después de 24 horas a 25°C.

El tamaño y la antigenicidad del antígeno son relativamente estables durante 24 horas a 25°C a un pH de 7.5 o de 8.5, en particular en ausencia de cloruro de sodio o en una concentración de cloruro del sodio de 50 mM. No obstante, el incremento de la concentración de cloruro de sodio hasta 150 mM o mayor da como resultado un incremento claro en el tamaño del antígeno y una

reducción en la antigenicidad.

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

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

10 **Método**

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

(a) **M72 con dos residuos His N-terminales – pH objetivo de 8.5 en**
15 **la vacuna reconstituida**

Se añadió una solución de sacarosa al 15.75 % (p/v) (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6.3 %. Después, se añadió una solución de Tween80 al 3 % (p/v) (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0.025 %.

20 Después, se añadió regulador de Tris-HCl 1 M, pH de 8.8 hasta alcanzar una concentración de regulador de Tris de 50 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió el antígeno a granel purificado (M72

25 con dos residuos His N-terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó

en el ejemplo 8) hasta alcanzar una concentración de proteína de 25 microgramos/mililitro. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se encontró que era de 8.8.

- 5 Se cargaron 0.5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, y después se secaron por congelación.

(b) M72 con dos residuos His N-terminales – pH objetivo de 8.0 en la vacuna reconstituida

- 10 Se añadió una solución de sacarosa al 15,75 % (p/v) (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6.3 %. Después, se añadió una solución de Tween80 al 3 % (p/v) (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0.025 %. Después, se añadió regulador de Tris-HCl 1 M, pH de 8.8 hasta
- 15 alcanzar una concentración de regulador de Tris de 20 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió antígeno a granel purificado (M72 con dos residuos His N-terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó en el
- 20 ejemplo 8), hasta alcanzar una concentración de proteína de 25 microgramos/mililitro. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se encontró que era de 8.8.

Se cargaron 0.5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, y después se secaron por congelación.

- 25 (c) M72 con dos residuos His N-terminales – pH objetivo de 7.5 en

la vacuna reconstituida

Se añadió una solución de sacarosa al 15.75 % (p/v) (preparada en agua para inyección) a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa de un 6.3 %. Después, se

5 añadió una solución de Tween80 al 3 % (p/v) (preparada en agua para inyección) hasta alcanzar una concentración de un 0.025 %. Después, se añadió regulador de Tris-HCl 1 M, pH de 8.8 hasta alcanzar una concentración de regulador de Tris de 12.5 mM. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 5 minutos a temperatura

10 ambiente. Después, se añadió el antígeno a granel purificado (M72 con dos residuos His N-terminales, SEQ ID NO: 3, como se preparó en el ejemplo 8) hasta alcanzar una concentración de proteína de 25 microgramos/mililitro. Se agitó magnéticamente la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se comprobó el pH y se

15 encontró que era de 8.8.

Se cargaron 0.5 ml de la mezcla obtenida en viales de vidrio de 3 ml, y después se secaron por congelación.

Se reconstituyeron las tortas de liofilización descritas anteriormente con 625 microlitros de las soluciones coadyuvantes preparadas en los ejemplos 5 y 7. Tras la reconstitución con solución

20 coadyuvante, se obtuvieron las siguientes composiciones inmunogénicas:

- (i) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (NaCl 150 mM –
2) pH de 8.5

25 10 microgramos/mililitro de antígeno

- Sacarosa al 5 % p/v
- Tris 40 mM
- Tween80 al 0.02 % p/v
- 500 microgramos de DOPC
- 5 125 microgramos de colesterol
- 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- NaCl 150 mM
- Fosfato 10 mM
- 10 pH de 8.5
- (ii) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH de 8.0
- 10 microgramos/mililitro de antígeno
- 15 Sacarosa al 5 % p/v
- Tris 16 mM
- Tween80 al 0.02 % p/v
- 500 microgramos de DOPC
- 125 microgramos de colesterol
- 20 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- NaCl 150 mM
- Fosfato 10 mM
- pH de 8.0
- 25 (iii) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (NaCl 150 mM –

2) pH de 7.5

- 10 microgramos/mililitro de antígeno
- Sacarosa al 5 % p/v
- Tris 12.5 mM
- 5 Tween80 al 0.02 % p/v
- 500 microgramos de DOPC
- 125 microgramos de colesterol
- 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- 10 NaCl 150 mM
- Fosfato 10 mM
- pH de 7.5

(iv) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (sorbitol – 2) pHde 8.5

- 10 microgramos/mililitro de antígeno
- Sacarosa al 5 % p/v
- Tris 40 mM
- Tween80 al 0.02 % p/v
- 20 500 microgramos de DOPC
- 125 microgramos de colesterol
- 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- NaCl 5 mM
- 25 Sorbitol al 4.7 % p/v

Fosfato 10 mM

pH de 8.5

(v) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (sorbitol – 2) pH de 8.0

5 10 microgramos/mililitro de antígeno

Sacarosa al 5 % p/v

Tris 16 mM

Tween80 al 0.02 % p/v

500 microgramos de DOPC

10 125 microgramos de colesterol

25 microgramos de 3D-MPL

25 microgramos de QS21

NaCl 5 mM

15 Sorbitol al 4.7 % p/v

Fosfato 10 mM

pH de 8.0

(vi) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (sorbitol – 2) pH de 7.5

20 10 microgramos/mililitro de antígeno

Sacarosa al 5 % p/v

Tris 12.5 mM

Tween80 al 0.02 % p/v

500 microgramos de DOPC

25 125 microgramos de colesterol

25 microgramos de 3D-MPL

25 microgramos de QS21

NaCl 5 mM

Sorbitol al 4.7 % p/v

5 Fosfato 10 mM

pH de 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).

Se realizó un análisis SEC-HPLC mediante inyección en un TOSOH TSK-Gel5000Pw_{XL} (ID 7.8 mm x 30 cm) equilibrado en regulador de Tris 20 mM, pH de 8.5, detección por UV a 210 nm, y velocidad de flujo de 0.5 ml/min.

15 Se cuantificó la antigenicidad mediante un ELISA de tipo sándwich en el que se captura el antígeno mediante un anticuerpo policlonal de conejo específico de M72 y posteriormente se revela mediante 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

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

Los perfiles de SEC-HPLC son estables tras la reconstitución en composiciones bajas en sal usando sorbitol como agente de tonicidad a cada pH (es decir, pH de 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
5 claros entre el perfil inicial obtenido y los que siguen al almacenamiento a 25°C o 30°C. Este desprendimiento se vuelve más intenso cuando se disminuye el pH de la composición de NaCl 150 mM.

10 Se pueden sacar las mismas conclusiones en términos de antigenicidad, permaneciendo las recuperaciones en gran parte estables tras la reconstitución en composiciones bajas en sal usando sorbitol como agente de tonicidad a cada pH (es decir, pH de 7.5, 8.0 y 8.5) hasta 24h a 30°C.

15 **Ejemplo 11: Determinación de la conductividad para las 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
20 con una composición inmunogénica que contenía una cantidad convencional de cloruro de sodio.

Método

Se preparó una variedad de estándares que tenían concentraciones de cloruro del sodio de 0, 75, 100, 150, 250 y
25 300 mM a partir de una solución madre de cloruro de sodio 1500 mM

mediante dilución en agua para inyección.

Se prepararon las composiciones inmunogénicas usando M72 con dos residuos 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

Concentración de cloruro de sodio mM	Conductividad mS/cm
300	30.0

5

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

Conductividad de soluciones de prueba

Descripción	Concentración de cloruro de sodio, mM	Conductividad mS/cm	Concentración de cloruro de sodio equiva- lente, 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

25

Descripción	Concentración de cloruro de sodio, mM	Conductividad mS/cm	Concentración de cloruro de sodio equiva- lente, mM
5 ASA (NaCl 150 mM – 2)	150	16	159
10 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

15 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.

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

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

25 El objetivo del este ejemplo fue determinar si los cambios de formulación para reducir la cantidad de sal en las composiciones

inmunogénicas de la invención, con vistas a mejorar la estabilidad de proteína, tenían o no un impacto sobre la inmunogenicidad *in vivo*.

Método

Se evaluaron cuatro composiciones inmunogénicas:

- 5 1. M72 con dos residuos His N-terminales, pH de 8.5/ASA
(NaCl 150 mM – 2).
2. M72 con dos residuos His N-terminales, pH de 8.5/ASA
(sorbitol – 2).
3. M72 con dos residuos His N-terminales, pH de 8/ASA
10 (sorbitol – 2).
4. M72 con dos residuos His N-terminales, pH de 7.5/ASA
(sorbitol – 2).

Se evaluó la inmunogenicidad de estas composiciones que
contenían antígenos en ratones C57BL/6. Para cada una de las
15 cuatro composiciones, se inyectó 3 veces por vía intramuscular a 30
ratones C57BL/6, en los días 0, 14 y 28, con 1 microgramo de
antígeno en 50 microlitros de solución coadyuvante (preparada
mediante el método proporcionado en el ejemplo 10). Se midieron las
respuestas de células-T específicas de M72 elicitadas (tanto CD4
20 como CD8) 6 días después de la última inmunización (6dPIII).

Para la determinación de las 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
25 plaquear 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 microgramo/mililitro/péptido) cubriendo la secuencia de M72 (sin los residuos His N-terminales). Se usaron las células que permanecieron 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 citoquinas) y se almacenaron las células durante la noche a 4°C. Posteriormente, se tiñeron las células para determinar los siguientes marcadores: CD4, CD8, IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa.

Resultados

Cada punto de datos en las figuras 9 y 10 representa la respuesta de células-T CD4 o CD8 específicas de M72, respectivamente, restada del fondo, 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 células-T CD4 que producen IFN-gamma y/o IL-2 y/o TNF-alfa en respuesta a la estimulación con el grupo de péptidos de M72. La barra representa la mediana de las respuestas para cada grupo.

Los resultados de las figuras 9 y 10 muestran que se inducen respuestas de células-T CD4 y CD8 comparables 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

células-T inducidas.

Ejemplo 13: Investigación de “desplazamiento salino” en las composiciones que comprenden M72 con CaCl_2 ó MgSO_4 a un pH de 6.1 y 8.0.

5 Para investigar el impacto de otras sales sobre la estabilidad del antígeno de M72, se prepararon soluciones con un intervalo de concentraciones de CaCl_2 ó MgSO_4 y a diferentes niveles de pH. Se empleó inspección visual como una lectura de la estabilidad.

Método

10 El antígeno a granel modificado (M72 con dos residuos His N-terminales, SEQ ID NO: 3) se diluyó hasta una concentración de 100 microgramos/mililitro en dos reguladores diferentes (regulador de succinato 10 mM a un pH de 6.1, y regulador de Tris 10 mM a un pH de 8.0) que contenía las cantidades de sales especificadas (0 mM;
15 NaCl 150 mM ó 300 mM; CaCl_2 40 mM, 80 mM ó 160 mM; MgSO_4 87.5 mM, 175 mM ó 430 mM).

Las muestras se analizaron directamente después de la preparación.

20 Usando un medidor de conductividad Mettler Toledo y 6 mililitros de cada muestra en un frasco de vidrio no siliconizado, se determinó la conductividad.

Resultados

	<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Regulador</u>	<u>pH</u> (teórico)	<u>Conducti- vidad</u> (mS/cm) (medida)	<u>pH</u> (medido)	<u>Obser- vación visual</u>
5	A	0 mM	Succinato 10 mM	6.1	1.1	6.3	Clara
10	B	NaCl 150 mM	Succinato 10 mM	6.1	13.4	6.1	Clara
15	C	NaCl 300 mM	Succinato 10 mM	6.1	20.0	6.1	Clara
	D	CaCl ₂ 40 mM	Succinato 10 mM	6.1	8.0	6.1	Opales- cente
20	E	CaCl ₂ 80 mM	Succinato 10 mM	6.1	11.2	5.8	Opales- cente + partículas grandes
25	F	CaCl ₂	Succinato	6.1	20.2	5.8	Opales-

	<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Regulador</u>	<u>pH</u> (teórico)	<u>Conducti-</u> <u>vidad</u> (mS/cm) (medida)	<u>pH</u> (medido)	<u>Obser-</u> <u>vación</u> <u>visual</u>
5		160 mM	10 mM				cente + partículas grandes
10							
	G	MgSO ₄ 87.5 mM	Succinato 10 mM	6.1	7.7	6.1	Opales- cente
15	H	MgSO ₄ 175 mM	Succinato 10 mM	6.1	12.4	5.9	Opales- cente + partículas muy grandes
20	I	MgSO ₄ 430 mM	Succinato 10 mM	6.1	20.4	5.9	Opales- cente + partículas muy grandes
25							

	<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Regulador</u>	<u>pH</u> (teórico)	<u>Conducti- vidad</u> (mS/cm) (medida)	<u>pH</u> (medido)	<u>Obser- vación visual</u>
5							
	J	0 mM	Tris 10 mM	8.0	0.463	8.0	Clara
10	K	NaCl 150 mM	Tris 10 mM	8.0	12.13	8.0	Clara
	L	NaCl 300 mM	Tris 10 mM	8.0	21.1	8.0	Clara
15							
	M	CaCl ₂ 40 mM	Tris 10 mM	8.0	6.7	8.1	Partículas grandes
20	N	CaCl ₂ 80 mM	Tris 10 mM	8.0	10.8	8.0	Opales- cente + partículas grandes
25	O	CaCl ₂	Tris	8.0	19.7	8.0	Opales-

	<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Regulador</u>	<u>pH</u> <u>(teórico)</u>	<u>Conducti-</u> <u>vidad</u> <u>(mS/cm)</u> <u>(medida)</u>	<u>pH</u> <u>(medido)</u>	<u>Obser-</u> <u>vación</u> <u>visual</u>
5		160 mM	10 mM				cente + partículas grandes
10							
	P	MgSO ₄ 87.5 mM	Tris 10 mM	8.0	7.5	8.0	Partículas grandes
15	Q	MgSO ₄ 175 mM	Tris 10 mM	8.0	10.9	8.2	Opales- cente + partículas muy grandes
20							

5

10

<u>Grupo</u>	<u>Sal</u>	<u>Regulador</u>	<u>pH</u> (teórico)	<u>Conducti-</u> <u>vidad</u> (mS/cm)	<u>pH</u> (medido)	<u>Obser-</u> <u>vación</u> <u>visual</u>
				(medida)		
R	MgSO ₄ 430 mM	Tris 10 mM	8.0	21.7	8.1	Opales- cente + partículas muy grandes

Los resultados demuestran que las soluciones que contienen un antígeno relacionado con M72 pueden ser sensibles a sales diferentes de cloruro de sodio. El impacto de CaCl₂ ó MgSO₄ parece ser más pronunciado que para el cloruro de sodio en concentraciones o conductividad comparables.

Ejemplo 14: Investigación de “desplazamiento salino” en las composiciones que comprenden Mtb72f con diferentes concentraciones de sal a un pH de 6.1, 7.5 y 8.5.

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

Método

El antígeno a granel modificado (Mtb72f con 6 residuos His,

SEQ ID NO: 7) se diluyó hasta una concentración de 100 micro-gramos/mililitro en tres reguladores diferentes (regulador de fosfato 10 mM a un pH de 6.1, regulador de Tris 20 mM a un pH de 7.5, y regulador de Tris 20 mM a un pH de 8.5) que contenía
5 concentraciones finales de cloruro de sodio de 0, 150 y 450 mM.

Las muestras se almacenaron durante 24 horas a 4°C o a 25°C antes del análisis.

La nefelometría se llevó a cabo utilizando un Nepheloskan® Ascent, disponible en Thermo Fischer Scientific. El análisis se llevó
10 a cabo en micro-placas Costar® transparentes a UV disponibles en Corning Inc (EUA).

La DLS se llevó a cabo utilizando un lector de placas Dynapro de Wyatt Instruments. El instrumento se operó utilizando una longitud de onda de láser de 830 nanómetros, y una potencia de
15 50 mW. Se detectó luz dispersada a 150° a una temperatura de 22°C. El diámetro hidrodinámico promedio y el índice de polidispersidad (PI) se calculan mediante el software del instrumento.

Resultados

Los hallazgos de este experimento se presentan en las figuras
20 11 y 12.

Tanto la DLS como la nefelometría demuestran una tendencia general a que el Mtb72f sea sensible a la concentración de sal y al pH, de una manera similar al M72, como se muestra en los ejemplos anteriores. En consecuencia, los beneficios de la presente invención
25 se aplican a los antígenos relacionados con M72 y no solamente a la

secuencia de M72 por sí misma.

En el caso de un número de muestras de DLS, la instrumentación fue incapaz de determinar un tamaño de partícula específico (mostrado como NV en la Figura 12).

5 **Ejemplo 15: Prevención de “desplazamiento salino” en las composiciones que comprenden M72, inmunoestimulantes, y utilizando sorbitol como un agente de tonicidad**

Con el objeto de comparar la estabilidad de las composiciones inmunogénicas que contenían NaCl 150 mM, con las composiciones
10 utilizando sorbitol como un agente de tonicidad, las muestras se monitorearon utilizando un ELISA alternativo.

Método

La torta de la liofilización se preparó como se describe en el Ejemplo 10 (específicamente el método (a)), de tal manera que,
15 cuando se combinara con las formulaciones coadyuvantes apropiadas del Ejemplo 7, se obtendría un pH de 8.5.

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

(vii) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (NaCl 150 mM – 2) pH de 8.5

10 microgramos de antígeno (20 microgramos/mililitro)

25 Sacarosa al 5 % p/v

- Tris 40 mM
- Tween80 al 0.02 % p/v
- 500 microgramos de DOPC
- 125 microgramos de colesterol
- 5 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- NaCl 150 mM
- Fosfato 10 mM
- pH de 8.5
- 10 (viii) M72 con dos residuos His N-terminales – ASA (sorbitol – 2) pH de 8.5
- 10 microgramos de antígeno (20 microgramos/mililitro)
- Sacarosa al 5 % p/v
- Tris 40 mM
- 15 Tween80 al 0.02 % p/v
- 500 microgramos de DOPC
- 125 microgramos de colesterol
- 25 microgramos de 3D-MPL
- 25 microgramos de QS21
- 20 NaCl 5 mM
- Sorbitol al 4.7 % p/v
- Fosfato 10 mM
- pH de 8.5
- Las composiciones inmunogénicas reconstituidas descritas
- 25 anteriormente se caracterizaron después de su almacenamiento a

30°C (T24h), y comparándose con una muestra extemporáneamente preparada (T0).

La antigenicidad se cuantificó mediante un ELISA de emparejado indirecto en donde el antígeno es capturado por un anticuerpo policlonal de conejo específico de M72 y subsiguientemente es revelado por un anticuerpo monoclonal de ratón específico de M72(Mtb39). Dicho de una manera breve, la placa se recubrió con anticuerpo policlonal de conejo anti-M72 en una dilución de 1/8,000 en suero regulado con fosfato de Dulbecco durante la noche a 4°C y, después de cuatro lavados, las placas se bloquearon durante 1 hora a 37°C con regulador de saturación (suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.1 por ciento, albúmina de suero bovino (BSA) al 1 por ciento). Después del paso de lavado, se cargaron el estándar de proteína (masa purificada de M72: 1,950 microgramos/mililitro), el control interno (M72: 1,768 microgramos/mililitro), y las muestras, en los pozos de la primera columna de la placa en una concentración de aproximadamente 0.25 microgramos/mililitro, y entonces se llevó a cabo una dilución en serie 2 veces en el regulador de saturación (suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.025 por ciento) del pozo 1 al 12, y se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Después del paso de lavado, el inmunocomplejo se incubó entonces durante 1 hora a 37°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-M72 en una dilución de 1/1,000 en regulador de saturación (suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.025 por ciento). Después de cuatro lavados, un anticuerpo policlonal de

conejo anti-ratón biotinilado se agregó en una dilución de 1/1,000 en regulador de saturación (suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.025 por ciento). Después de cuatro lavados, la señal se amplificó mediante la adición de estreptavidina-peroxidasa de radícula roja diluida a 1/4,000 en regulador de saturación (suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.025 por ciento). Después de cuatro lavados, la señal se reveló mediante dicloruro de orto-fenilen-diamina (OPDA) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1M. La coloración fue proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-M72 enlazado, y se midió a 490 nanómetros y 620 nanómetros. Todos los pasos de lavado se llevaron a cabo utilizando suero regulado con fosfato (PBS), Tween 20 al 0.025 por ciento.

Todos los valores medidos se presentan en relación con la antigenicidad esperada basándose en la proteína a granel purificada utilizada para preparar las formulaciones sometidas a prueba.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 13. Los rombos indican las mediciones específicas para cada una de las tres muestras de prueba, con indicando una línea el valor promedio.

La recuperación del antígeno es en gran parte estable después de la reconstitución en las composiciones bajas en sal utilizando sorbitol como un agente de tonicidad a un pH de 8.5 hasta 24 horas a 30°C. La recuperación en ASA(sorbitol-2) fue del 83.5 por ciento después de 24 horas (T0 87.1 por ciento, que significa que se

mantuvo el 95.9 por ciento de la antigenicidad relativa), mientras que la recuperación en ASA(NaCl-2) fue del 54.5 por ciento después de 24 horas (T0 81.0 por ciento, que significa que se mantuvo solamente el 67.3 por ciento de la antigenicidad relativa después del almacenamiento).

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

La reformulación de las composiciones inmunogénicas con un agente de tonicidad no iónico resuelve los problemas de estabilidad del antígeno. Adicionalmente, los Ejemplos 3, 4 y 12 demuestran la remoción de sustancialmente todo el NaCl a partir de la formulación inmunogénica, y su reemplazo con sorbitol como un agente de tonicidad no tiene un impacto perjudicial sobre la estimulación de respuestas de células-T.

La estabilidad de las composiciones inmunogénicas es clave y puede ser particularmente desafiante cuando se encuentran en lugares aislados y puede no ser fácilmente accesible la refrigeración. Mediante la reducción de la presencia de sales en las composiciones

inmunogénicas, los presentes inventores han sido capaces de reducir el grado de los cambios observados cuando se almacenan las composiciones inmunogénicas.

5 A través de toda la memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se entenderá que la palabra 'comprenden', y las variaciones tales como 'comprende' y 'comprendiendo', implican la inclusión de un entero, paso, grupo de entero o grupo de pasos mencionado, pero no con la exclusión de cualquier otro entero, paso, grupo de enteros
10 o grupo de pasos.

Todos los documentos referidos en la presente, incluyendo las patentes y solicitudes de patente, se incorporan como referencia en su totalidad.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno relacionado con M72, en la que:

5 (i) la conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor; y/o

(ii) la concentración de sales en dicha composición es de 130 mM o menor; y/o

10 (iii) la concentración de cloruro de sodio en dicha composición es de 130 mM o menor.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la conductividad de la composición es de 10 mS/cm o menor.

15 3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la conductividad de la composición es de 3 mS/cm o menor.

4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 100 mM o menor.

20 5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la concentración de sales en dicha composición es de 40 mM o menor.

25 6. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la concentración de cloruro de sodio en dicha composición es de 100 mM o menor.

7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la concentración de cloruro de sodio en dicha composición es de 40 mM o menor.

5 8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración de CaCl_2 en la composición inmunogénica es de 30 mM o menor.

9. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración de MgSO_4 en la composición inmunogénica es de 60 mM o menor.

10 10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la concentración total de iones de NH_4^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} es de 40 mM o menor.

11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, la cual comprende además
15 un agente de tonicidad no iónico.

12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el agente de tonicidad no iónico es un poliol.

13. La composición inmunogénica de acuerdo con la
20 reivindicación 12, en la que el poliol es sorbitol.

14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la concentración de sorbitol es de entre aproximadamente un 4 y aproximadamente un 6 % (p/v).

15. La composición inmunogénica de acuerdo con una
25 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la concentración

de sacarosa es de entre aproximadamente un 4 y aproximadamente un 6 % (p/v).

16. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, la cual comprende además
5 uno o más inmunoestimulantes.

17. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el inmunoestimulante es una saponina y/o un agonista de TLR4.

18. La composición inmunogénica de acuerdo con la
10 reivindicación 17, en la que el/los inmunoestimulante(s) está(n) en la forma de liposomas.

19. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, en la que la saponina es QS21.

20. La composición inmunogénica de acuerdo con una
15 cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la que el agonista de TLR4 es monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado.

21. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en la que la osmolalidad es de 250 a 750 mOsm/kg.

22. La composición inmunogénica de acuerdo con una
20 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que la composición se proporciona como una dosis unitaria de entre 50 microlitros y 1 mililitro.

23. La composición inmunogénica de acuerdo con la
25 reivindicación 22, en la que la dosis unitaria es de entre 100

microlitros y 750 microlitros.

24. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 22 ó 23, en la que una dosis unitaria contiene de 1 a 100 microgramos de proteína relacionada con M72.

5 25. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 24, en la que una dosis unitaria contiene de 5 a 50 microgramos de proteína relacionada con M72.

26. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en la que el pH de dicha
10 composición está en el intervalo de 7.0 a 9.0.

27. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

15 28. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 27, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

29. La composición inmunogénica de acuerdo con la
20 reivindicación 28, 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.

30. La composición inmunogénica de acuerdo con la
reivindicación 29, en la que el antígeno relacionado con M72
25 consiste en una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad

con la SEQ ID NO: 1.

31. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende la secuencia de aminoácidos de la
5 SEQ ID NO: 1.

32. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que el antígeno relacionado con M72 comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID NO: 3.

10 33. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 31, en la que el antígeno relacionado con M72 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

34. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 32, en la que el antígeno relacionado con M72
15 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

35. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en la que al menos un 80 % de la antigenicidad de la composición inmunogénica permanece después del almacenamiento a 25°C durante un periodo de 24 horas.

20 36. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, para su uso en medicina.

37. El uso de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en la elaboración de un medicamento.

25 38. Un método para la profilaxis, el tratamiento o la mejora

de infección por micobacterias, tal como infección por *Mycobacterium tuberculosis*, el cual comprende la administración de una cantidad segura y eficaz de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

5 39. Un proceso para la elaboración de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, el cual comprende las etapas de:

- a) liofilizar un antígeno relacionado con M72; y
- b) reconstituir el antígeno relacionado con M72

10 liofilizado de la etapa a) con una solución acuosa, en la que:

(i) la conductividad de la solución es de 13 mS/cm o menor; y/o

(ii) la concentración de sales en dicha solución es de 130 mM o menor; y/o

15 (iii) la concentración de cloruro de sodio en dicha solución es de 130 mM o menor.

40. Un método para la elaboración de una composición inmunogénica estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, el cual comprende las etapas de:

- 20 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:

(i) la conductividad de la solución es de 13 mS/cm o menor; y/o

25 (ii) la concentración de sales en dicha solución

es de 130 mM o menor; y/o

(iii) la concentración de cloruro de sodio en dicha solución es de 130 mM o menor;

5 en la que permanece al menos un 80 % de la antigenicidad de la composición inmunogénica después del almacenamiento a 25°C durante un periodo de 24 horas.

41. Un kit que comprende:

a) un antígeno relacionado con M72 liofilizado; y

b) una solución acuosa en la que:

10 (i) la conductividad de la solución es de 13 mS/cm o menor; y/o

(ii) la concentración de sales en dicha solución es de 130 mM o menor; y/o

15 (iii) la concentración de cloruro de sodio en dicha solución es de 130 mM o menor.

42. El proceso de acuerdo con la reivindicación 39, el método de acuerdo con la reivindicación 40, o el kit de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la solución acuosa comprende un inmunoestimulante.

20 43. El proceso, método o kit de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la solución acuosa comprende una saponina y un agonista de TLR4, en una formulación liposomal, y un agente de tonicidad no iónico.

25 44. El proceso, método o kit de acuerdo con la reivindicación 43, en donde el agente de tonicidad no iónico es un sorbitol.

45. El proceso, método o kit de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la concentración de sorbitol es de entre aproximadamente un 2.5 y aproximadamente un 15 % (p/v).

46. El proceso, método o kit de acuerdo con una cualquiera
5 de las reivindicaciones 43 a 45, en donde la saponina es QS21.

47. El proceso, método o kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, en donde el agonista de TLR4 es monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado.

10

15

20

25

Sheet No

Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(I) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii)). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to international application No. **PCT/EP2011/072816**

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

- GlaxoSmithKline Biologicals s.a. is entitled as employer of the inventor(s) **Stéphane André Georges GODART, Amina LAANAN and Dominique Ingrid LEMOINE**

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 19-06-2013 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/422,723 14-12-10 US	(51) Int Cl: A61K 39/04 (71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (72) Inventor(es): GODART, Stephane Andre Georges; LAANAN, Amina y LEMOINE, Dominique Ingrid. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-07-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-11 No. de solicitud: PCT/EP2011/072816	(87) Publicación internacional Fecha: 21-06-12 No. publicación: WO 2012/080369 A1
(54) Título: “COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA”	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en donde la conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor, o la concentración de sales de la composición es de 130 mM o menor, y su uso en medicina.

Sector: Industria farmacéutica, en particular preparaciones medicinales que comprenden antígenos bacterianos, específicamente antígenos de *Mycobacterium*, métodos de obtener dichas composiciones y kits que las incluyen.

FIG. 1

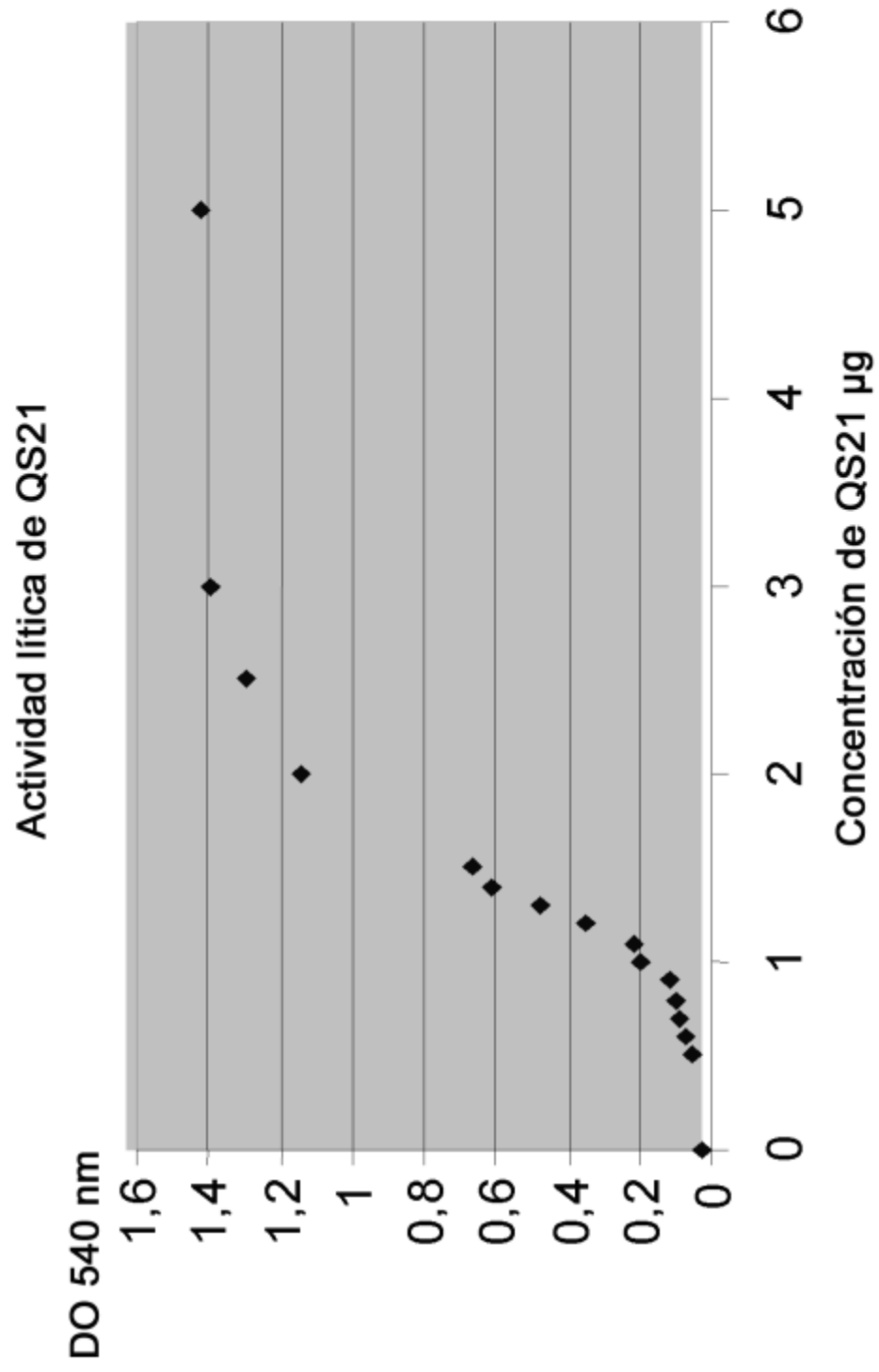


FIG. 2

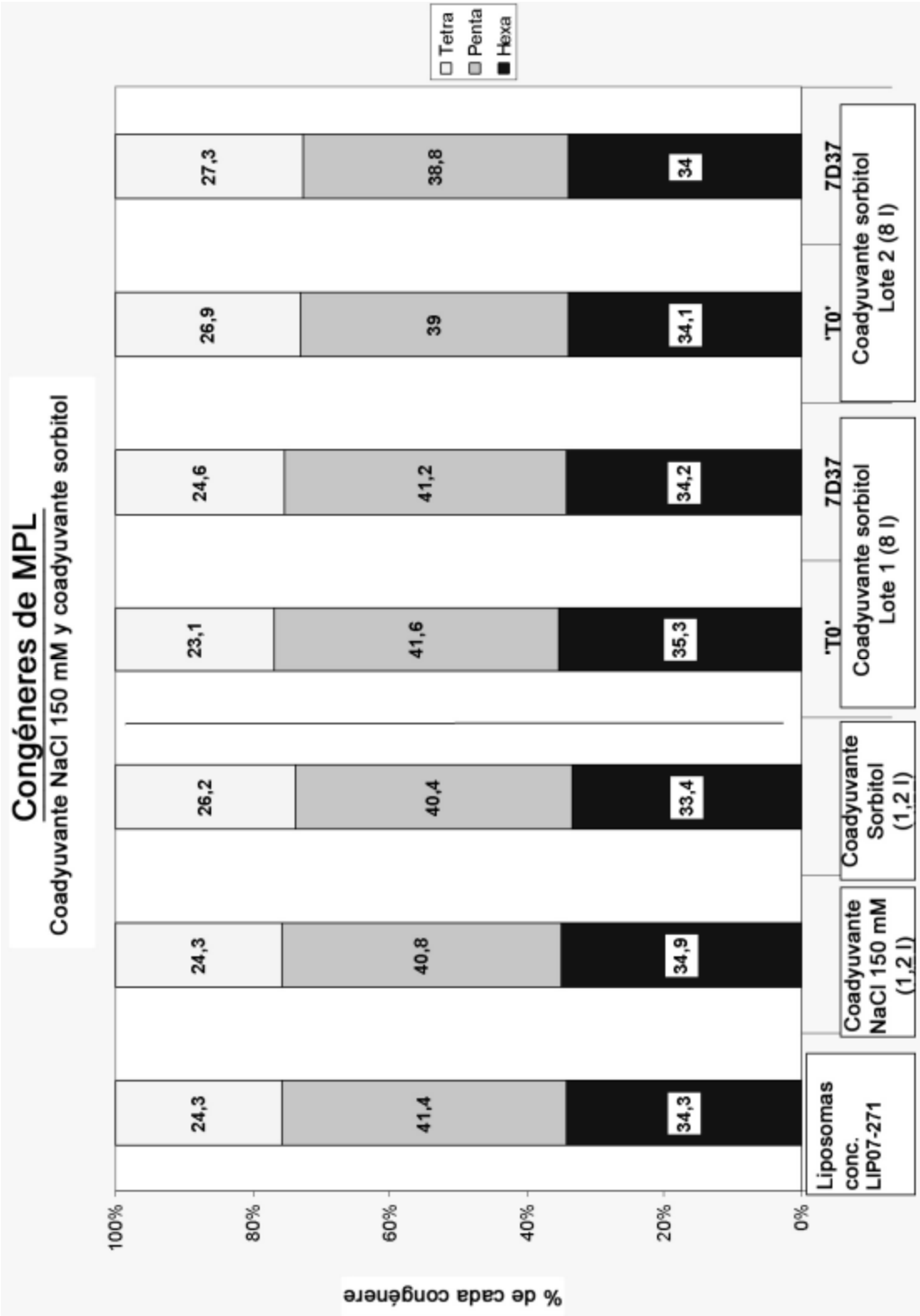


FIG. 3

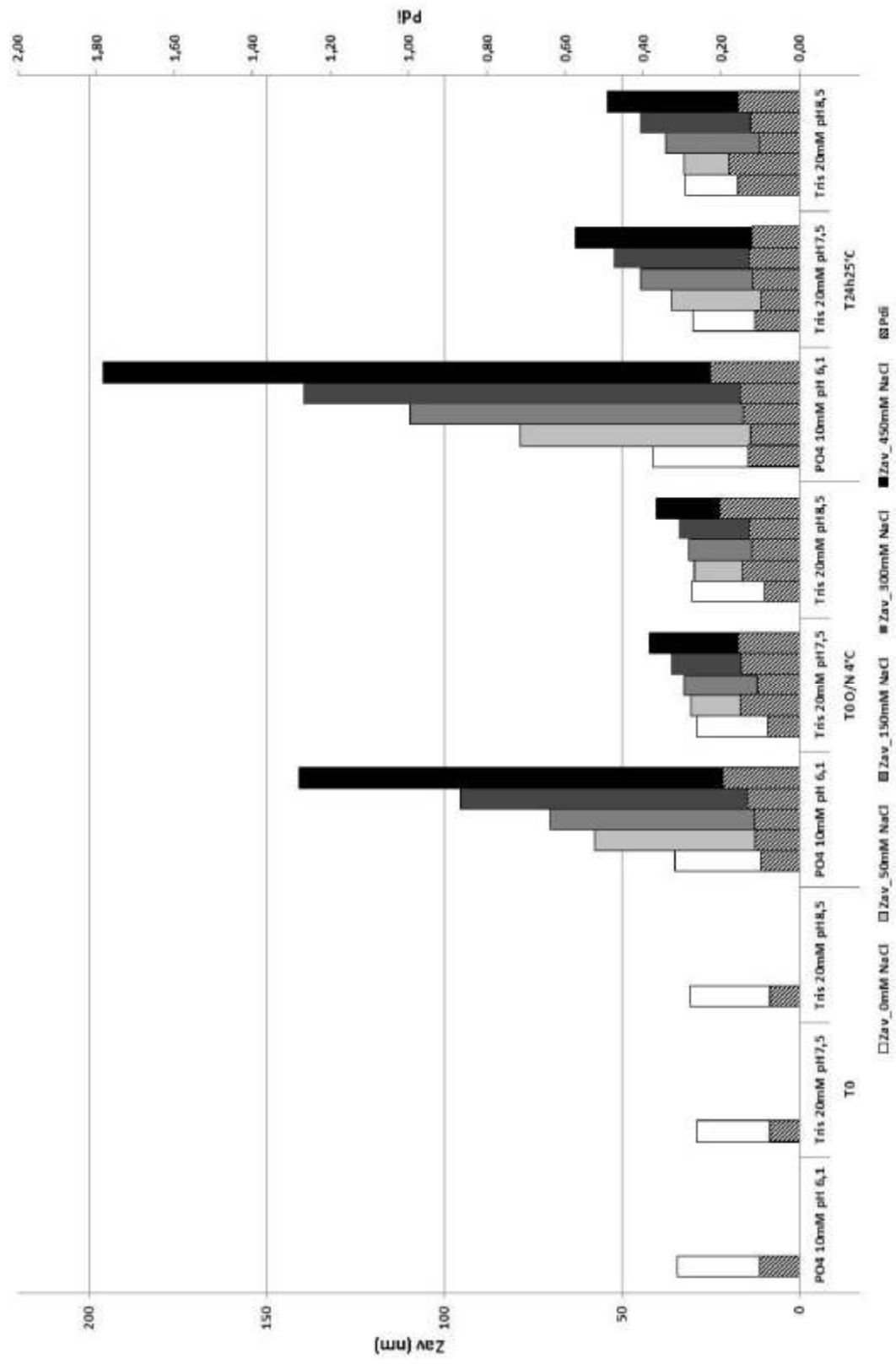


FIG. 4

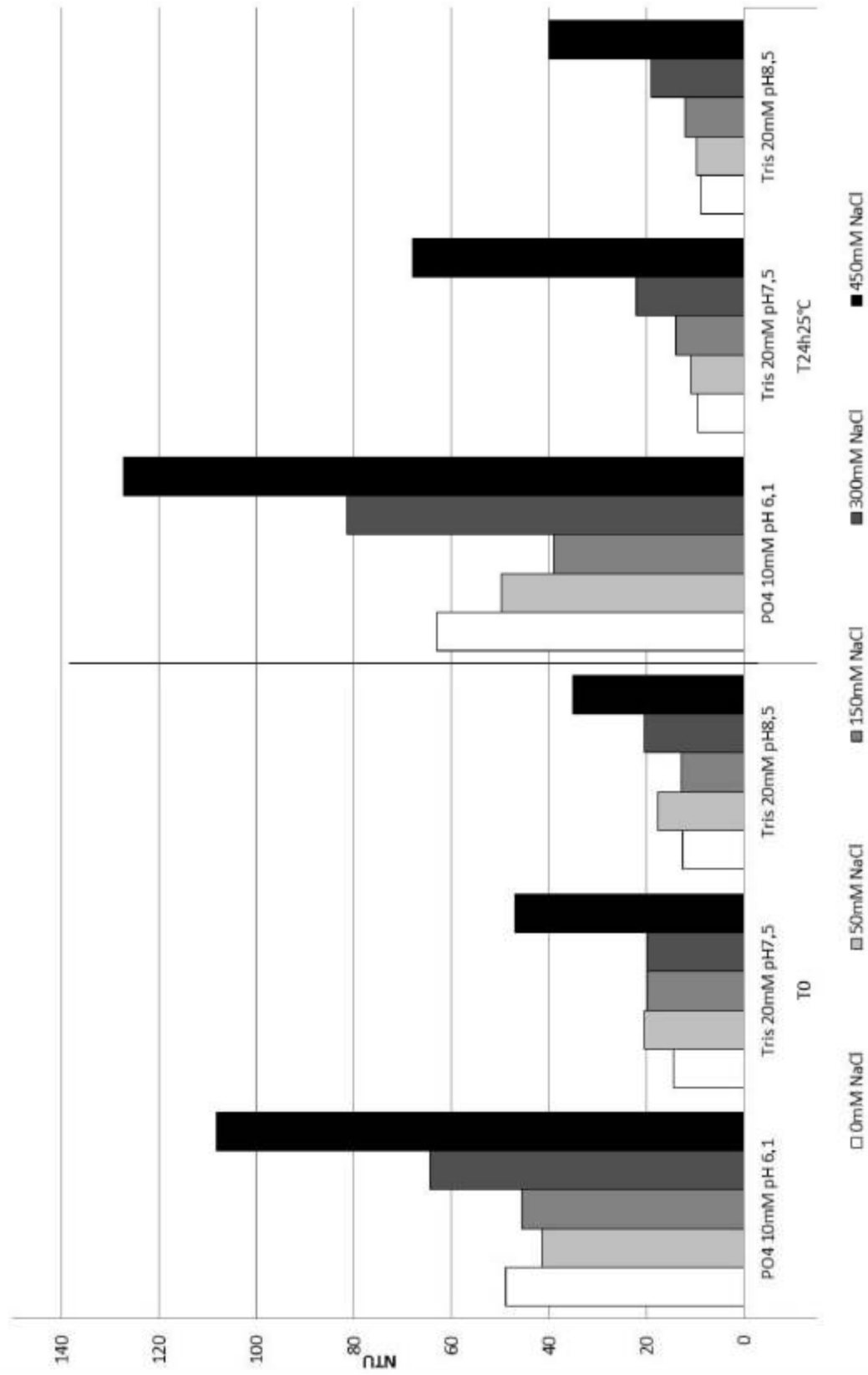


FIG. 5

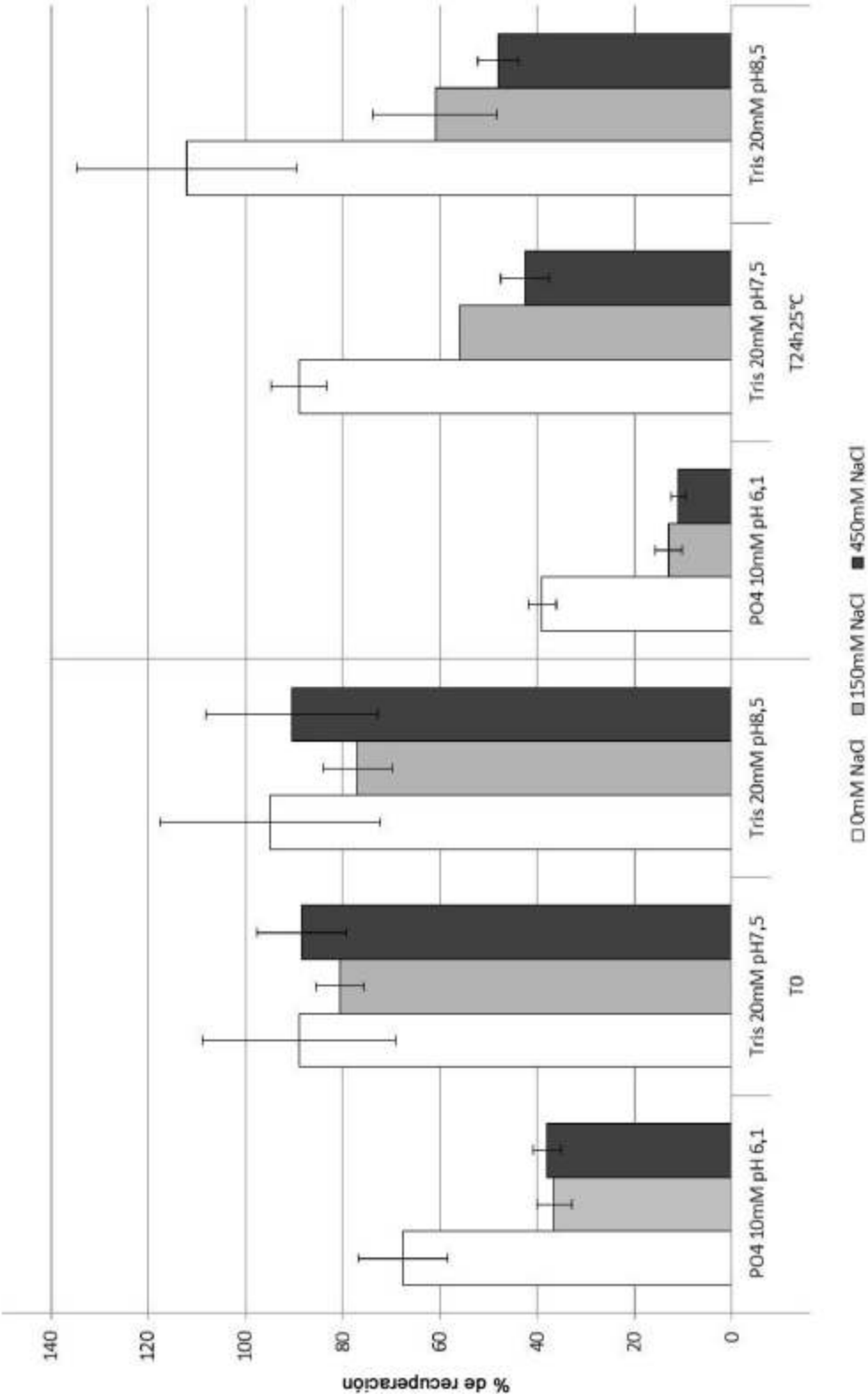


FIG. 6a

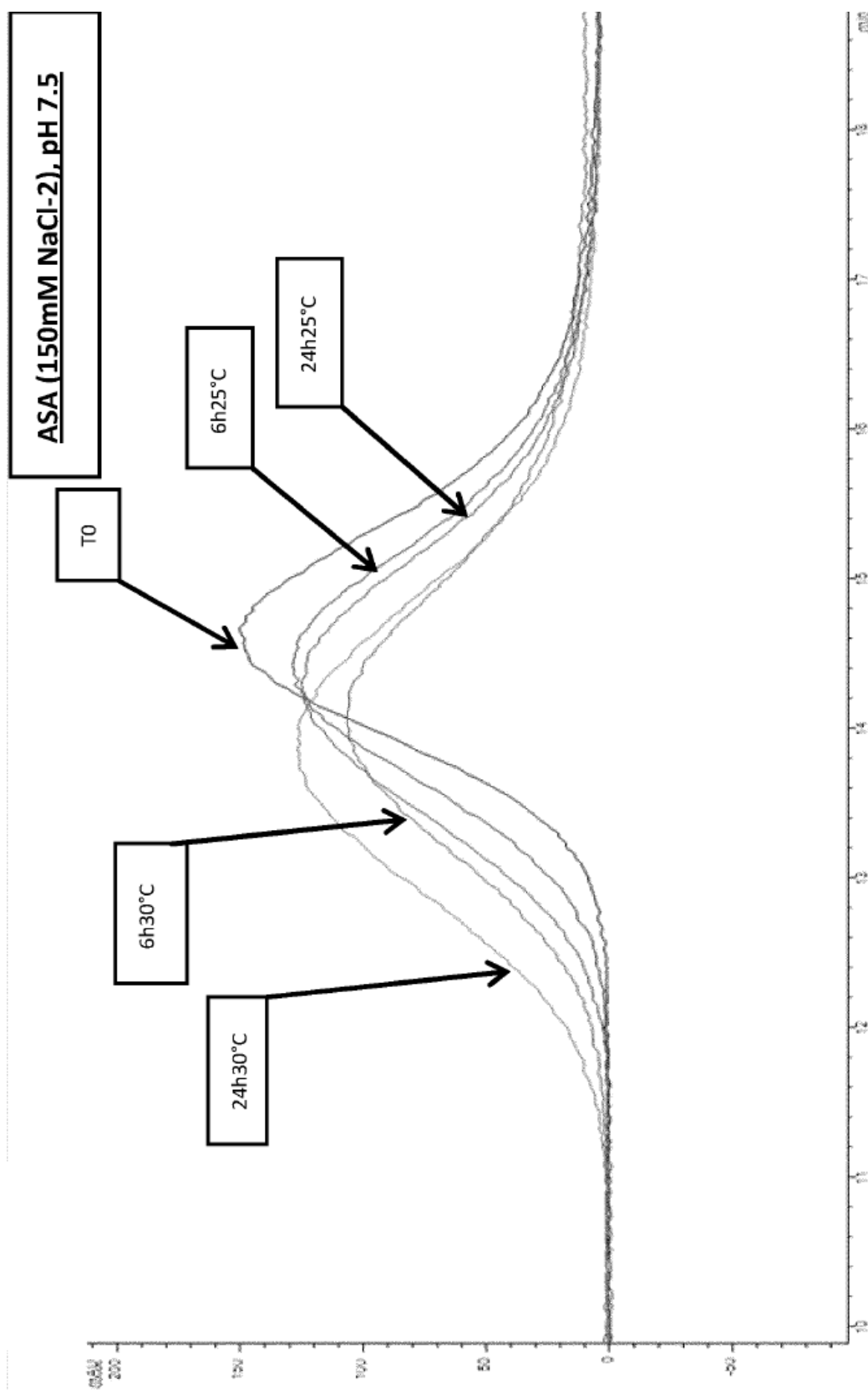


FIG. 6b

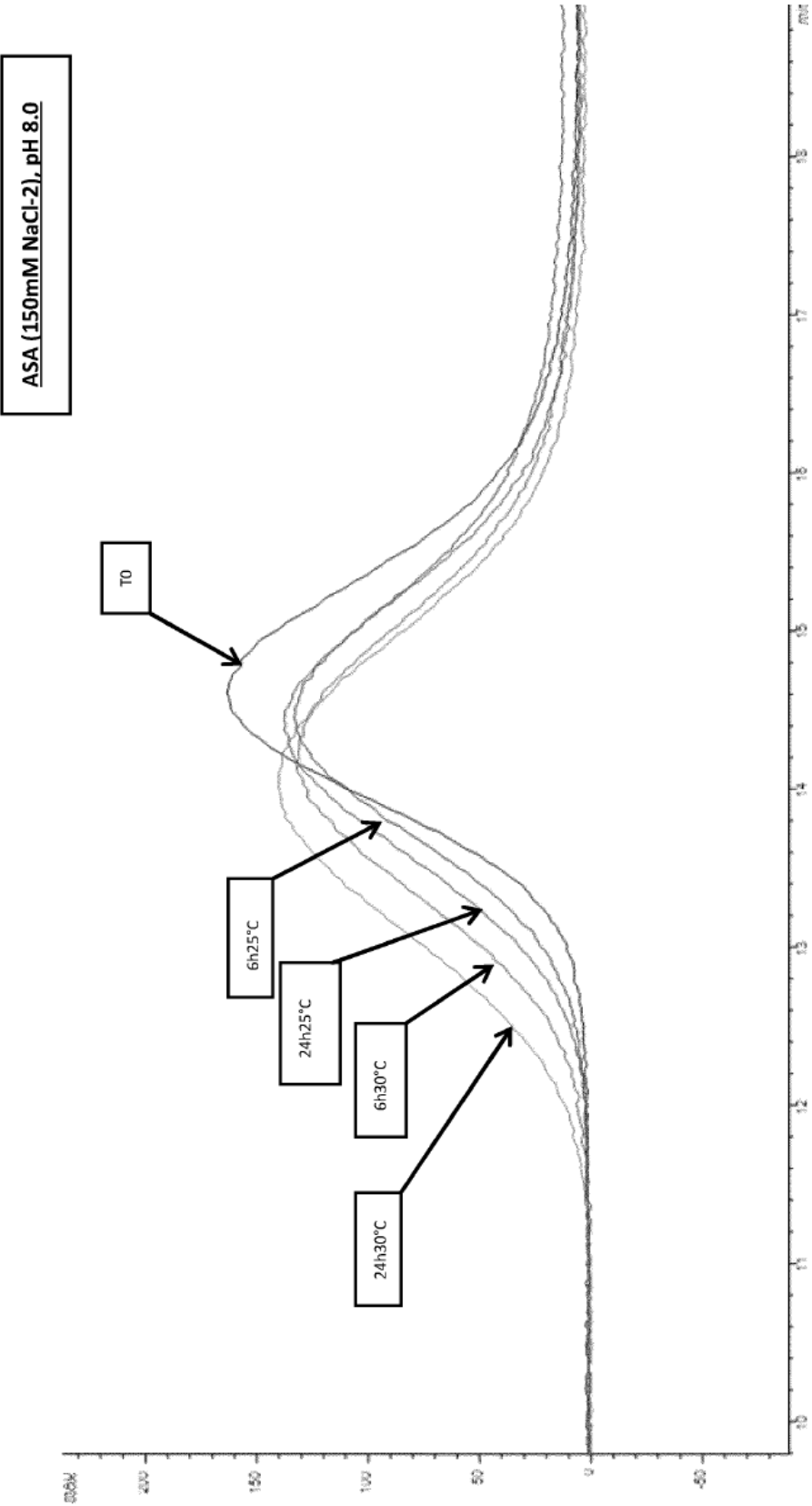


FIG. 6c

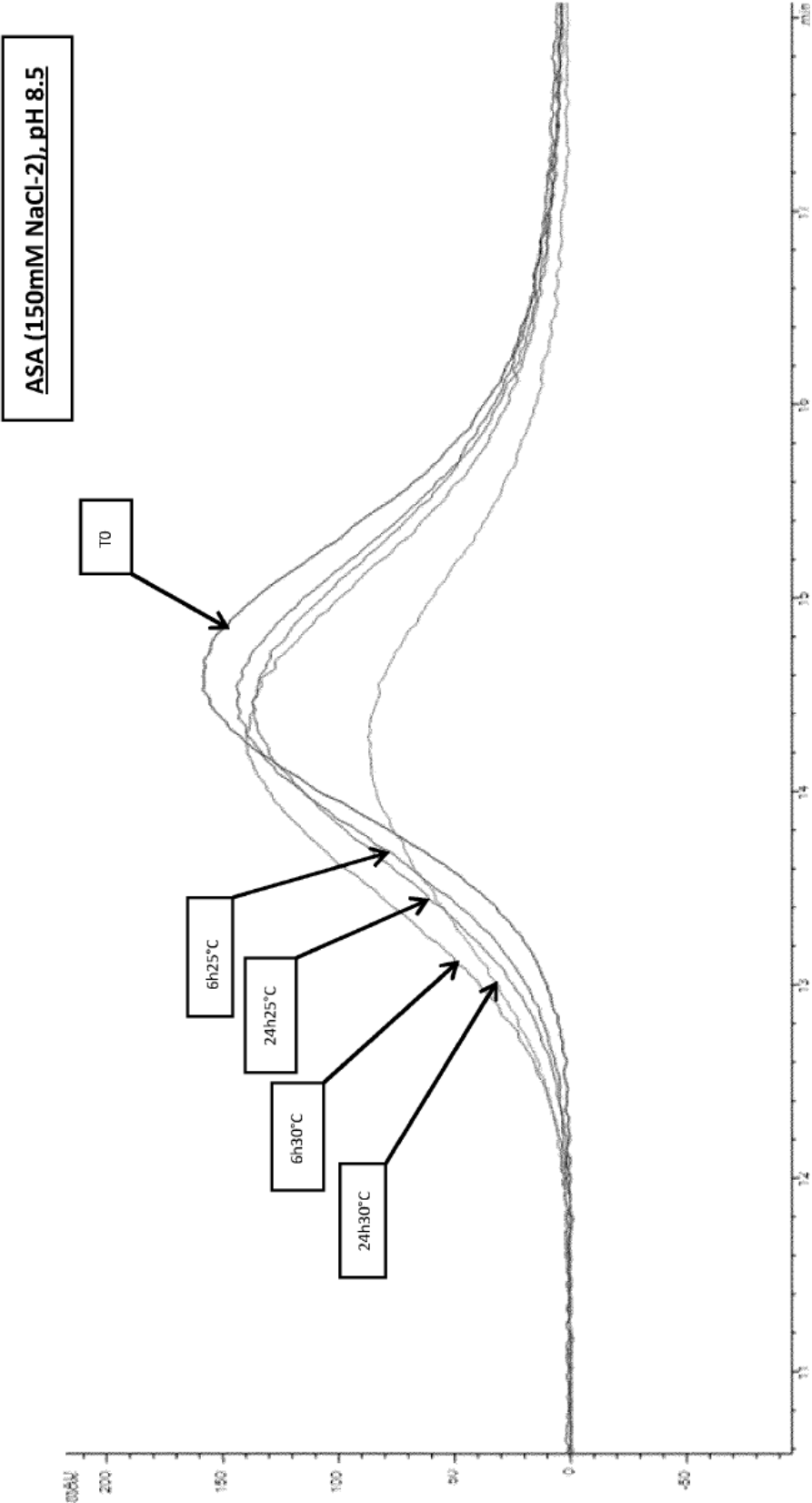


FIG. 6d

ASA (Sorbitol-2), pH 7.5, 8.0 y 8.5 superpuestos

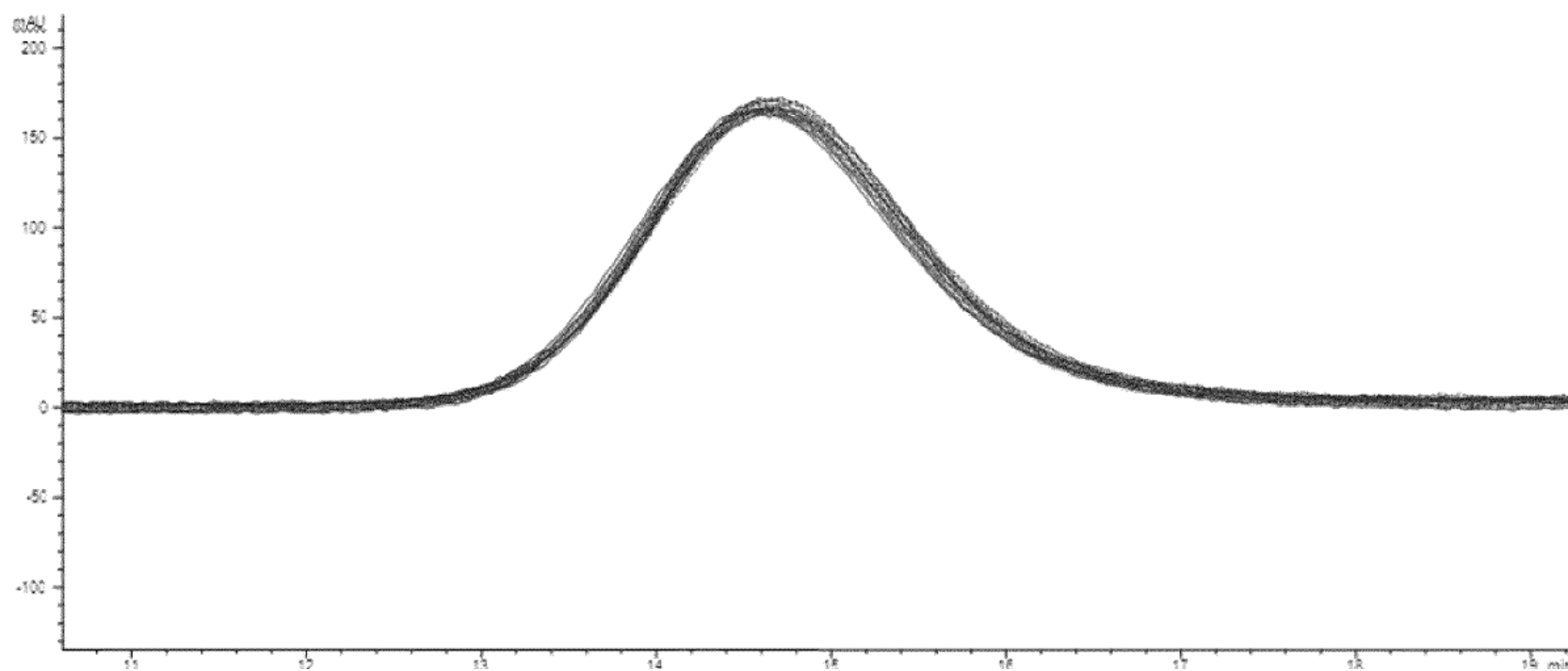


FIG. 7

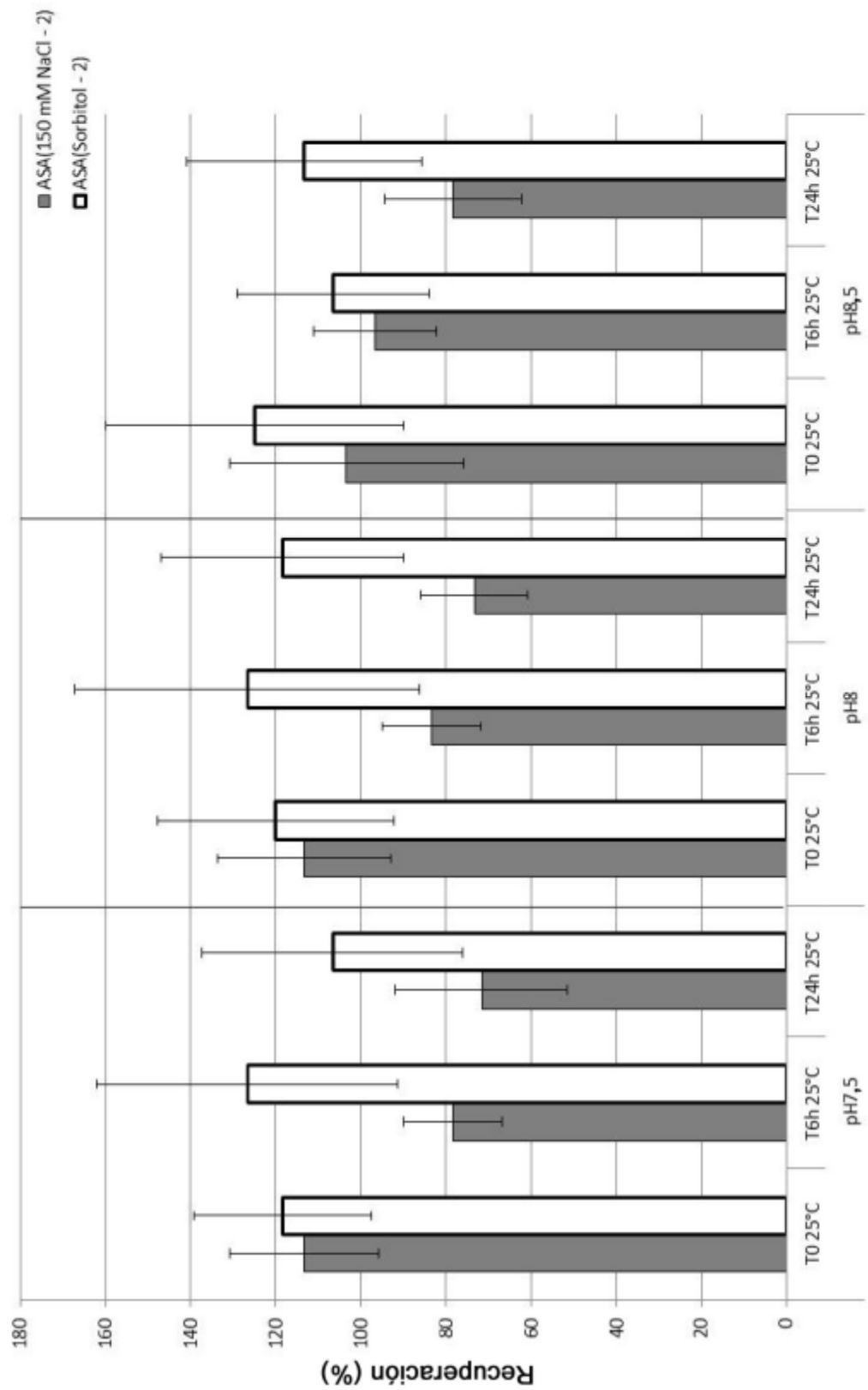


FIG. 8

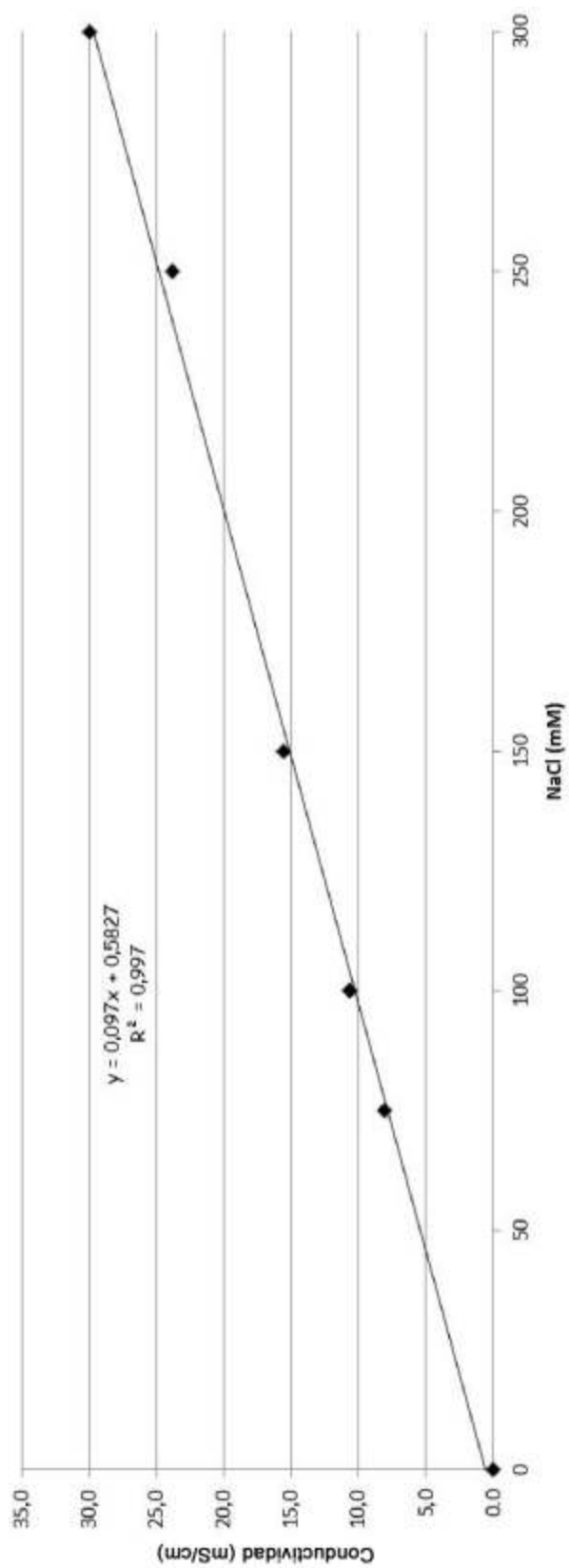


FIG. 9
Respuestas de células-T CD4 específicas de M72

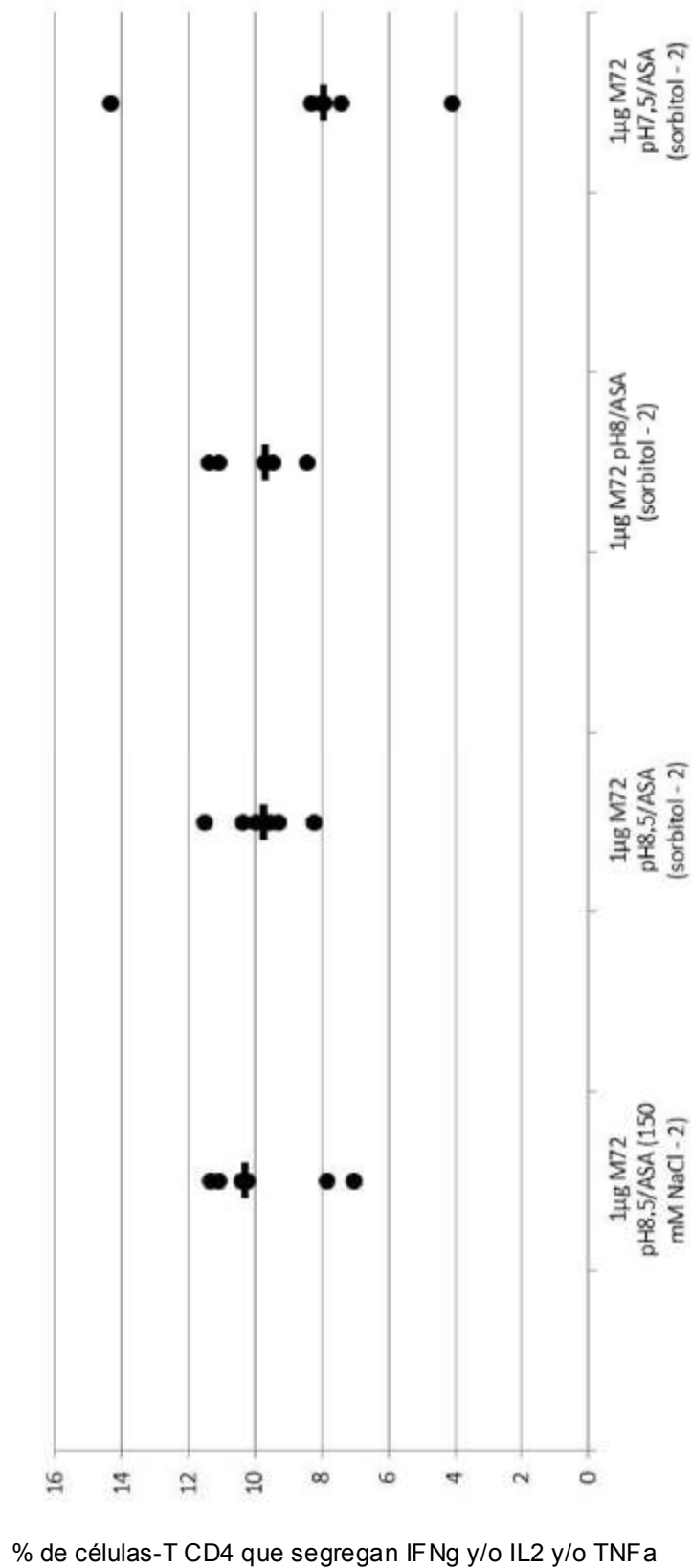


FIG. 10
Respuestas de células-T CD8 específicas de M72

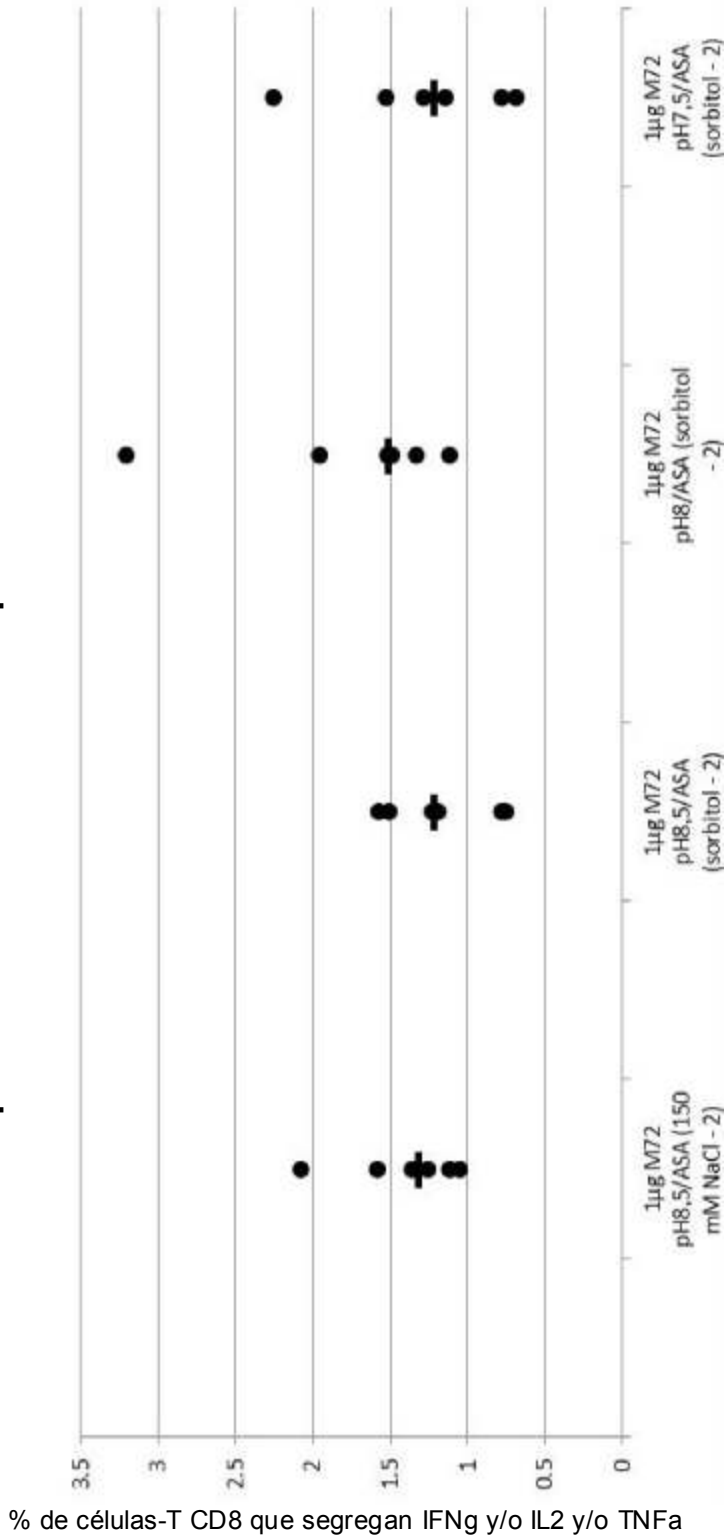


FIG. 11

Nefelometría de Mtb72f

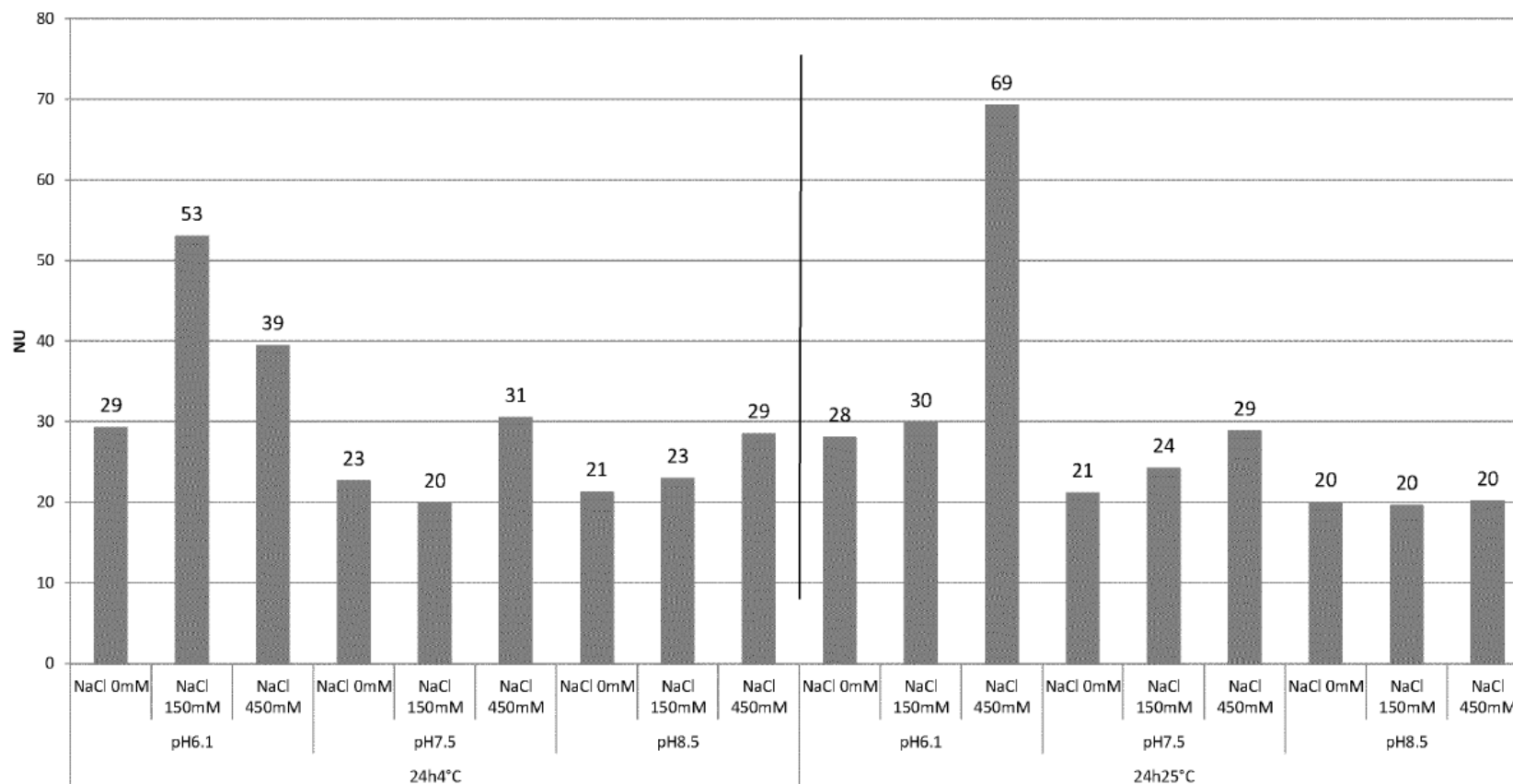


FIG. 12

Tamaño de Mtb72f mediante DLS

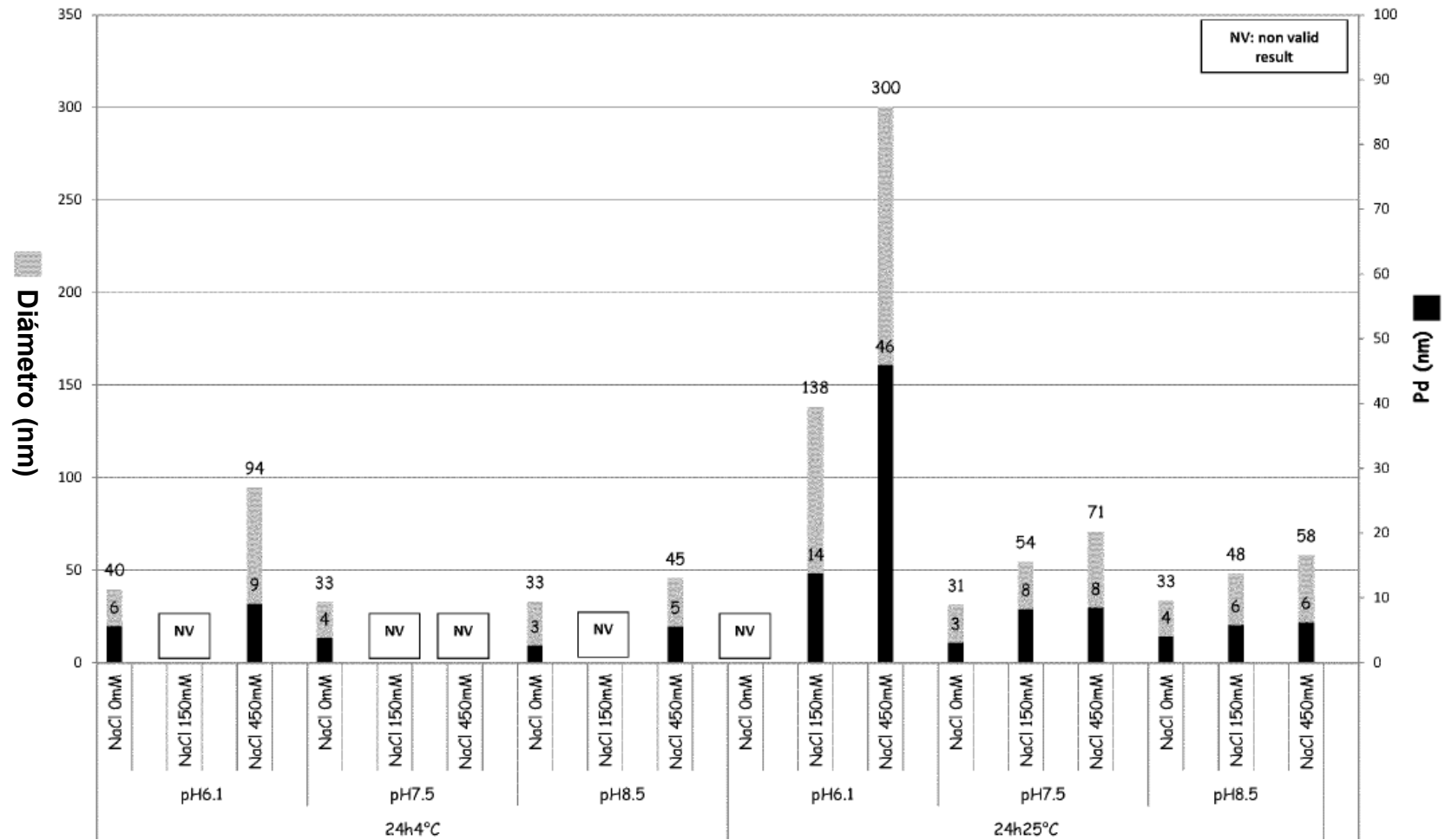
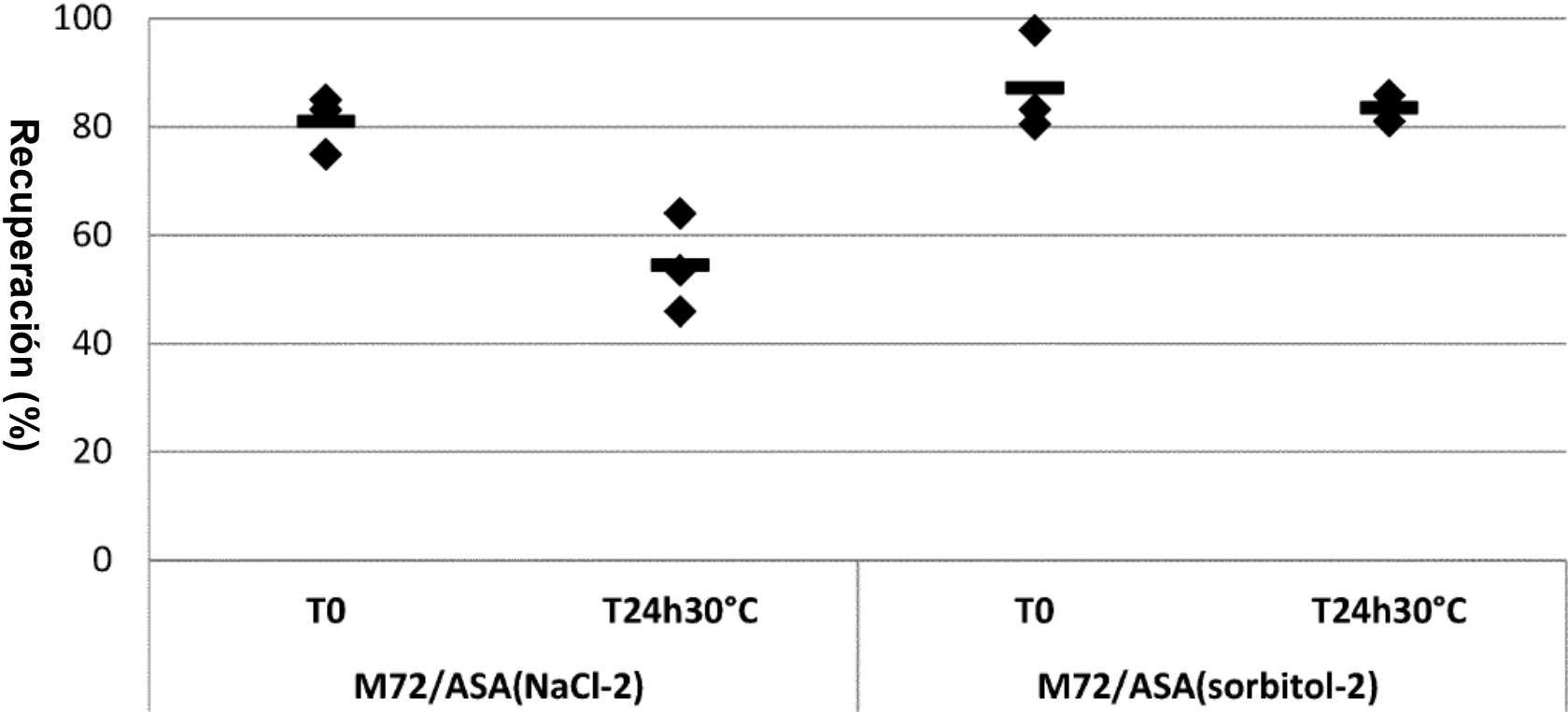


FIG. 13

ELISA de Antigenicidad Anti-M72



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa
Godart, Stephane
5 Laanan, Amina
Lemoine, Dominique
<120> Composiciones Novedosas
<130> VB64442
<150> US61/422723
10 <151> 2010-12-14
<160> 13
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 723
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteína de fusión de M72
<400> 1
20 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
25 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
5	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			
10	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
15	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				
20	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
25	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
 5 260 265 270
 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
 10 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
 15 340 345 350
 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
 20 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
 25 420 425 430

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
 5 450 455 460
 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
 10 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
 15 530 535 540
 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
 20 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
 25 610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly

625 630 635 640

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

645 650 655

5 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

10 690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr

705 710 715 720

Ala Ala Ser

15 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 2172

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

20 <223> Secuencia de codificación para fusión de M72

 $\langle 400 \rangle$ 2

atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccagggtg ggcagggatt cgccattccg 60

atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccgtt 120

catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgttgctg acaacaacgg caacggcgca 180

25 cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240

	gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcggcca ccgcatggc ggacgcgctt	300
	aacgggcatc atcccgtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg	360
	cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga cccccggccg aattcatggt ggatttcggg	420
	gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccggttc ggcctcgctg	480
5	gtggccgcgg ctcatatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg	540
	tttcagtcgg tggctctggg tctgacggtg gggctgtgga taggttcgtc ggcgggtctg	600
	atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag	660
	ctgaccgccg ccaggtccg ggttgctgcg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg	720
	gtgccccgc cggtgatcgc cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac	780
10	ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg	840
	gccaagacg ccgccgcgat gtttggtac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg	900
	ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc	960
	gccgcggtcg aggaggctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc	1020
	caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgcttcttc caagctgggt	1080
15	ggcctgtgga agacggtctc gccgcacgg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc	1140
	aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg	1200
	ttgaagggct ttgctccggc ggcgccgcc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg	1260
	gtccggggcga tgagctcgt gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cggtggggtg	1320
	gccgccaact tgggtcgggc ggctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcttgggccc	1380
20	gcggccaacc aggagtcac ccggcgggcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc	1440
	gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cggtggggca gatgggcgcc	1500
	agggccggtg gtgggctcag tgggtgtgctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg	1560
	cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac	1620
	ttccccgcgc tgcccctcga cccgtccgcg atggtcggcc aagtggggcc acaggtggtc	1680
25	aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc	1740

	gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat	1800
	gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc	1860
	caggatgtcg cgggtctgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcgg	1920
	ggcggcgtcg cggttgggta gcccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga	1980
5	acgccccgtg cgggtgcctgg caggggtggc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat	2040
	tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag	2100
	cccggatgatg cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg	2160
	gccgcgtcct ag	2172
	<210> 3	
10	<211> 725	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> M72 fusión con 2 residuos His adicionales	
15	<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	
20	Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala	
	35 40 45	
	Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val	
	50 55 60	
	Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr	
25	65 70 75 80	

5	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
10	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			
15	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
20	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			
25	Leu	Thr	Val	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Leu	Met
	245				250				255							
	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gln	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala
	260				265				270							

Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
 275 280 285
 Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu
 5 290 295 300
 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
 10 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
 15 370 375 380
 His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser
 385 390 395 400
 Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln
 405 410 415
 20 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
 25 450 455 460

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
 5 485 490 495
 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
 10 Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro
 530 535 540
 Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala
 15 565 570 575
 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
 20 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
 25 645 650 655

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

5 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

10

725

<210> 4

<211> 2178

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

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

<400> 4

atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60

20

attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120

accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180

ggcgcacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240

ggcgacgtga tcaccgcgt cgacggcgt cggatcaact cggccaccgc gatggcggac 300

gcgcttaacg ggcacatcc cggtgacgtc atctcgtga cctggcaaac caagtcgggc 360

25

ggcacgcgta caggaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420

	ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc	480
	tcgctggtgg ccgcggctca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg	540
	tcggcgtttc agtcggtggt ctggggctctg acggtgggggt cgtggatagg ttcgtcggcg	600
	ggtctgatgg tggcggcggc ctcgccgtat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag	660
5	gccgagctga ccgccgcca ggtccggggt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg	720
	ctgacggtgc ccccgccggt gatcgccgag aaccgtgctg aactgatgat tctgatatcg	780
	accaacctct tggggcaaaa cccccggcg atcgcggtca acgaggccga atacggcgag	840
	atgtggggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg	900
	gcgacgttgc tgccgttcga ggaggcgccg gagatgacca gcgcgggtgg gtcctcag	960
10	caggccgccg cggtcgagga ggctccgac accgccgcgg cgaaccagtt gatgaacaat	1020
	gtgccccagg cgctgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag	1080
	ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgccg catcggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg	1140
	atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc	1200
	tcgatgttga agggctttgc tccggcgggc gccgccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa	1260
15	aacggggtcc gggcgatgag ctgctgggc agctcgctgg gttcttcggg tctgggcggt	1320
	ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttgctcgtt gccgcaggcc	1380
	tgggccgcgg ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgctgccgct gaccagcctg	1440
	accagcgccg cggaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg	1500
	ggcgccaggg ccggtggtgg gtcagtggt gtgctgcgtg ttccgccgcg accctatgtg	1560
20	atgccgcatt ctccggcagc cggcgatatc gccccgccg ccttgctcga ggaccggttc	1620
	gccgaattcc ccgcgtgcc cctcgacccg tccgcgatgg tcgcccaggt ggggccacag	1680
	gtggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacgccg tgggcgccgg gaccggcatc	1740
	gtcatcgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg cgccaccgac	1800
	atcaatgcgt tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac	1860
25	cgcaccagg atgtcgcggt gctgcagctg cgcggtgcc gtggcctgcc gtcggcgggc	1920

atcgggtggcg gcgtcgcggt tggtagagccc gtcgtcgcga tgggcaacag cgggtgggcag 1980
 ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggtcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
 tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccgcg 2100
 atccagccccg gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggatatg 2160
 5 aacacggccg cgtcctag 2178

<210> 5

<211> 723

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de Mtb72f

<400> 5

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 15 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
 20 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
 25 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
5			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	
10	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
15			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		
20	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
25			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
5	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	
10	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
15	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	
20	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
25	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
5					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
10	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Val	Ala	Gln	Val	Gly	Pro	Gln	Val	Val
					545					550						555
	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
15					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
20	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Ala	Ala	Ile	Gly
					625					630						635
	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Val	Ala	Met	Gly	Asn	Ser	Gly
					645					650						655
	Gly	Gln	Gly	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Ala	Leu
25					660					665						670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr

675

680

685

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

690

695

700

5 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

10 <211> 2172

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación para fusión de Mtb72f

15 <400> 6

atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcagggatt cgccattccg 60

atcggggcagg cgatggcgat cgcggggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccgtt 120

catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgttgctg acaacaacgg caacggcgca 180

cgagtccaac gcgtggctcg gagcgtccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240

20 gtgatcaccg cggtcgacgg cgtccgatc aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300

aacgggcatc atcccgtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360

cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga cccccggccg aattcatggt ggatttcggg 420

gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccgggttc ggctctgctg 480

gtggccgcgg ctcatatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540

25 tttcagtcgg tggctctggg tctgacggtg gggctgtgga taggttcgct gccgggtctg 600

	atggtggcgg	cggcctcgcc	gtatgtggcg	tggatgagcg	tcaccgcggg	gcaggccgag	660
	ctgaccgccg	cccagggtccg	ggttgctgcg	gcggcctacg	agacggcgta	tgggctgacg	720
	gtgccccgcg	cggatgatcg	cgagaaccgt	gctgaactga	tgattctgat	agcgaccaac	780
	ctcttggggc	aaaacacccc	ggcgatcgcg	gtcaacgagg	ccgaatacgg	cgagatgtgg	840
5	gccaagacg	ccgccgcgat	gtttggctac	gccgcggcga	cggcgacggc	gacggcgacg	900
	ttgctgccgt	tcgaggaggc	gccggagatg	accagcgcg	gtgggctcct	cgagcaggcc	960
	gccgcggtcg	aggaggcctc	cgacaccgcc	gcggcgaaac	agttgatgaa	caatgtgccc	1020
	caggcgctgc	aacagctggc	ccagcccacg	cagggcacca	cgccttcttc	caagctgggt	1080
	ggcctgtgga	agacggtctc	gccgcatcgg	tcgccgatca	gcaacatggg	gtcgatggcc	1140
10	aacaaccaca	tgatgatgac	caactcgggt	gtgtcgatga	ccaacacctt	gagctcgatg	1200
	ttgaagggct	ttgctccggc	ggcggccgcc	caggccgtgc	aaaccgcggc	gcaaaacggg	1260
	gtccgggcga	tgagctcgct	gggcagctcg	ctgggttctt	cgggtctggg	cggtgggggtg	1320
	gccgccaact	tgggtcgggc	ggcctcggtc	ggttcgttgt	cggtgccgca	ggcctggggc	1380
	gcggccaacc	aggcagtcac	cccggcgggc	cgggcgctgc	cgctgaccag	cctgaccagc	1440
15	gccgcggaaa	gagggcccgg	gcagatgctg	ggcgggctgc	cggtggggca	gatgggcgcc	1500
	agggccgggtg	gtgggctcag	tgggtgtgctg	cgtgttccgc	cgcgacccta	tgtgatgccg	1560
	cattctccgg	cagccggcga	tatcgccccg	ccggccttgt	cgcaggaccg	gttcgccgac	1620
	ttccccgcgc	tgccccctga	cccgtccgcg	atggtcgccc	aagtggggcc	acaggtggtc	1680
	aacatcaaca	ccaaaactggg	ctacaacaac	gccgtggggc	ccgggaccgg	catcgtcatc	1740
20	gatcccaacg	gtgtcgtgct	gaccaacaac	cacgtgatcg	cgggcgccac	cgacatcaat	1800
	gcgttcagcg	tcgggtccgg	ccaaacctac	ggcgtcgatg	tggtcgggta	tgaccgcacc	1860
	caggatgtcg	cggtgctgca	gctgcgcggt	gccggtggcc	tgccgtcggc	ggcgatcggt	1920
	ggcggcgctc	cggttggtga	gcccgtcgtc	gcgatgggca	acagcggtgg	gcagggcgga	1980
	acgccccgtg	cggtgcctgg	cagggtggtc	gcgctcggcc	aaaccgtgca	ggcgtcggat	2040
25	tcgctgaccg	gtgccgaaga	gacattgaac	gggttgatcc	agttcgatgc	cgcgatccag	2100

cccggtgatt cgggcgggcc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtgggtcgg tatgaacacg 2160

gccgcgtcct ag 2172

<210> 7

<211> 729

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión de Mtb72f con 6 residuos His adicionales

<400> 7

10 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

15 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

20 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

25 115 120 125

	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
5	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		
10	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
15	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		
20	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
25	305				310						315			320		

	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala
						325				330						335
	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Met	Asn	Asn	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu
5					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					
10	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
15				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					
20	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
25				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
 5 530 535 540
 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
 10 Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val
 580 585 590
 Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe
 595 600 605
 Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp
 15 610 615 620
 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
 20 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
 25 690 695 700

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

5

<210> 8

<211> 2190

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

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

<400> 8

atgcatcacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg 60

15

cagggattcg ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt 120

gggggggtcac ccaccgttca tatcgggcct accgccttcc tcggcttggg tgttgtcgac 180

aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc 240

ggcatctcca ccggcgacgt gatcaccgcg gtcgacggcg ctccgatcaa ctcggccacc 300

gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat cccggtgacg tcatctcggt gacctggcaa 360

20

accaagtcgg gcggcacgcg tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa 420

ttcatggtgg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgcgaggat gtacgccggc 480

ccgggttcgg cctcgctggt ggccgcggct cagatgtggg acagcgtggc gagtgcctg 540

ttttcggccg cgtcggcggt tcagtcggtg gtctgggggtc tgacggtggg gtcgtggata 600

ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgccgt atgtggcgtg gatgagcgtc 660

25

accgcggggc aggccgagct gaccgccgcc cagggtccggg ttgctgcggc ggccctacgag 720

	acggcgatatg ggctgacggt gccccgccc gtgatcgccg agaaccgtgc tgaactgatg	780
	attctgatag cgaccaacct cttggggcaa aacaccccgg cgatcgcggt caacgaggcc	840
	gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcggcgacg	900
	gcgacggcga cggcgacgtt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcggtt	960
5	gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctccg acaccgccgc ggcgaaaccag	1020
	ttgatgaaca atgtgcccc aagcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg	1080
	ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcacggtc gccgatcagc	1140
	aacatgggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc	1200
	aacaccttga gtcgatgtt gaagggcttt gtcggcgcg cggccgcca ggccgtgcaa	1260
10	accgcgcgcg aaaacggggt ccgggcgatg agctcgctgg gcagctcgtt gggttcttcg	1320
	ggtctgggcg gtggggtggc cgccaacttg ggtcggcgcg cctcggtcgg ttcgttgctg	1380
	gtgccgcagg cctgggcccgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcgcgcg ggcgctgccg	1440
	ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggcccggc agatgctggg cgggctgccg	1500
	gtggggcaga tgggcgccag ggccggtggt gggctcagtg gtgtgctgcg tgttccgccg	1560
15	cgaccctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggccttgctg	1620
	caggaccggt tcgccgactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtccgcgat ggtcgcccaa	1680
	gtggggccac aggtgggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc	1740
	gggaccggca tcgtcatcga tccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg	1800
	ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg	1860
20	gtcgggtatg accgcaccca ggatgtcgcg gtgctgcagc tcgcgggtgc cggtaggcctg	1920
	ccgtcggcg cgatcgggtg cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac	1980
	agcggtgggc agggcggaac gccccgtgcg gtgcctggca gggtagtcgc gtcggccaa	2040
	accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag	2100
	ttcgatgccg cgatccagcc cggtagattc ggcgggccc tcgtcaacgg cctaggacag	2160
25	gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag	2190

	<210>	9	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cpg Oligo 1 - CpG 1826	
	<400>	9	
		tccatgacgt tcctgacgtt	20
10	<210>	10	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	CpG Oligo 2 - CpG 1758	
	<400>	10	
		tctcccagcg tgcgccat	18
	<210>	11	
	<211>	30	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	CpG Oligo 3	
	<400>	11	
25		accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> CpG Oligo 4 - CpG 2006

<400> 12

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 13

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CpG Oligo 5 - CpG 1686

15 <400> 13

tccatgacgt tcctgatgct

20

20

25

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

260567
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESAMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 SET 10 A 10:47

MECS
Jefe de Legaciones
Honorable



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by a été signé par James Keef Milligan
3. acting in the capacity of agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 01 OCT 1961
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W Glass

For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this

Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en

con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 June 2012 (21.06.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/080369 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/04 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/072816

(22) International Filing Date:
14 December 2011 (14.12.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/422,723 14 December 2010 (14.12.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GlaxoSmithKline Biologicals s.a.** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GODART, Stephane Andre Georges** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LAANAN, Amina** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LEMOINE, Dominique Ingrid** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: **DALTON, Marcus Jonathan William**; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: MYCOBACTERIUM ANTIGENIC COMPOSITION

(57) Abstract: Immunogenic compositions comprising an M72 related antigen, wherein the conductivity of the composition is 13 mS/cm or lower, or the concentration of salts of the composition is 130 mM or lower, and their use in medicine, are provided.



WO 2012/080369 A1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SCG/VB64442	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2011/072816	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14/12/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 14/12/2010
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

MYCOBACTERIUM ANTIGENIC COMPOSITION

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/072816

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐	on paper
☒	in electronic form
 - b. (time)

☒	in the international application as filed
☐	together with the international application in electronic form
☐	subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/072816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 869 607 B1 (BUSCHLE MICHAEL [AT] ET AL) 22 March 2005 (2005-03-22) column 1, line 51 - column 2, line 41 column 3, line 17 - line 25 column 3, line 40 - line 62 column 4, line 22 - line 41 -----	1-47
A	LEROUX-ROELS ISABEL ET AL: "Evaluation of the Safety and Immunogenicity of Two Antigen Concentrations of the Mtb72F/AS02(A) Candidate Tuberculosis Vaccine in Purified Protein Derivative-Negative Adults", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 17, no. 11, November 2010 (2010-11), pages 1763-1771, XP002669941, page 1764, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 ----- -/-	1-47



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2012

Date of mailing of the international search report

02/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/072816

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/088255 A2 (KOREA CT FOR DISEASE CONTROL A [KR]; GREEN CROSS CORP [KR]; OH HEE-BOK) 16 July 2009 (2009-07-16) page 2, line 18 - page 3, line 1; example 1	1-46
X,P	----- WO 2010/142686 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HENDERICKX VERONIQUE [BE]; LEMOINE DOM) 16 December 2010 (2010-12-16) the whole document	1-47
X,P	----- WO 2010/142685 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HENDERICKX VERONIQUE [BE]; LEMOINE DOM) 16 December 2010 (2010-12-16) the whole document -----	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/072816

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6869607	B1	22-03-2005	AT 301470 T 15-08-2005
		CA 2319711 A1 05-08-1999	
		DE 19803453 A1 12-08-1999	
		EP 1051189 A2 15-11-2000	
		JP 2002501904 A 22-01-2002	
		US 6869607 B1 22-03-2005	
		WO 9938528 A2 05-08-1999	
WO 2009088255	A2	16-07-2009	KR 20090076610 A 13-07-2009
		US 2011015377 A1 20-01-2011	
		WO 2009088255 A2 16-07-2009	
WO 2010142686	A1	16-12-2010	AU 2010257539 A1 01-12-2011
		CA 2764251 A1 16-12-2010	
		SG 176091 A1 29-12-2011	
		WO 2010142686 A1 16-12-2010	
WO 2010142685	A1	16-12-2010	AU 2010257538 A1 08-12-2011
		CA 2764421 A1 16-12-2010	
		WO 2010142685 A1 16-12-2010	

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
PATENTE DE INVENCION ____		PCT <u>X</u>	MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 19-06-13			
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/04			
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es): GODART, Stephane Andre Georges; LAANAN, Amina y LEMOINE, Dominique Ingrid.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/422,723	14-12-10	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-07-13		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 21-06-12	
Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-11		No. Publicación: WO 2012/080369 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2011/072816			
(54) Título: COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA.			
(57) Resumen - Reivindicación(es):			
Resumen.- Se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno relacionado con M72, en donde la conductividad de la composición es de 13 mS/cm o menor, o la concentración de sales de la composición es de 130 mM o menor, y su uso en medicina. Sector: Industria farmacéutica, en particular preparaciones medicinales que comprenden antígenos bacterianos, específicamente antígenos de <i>Mycobacterium</i> , métodos de obtener dichas composiciones y kits que las incluyen.			

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____		PCT <u>X</u>	MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 19-06-13			
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/04			
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es): GODART, Stephane Andre Georges; LAANAN, Amina y LEMOINE, Dominique Ingrid.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/422,723	14-12-10	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-07-13		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 21-06-12	
Fecha de presentación de la solicitud: 14-12-11		No. publicación: WO 2012/080369 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2011/072816			
(54) Título: COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE MICOBACTERIA.			