

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 316**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/265 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/IB2011/052347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11148356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11727536 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2575878**

54 Título: **Vacunas que comprenden colesterol y CpG como únicas moléculas transportadoras de adyuvante**

30 Prioridad:

28.05.2010 US 349244 P

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

26.09.2018

73 Titular/es:

**ZOETIS BELGIUM S.A. (100.0%)
1, Rue Laid Burniat
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**DAVIS, HEATHER LYNN;
DOMINOWSKI, PAUL JOSEPH y
WEERATNA, RISINI DHAMMIKA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 683 316 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas que comprenden colesterol y CpG como únicas moléculas transportadoras de adyuvante

Campo de la invención

5 La invención se refiere a vacunas que tienen uno o más antígenos y un adyuvante, en la que el adyuvante consiste en uno o más oligonucleótidos de CpG aislados y colesterol, y los usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 Se ha descubierto que el colesterol puede potenciar la actividad de las moléculas inmunomoduladoras y, por tanto, la combinación de colesterol y moléculas inmunomoduladoras puede utilizarse en el tratamiento y/o la prevención de trastornos humanos y animales. Se describen vacunas que comprenden uno o más antígenos y colesterol, y vacunas que comprenden uno o más antígenos, una o más moléculas inmunomoduladoras y colesterol. El documento WO 2009/15960 desvela vacunas que contienen formulaciones adyuvantes que comprenden una saponina, un esterol, un compuesto de amonio cuaternario y un polímero.

Sumario de la invención

15 La invención se refiere a una vacuna que comprende uno o más antígenos y un adyuvante, en el que el adyuvante consiste en uno o más oligonucleótidos de CpG aislados y colesterol. El uno o más antígenos son cada uno de forma independiente, un antígeno microbiano, un autoantígeno, un antígeno tumoral, un alérgeno, o una sustancia adictiva.

20 En aspectos, la vacuna comprende además un transportador farmacéutico. En algunos aspectos, el uno o más antígenos son cada uno de forma independiente, un antígeno microbiano, un autoantígeno, un antígeno tumoral, un alérgeno, o una sustancia adictiva.

25 En determinados aspectos, la invención se refiere a una vacuna que comprende uno o más antígenos y un adyuvante, en la que el adyuvante consiste en uno o más oligonucleótidos de CpG aislados y colesterol para su uso en un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en el sujeto.

Descripción de las figuras

30 **Figura 1:** Gráficos que representan secreción de citoquinas específica de antígeno por linfocitos T sin presencia de adyuvante o en presencia de CpG o CpG + colesterol como adyuvante. Figura 1a. Gráfico de linfocitos T CD4+ que secretan de citoquinas únicas o dobles. Figura 1b. Gráfico de linfocitos T CD4+ que secretan citoquinas triples. Figura 1c. Gráfico de linfocitos T CD8+ que secretan de citoquinas únicas o dobles. Figura 1d. Gráfico de linfocitos T CD8+ que secretan citoquinas triples.

Figura 2: Gráfico de producción de IL-2 (Figura 2a) e IFN- γ (Figura 2b) sin presencia de adyuvante, CpG y CpG + colesterol.

35 **Figura 3:** Gráfico de respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de ovoalbúmina sin presencia de adyuvante o en presencia de CpG o CpG + colesterol como adyuvante. Figuras 3a-3b: respuestas de linfocitos T citotóxicos, Figuras 3c-3d: población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno.

Figura 4: Gráfico de títulos de anticuerpo específicos de ovoalbúmina sin presencia de adyuvante o en presencia de CpG o CpG + colesterol como adyuvante. Los números encima de cada barra representan la relación de IgG2c/IgG1.

40 **Figura 5:** Imagen de microscopio electrónico por transmisión del antígeno, CpG y colesterol.

45 **Figura 6:** Gráfico que representa las reacciones en los sitios de inyección en terneros inmunizados con la vacuna vírica inactivada pentavalente BVDV 1 y 2, IBRV, PI3V y BRSV en presencia de CpG + colesterol (en las relaciones 1:1 o 1:10 de CpG:colesterol), Advasure-DEAE/Dextrano, QCDCR o QCDCR + CpG. Algunos animales se inmunizaron con la vacuna comercial. Los animales placebo recibieron solución salina estéril. La Tabla 1 representa gráficamente el porcentaje de terneros con enfermedad clínica, fiebre, leucopenia o viremia tras la estimulación con BVDV-2 después de la vacunación con la vacuna vírica inactivada pentavalente BVDV 1 y 2, IBRV, PI3V y BRSV en presencia de CpG + colesterol (en las relaciones 1:1 o 1:10 de CpG:colesterol), Advasure-DEAE/Dextrano, QCDCR o QCDCR + CpG. Algunos animales se inmunizaron con la vacuna comercial. Los animales placebo recibieron solución salina estéril.

50 **Figura 7:** Gráfico de respuesta del anticuerpos específico de antígeno en cerdos inmunizados con pertactina (p68) formulada con diversos adyuvantes que incluyen CPG + colesterol.

Descripción de secuencias

55 SEQ ID NO:1 - CPG 7909 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'.

SEQ ID NO:2 - CpG 24555 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3'.

SEQ ID NO:3 - CPG 10104 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3'.

- SEQ ID NO:4 - CPG 10101 5' TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCCG 3'.
 SEQ ID NO:5 - CPG 10109 5' TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTCCCC 3'.
 SEQ ID NO:6 - CpG 23407
 5' T*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*T 3'
 5 SEQ ID NO:7 - CPG 21798
 5' T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:8 - CPG 23430
 5' T*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:9 - CpG 24558
 10 5' T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:10 - CPG 23871
 5' JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:11 - CPG 23873
 5' JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 15 SEQ ID NO:12 - CPG 23874
 5' *C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:13 - CPG 23875
 5' EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:14 - CpG 23877
 20 5' JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:15 - CpG 23878
 5' JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:16 - poli I:C ODN1a 5'- ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI IC-3'.
 SEQ ID NO:17 - 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3'.
 25 SEQ ID NO:18 - 5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3'.
 SEQ ID NO:19 - 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'.
 SEQ ID NO:20 - 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3'.
 SEQ ID NO:21 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T 3'.
 SEQ ID NO:22 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T 3'.
 30 SEQ ID NO:23 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T 3'.
 SEQ ID NO:24 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T 3'.
 SEQ ID NO:25 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3'.
 SEQ ID NO:26 - 5' TCGCGTCGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:27 - 5' TCGTCGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 35 SEQ ID NO:28 - 5' TCGGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:29 - 5' TCGGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:30 - 5' TCGCGTCGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:31 - 5' TCGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:32 - 5' TCGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 40 SEQ ID NO:33 - 5' TCGCGTCGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:34 - 5' TCGCGACGTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:35 - 5' TCGTCGTTTTCCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:36 - 5' TCGTCGACGATCGGCGCGGCCG 3'.
 SEQ ID NO:37 - 5' T*C_G*T*C_G*A*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 45 SEQ ID NO:38 - 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:39 - 5' T*C_G*T*C_G*A*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:40 - 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:41 - 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:42 - 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 50 SEQ ID NO:43 - 5' T*C_G*A*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:44 - 5' T*C_G*A*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:45 - 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:46 - 5' T*C_G*C_G*A*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'.
 SEQ ID NO:47 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 55 SEQ ID NO:48 - 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:49 - 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*A_C_G*G*C*G*G*C_G*T*G*C*G*G 3'.
 SEQ ID NO:50 - 5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G*G 3'.

(*) representa la presencia de un enlace internucleótido estabilizado y _ representa un enlace fosfodiéster. J representa un nucleótido modificado con yodo y E representa un nucleótido modificado con etilo.

60 **Descripción detallada de la invención**

La invención se refiere a vacunas que tienen uno o más antígenos y un adyuvante, en el que el adyuvante consiste en uno o más oligonucleótidos de CpG aislados y colesterol. En aspectos de la invención, se desvela el uso de la vacuna de la invención en procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto que lo necesita administrando la vacuna de la invención. Se desvela también el uso de vacunas de la invención en la

fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno.

El uno o más antígeno(s) son cada uno de forma independiente, un antígeno microbiano, un autoantígeno, un antígeno tumoral, un alérgeno, o una sustancia adictiva. En algunos aspectos de la invención, un agente microbiano es de origen bacteriano, vírico o parasítico. En algunos aspectos de la invención, el antígeno es un péptido, un péptido conjugado a una proteína transportadora, un polipéptido, una proteína recombinante, una proteína purificada, un patógeno muerto completo, un virus atenuado vivo, una bacteria atenuada viva, un antígeno expresado en un vector vírico o bacteriano, un polisacárido, un polisacárido conjugado a una proteína transportadora, una proteína conjugada a una partícula análoga a virus, un hapteno, un hapteno conjugado a una proteína transportadora o a una molécula pequeña.

- 5
- 10 En aspectos de la invención, cuando el antígeno es de origen bacteriano, el antígeno bacteriano es una bacteria muerta completa, una bacteria atenuada viva o proteínas purificadas bacterianas.

En aspectos de la invención, una bacteria incluye, aunque no de forma limitativa, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseroianus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaliges eutrophus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, especies de *Bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, especies de *Bacteroides*, especies de *Bordetella*, *Bordetella bronchiseptica*, *Borrelia burgdorferi*, especies de *Brucella*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, especies de *Brachyspira*. *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, especies de *Camphylobacter*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, especies de *Chlamydomyces*, *Chromobacterium viscosum*, especies de *Clostridium*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, especies de *Corynebacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Ehrlichia canis*, especies de *Enterobacter*, *Enterobacter aerogenes*, especies de *Enterococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, especies de *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Haemophilus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, especies de *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter suis*, especies de *Klebsiella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lawsonia intracellularis*, especies de *Legionella*, *Legionella pneumophila*, especies de *Leptospira*, such as *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii hardjoprajtino*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira*, *Leptospira bratislava*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Meningococcal bacteria*, especies de *Moraxella*, especies de *Mycobacterium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, especies de *Mycoplasma*, tales como, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, especies de *Neisseria*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Odoribacter denticanis*, especies de *Pasteurella*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, especies de *Proteus*, *Proteus vulgaris*, especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens C9*, *Pseudomonas fluorescens SIKW1*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp B11-1*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia spp*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, especies de *Salmonella*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enterica*, *Salmonella newport*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, especies de *Shigella*, *Spirulina platensis*, especies de *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, especies de *Streptococcus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus beta hemolíticos*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* (subespecies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis sp.*, especies de *Treponema*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema palladium*, *Treponema pertenue*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, especies de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, especies de *Yersinia* y combinaciones de las mismas.

Los polipéptidos o polisacáridos de patógenos bacterianos incluyen, aunque no de forma limitativa, una proteína de membrana externa regulada por hierro (IROMP), una proteína de membrana externa (OMP), y una proteína A de *Aeromonis salmonicida* que produce forunculosis, una proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que produce enfermedad renal bacteriana (BKD), un antígeno asociado a superficie mayor (msa), una citotoxina expresada superficialmente (mpr), una hemolisina expresada superficialmente (ish), y un antígeno flagelar de yersiniosis; una proteína extracelular (ECP), una IROMP, y una proteína estructural de pasteurellosis; una OMP y una proteína flagelar de *Vibrosis anguillarum* y *V. ordalii*; una proteína flagelar, una proteína OMP, aroA, y purA de *Edwardsiellosis ictaluri* y *E. tarda*; y un antígeno superficial de Ichthyophthirius; y una proteína estructural y reguladora de *Cytophaga columnari*; y una proteína estructural y reguladora de *Rickettsia*, IsdA, CifA, CifB, Opp3A, HLA y polisacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus*.

En aspectos de la invención, cuando el antígeno es de origen vírico, el antígeno vírico es un virus muerto o inactivado completamente, un virus atenuado vivo o proteínas o péptidos purificados víricos.

En algunos aspectos, el virus es uno que infecta animales incluyendo, aunque no de forma limitativa, Virus del herpes aviar, Gripe aviar, Virus de la leucosis aviar, Paramixovirus aviar, Virus de la enfermedad de Border, Coronavirus bovino, Virus de la fiebre efímera bovina, Virus del herpes bovino, Virus de la inmunodeficiencia bovina, Virus de la leucemia bovina, Virus 3 paragripal bovino, Virus sincitial respiratorio bovino, Virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), BVDV de Tipo I, BVDV de Tipo II, Adenovirus canino, Coronavirus canino (CCV), Virus del moquillo canino, Virus del herpes canino, Virus del herpes equino, Virus de la gripe canina, Virus paragripal canino, Parvovirus canino, Coronavirus respiratorio canino, Virus de la peste porcina clásica, Virus de la encefalitis equina oriental (EEE), Virus de la anemia infecciosa equina, Virus de la gripe equina, Virus del Nilo occidental, Calicivirus de felino, Coronavirus entérico de felino, Virus de la inmunodeficiencia felina, Virus de la peritonitis infecciosa felina, Virus del herpes felino, Virus de la gripe felina, Virus de la leucemia felina (FeLV), Virus de la rinotraqueítis vírica de felino, Lentivirus, Virus de la enfermedad de Marek, Virus de la enfermedad de Newcastle, Virus del herpes ovino, Paragripal 3 de ovino, Virus de la neumonía progresiva, Virus de adenocarcinoma pulmonar ovino, VCC pantrópico, Circovirus de porcino (PCV) de Tipo I, PCV de Tipo II, Virus de la diarrea epidérmica de porcino, Virus de la encefalomielitís hemaglutinante de porcino, Virus del herpes porcino, Parvovirus de porcino, Virus del síndrome reproductor y respiratorio de porcino (PRRS), Virus de la pseudorrabia, Rabia, Rotovirus, Rinovirus, Virus de la peste bovina, Virus de la gripe porcina, Virus de *lagastroenteritis transmisible*, *Coronavirus de pavo*, *Virus de la encefalitis equina venezolana*, *Virus de la estomatitis vesicular*, *Virus del Nilo occidental*, *Virus de la encefalitis equina occidental* y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, el virus es uno que infecta seres humanos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Arena viridae (virus de las fiebres hemorrágicas); Astrovirus; Bungaviridae (por ejemplo, Virus Hantaan, Virus bunga, Flebovirus y virus Nairo); Caliciviridae (por ejemplo, cepas que producen gastroenteritis); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Filoviridae (por ejemplo, virus ébola); Flaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Herpesviridae (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Iridoviridae (por ejemplo, Virus de la peste porcina africana); Virus de Norwalk y relacionados; Ortomixoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Parvoviridae (parvovirus); Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Cocksackie humanos, rinovirus, ecovirus); Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1o VIH-2 (denominado también HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); y virus sin clasificar (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (se piensa que es un satélite defectivo del virus de la hepatitis B).

En aspectos de la invención, cuando el antígeno es de origen parasítico, el parásito es una proteína procedente de *Anaplasma*, *Ancylostoma* (anquilostomas), *Ascaris*, *Babesia*, *Coccidia*, *Cryptosporidium parvum*, *Dirofilaria* (filarias), especies de *Eimeria*, *Fasciola hepatica*(parásito hepático), *Giardia*, *Hammondia*, *Isopora*, especies de *Leishmania*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis*, *Schistosoma*, *Strongyloides*, *Taenia*, *Toxoplasma gondii*, especies de *Trichinella*, especies de *Trichomonas* o especies de *Trypanosoma* sus combinaciones.

En algunos aspectos, el parásito es un parásito externo. En algunos aspectos, un parásito externo incluye, aunque no de forma limitativa, garrapatas, incluyendo especies de *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus*, *Hyalomma*, o *Haemaphysalis*, y combinaciones de los mismos.

En aspectos de la invención, cuando un antígeno es un autoantígeno, es un antígeno de las propias células o productos celulares de un sujeto que produce una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunos aspectos, un autoantígeno incluye, aunque no de forma limitativa, un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo, o un antígeno que se expresa a partir de elementos retrovíricos endógenos humanos. Un antígeno asociado con la enfermedad de Alzheimer puede ser tau o β -amiloide. Un antígeno contra un anticuerpo puede ser un antígeno contra un anticuerpo humano, por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno es IgE.

En aspectos de la invención, cuando el antígeno es un antígeno tumoral, el antígeno tumoral es uno o más de WT1, MUC1, LMP2, VPH E6 o VPH E7, EGFR o una forma variante, por ejemplo, EGFRvIII, HER-2/neu, Idiotipo, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Mutante de Ras, gp100, mutante de p53, Proteína3 (PR1), bcr-abl, Tirosinasa, Survivina, PSA, hTERT, Puntos de rotura de la translocación del sarcoma, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, Receptor de andrógenos, Ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe (animal), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, Anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSSX2, XAGE 1, B7H3, Legumain, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, o antígeno 1 relacionado con Fos. Dichos antígenos tumorales se han clasificado según criterios tales como a) la función terapéutica, b) la inmunogenicidad, c) el papel del antígeno en la oncogenicidad, d) la especificidad, nivel de expresión y porcentaje de células positivas al antígeno, e) la expresión de los citoblastos, f) el número de pacientes con cánceres positivos a

antígenos, g) el número de epítomos antigénicos y h) la localización celular de la expresión antigénica (véase Cheever, M. A. y col., *Clinical Cancer Research*, 1 de septiembre de 2009, 15(17):5323-5337). En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es uno o más de survivina, Her-2, EGFRvIII, PSA, PAP o PMSA.

5 En aspectos de la invención, cuando un antígeno es un alérgeno, este se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa de animales, esporas y fármacos fúngicos (por ejemplo, penicilina). Los ejemplos de alérgenos naturales, animales y vegetales, incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas específicas de los siguientes géneros: *Agropyron* (por ejemplo, *Agropyron repens*); *Agrostis* (por ejemplo, *Agrostis alba*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Anthoxanthum* (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*); *Apis* (por ejemplo, *Apis multiflorum*); *Arrhenatherum* (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Avena* (por ejemplo, *Avena sativa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Blattella* (por ejemplo, *Blattella germanica*); *Bromus* (por ejemplo, *Bromus inermis*); *Caninos* (*Canis familiaris*); *Chamaecyparis* (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Cupressus* (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Dactylis* (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); *Dermatophagoides* (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Festuca* (por ejemplo, *Festuca elatior*); *Holcus* (por ejemplo, *Holcus lanatus*); *Juniperus* (por ejemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Lolium* (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Olea* (*Olea europeae*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Paspalum* (por ejemplo, *Paspalum notatum*); *Periplaneta* (por ejemplo, *Periplaneta americana*); *Phalaris* (por ejemplo, *Phalaris arundinacea*); *Phleum* (por ejemplo, *Phleum pratense*); *Plantago* (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); *Poa* (por ejemplo, *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Secale* (por ejemplo, *Secale cereale*); *Sorghum* (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); *Thuya* (por ejemplo, *Thuya orientalis*); y *Triticum* (por ejemplo, *Triticum aestivum*), y sus combinaciones.

25 En aspectos de la invención, cuando un antígeno es una sustancia adictiva, es cualquier sustancia química o biológica, incluyendo sustancias sintéticas o artificiales, que hace que un sujeto desarrolle una adicción a esta sustancia. En algunos aspectos, una sustancia adictiva es nicotina o cocaína. En algunas realizaciones, el antígeno en una vacuna contra una adicción de nicotina es nicotina o un hapteno análogo a nicotina conjugado con un transportador. En algunas realizaciones, el transportador al cual se conjuga la nicotina o el hapteno análogo a nicotina es el toxoide de la difteria.

30 En aspectos de la invención, un antígeno o un hapteno se conjuga a una proteína transportadora. En algunos aspectos, la proteína transportadora es un toxoide o derivado bacteriano, una exotoxina de *Pseudomonas*, KLH o una partícula análoga a virus. En algunos aspectos, un toxoide bacteriano es el toxoide de la difteria o uno de sus derivados. En algunos aspectos, un toxoide bacteriano es CRM197. En algunos aspectos, la partícula análoga a virus es HBsAg, HBcAg, bacteriófago Q β de *E. coli*, virus de Norwalk o gripe HA.

35 Los aspectos de la invención se refieren a vacunas que tienen colesterol. El colesterol es una sustancia cristalina de color blanco con una fórmula química de C₂₇H₄₅OH. Es un alcohol de hidrocarburo cíclico que se clasifica como un lípido. Un lípido es cualquier grupos de compuestos orgánicos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, las grasas, aceites, ceras, esteroides y triglicéridos, que son insolubles en agua pero que son solubles en disolventes orgánicos no polares, son oleosos al tacto y junto con los hidratos de carbono y las proteínas son el material estructural principal de las células vivas. El colesterol es insoluble en agua, pero es soluble en numerosos disolventes orgánicos.

40 Los esteroides se refieren a compuestos en animales que se producen biológicamente a partir de precursores perpenoides. Comprenden una estructura de anillo esteroide, que tiene un grupo hidroxilo (OH). En algunos aspectos, el grupo hidroxilo puede unirse al carbono-3. La cadena de hidrocarburo del sustituyente de ácido graso varía de longitud. En algunos aspectos, la cadena de hidrocarburo puede tener de 16 a 20 átomos de carbono. En algunos aspectos, la cadena de hidrocarburo puede estar saturada o insaturada. Los esteroides pueden contener uno o más dobles enlaces en la estructura del anillo y pueden incluir también una variedad de sustituyentes unidos a los anillos. Los esteroides y sus ésteres de ácidos grasos pueden ser insolubles en agua. Los ésteres de ácidos grasos se refieren a cualquier clase de compuestos orgánicos que corresponden a sales inorgánicas, que se forman a partir de una reacción de condensación en la que una molécula de un ácido orgánico se une con una molécula de alcohol con la eliminación de una molécula de agua. En algunos aspectos, los esteroides se refieren a esteroides sintéticos.

50 En algunos aspectos, los esteroides sintéticos incluyen, aunque no de forma limitativa, glucocorticoides (por ejemplo, prednisona, dexametasona, triamcinolona), mineralocorticoides (por ejemplo, fludrocortisonas), vitamina D (por ejemplo, dihidrotaquiesterol), andrógeno (por ejemplo, oxandrolona, nandrolona, esteroides anabólicos), estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol) y progestinas (por ejemplo, noretindrona, acetato de medroxiprogesterona). En algunos aspectos, se puede usar un colato, por ejemplo, desoxicolato de sodio.

Los esteroides incluyen, aunque no de forma limitativa, esteroides naturales tales como, β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol, y colesterol. dichos esteroides pueden adquirirse comercialmente. Colesterol, por ejemplo, se desvela en el Índice Merck, 12^a Ed., pág. 369.

60 Los esteroides pueden utilizarse como adyuvante. En algunos aspectos, la cantidad de esterol puede ser de

aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad de esteroles puede ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4.000 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.000 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2.000 µg por dosis de vacuna, o de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad de esteroles puede ser de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 250 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis de vacuna, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis de vacuna, o de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis de vacuna.

La vacuna tiene uno o más antígenos y colesterol. En algunos aspectos, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 veces mayor en peso. En algunos aspectos, la cantidad de colesterol es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces mayor en peso que el antígeno. En algunos aspectos, la cantidad de colesterol es igual en peso al antígeno.

En aspectos de la invención, una vacuna incluye además un transportador farmacéutico.

Como se usa en el presente documento, "junto con" o "conjuntamente con" se refiere a una mezcla, una combinación o estar muy cerca de uno o más antígenos, y uno o más antígenos y una o más moléculas inmunomoduladoras. En aspectos, el uno o más antígenos y el uno o más oligonucleótidos de CpG aislados pueden unirse al colesterol por medios físicos a través de uno o más enlazadores. Un enlazador incluye, aunque no de forma limitativa, enlazadores directos o indirectos. En aspectos, el uno o más antígenos y/o uno o más oligonucleótidos de CpG y colesterol pueden encapsularse juntos.

En aspectos de la invención, uno o más antígenos pueden mezclarse con uno o más oligonucleótidos de CpG aislados. En aspectos, uno o más antígenos pueden mezclarse con colesterol. En aspectos, uno o más oligonucleótidos de CpG aislados pueden mezclarse con colesterol. En aspectos, una o más moléculas inmunomoduladoras pueden mezclarse con antígeno y colesterol. En aspectos, una o más moléculas inmunomoduladoras pueden mezclarse con colesterol y uno o más antígenos pueden estar separados. En aspectos, uno o más antígenos pueden mezclarse con colesterol uno o más oligonucleótidos de CpG pueden estar separados. En aspectos, uno o más antígenos y/o uno o más oligonucleótidos de CpG aislados pueden estar junto con colesterol.

En aspectos de la invención, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es mayor que la cantidad de antígeno. En algunos aspectos, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es de aproximadamente 0,1 a 50 veces mayor en peso que el antígeno. En aspectos, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 veces, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 veces mayor en peso que el antígeno. En aspectos, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces mayor en peso que el antígeno. En aspectos, la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es igual en peso al antígeno. En aspectos, el antígeno puede ser uno o más antígenos y el peso del antígeno es el peso total del uno o más antígenos.

Como se desvela en el presente documento, una molécula inmunomoduladora (una o más moléculas inmunomoduladoras) es una molécula que modula células inmunitarias en un sujeto. Este efecto puede estar mediado directamente, por ejemplo, a través de un receptor, o indirectamente, por ejemplo, a través de las citoquinas o quimioquinas liberadas desde otra célula inmunitaria que se modula directamente. Una inducción de una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier aumento en el número o actividad de una célula inmunitaria, o un aumento en la expresión o los niveles absolutos de un factor inmunitario, tal como una citoquina. Las células inmunitarias incluyen, aunque no de forma limitativa, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Las citoquinas incluyen, aunque no de forma limitativa, interleuquinas, TNF-α, iFN-α,β y γ. En aspectos, un modulador inmunitario es una molécula que cuando se usa con un antígeno potencia las respuestas inmunitarias humerales (por ejemplo, anticuerpos) y/o celulares (por ejemplo, linfocitos T) específicas de antígenos.

En algunos aspectos, una molécula inmunomoduladora es un agonista de TLR, un péptido antimicrobiano, una citoquina, una quimioquina, un ligando de NOD o un oligonucleótido. En algunos aspectos, un agonista de TLR es un oligorribonucleótido (ORN) o una molécula pequeña que activa TLR 7 y/o TLR 8. En algunos aspectos, un agonista de TLR es un oligodesoxinucleótido (ODN) que se activa a través de TLR 9. En algunos aspectos, un agonista de TLR 9 es un ODN que contiene motivos de CpG sin metilar, un oligodesoxinucleótido de Clase B, un oligodesoxinucleótido de Clase C o un oligodesoxinucleótido de Clase P. En algunos aspectos, un agonista de TLR 9 es IMO-2055, IMO-2125 o IMO-2134 (QAX935). En otros aspectos, un agonista de TLR es un poli I:C que activa TLR 3. En algunos aspectos, el poli I:C ODN1a tiene la secuencia 5'- ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC-3' SEQ ID NO:16).

En aspectos de la invención, un oligonucleótido puede abarcar diversas modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con ARN y ADN natural, que implica un puente internucleósido fosfodiéster, una unidad de β-D-ribosa

y/o una base nucleosídica natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Las personas expertas conocen ejemplos de modificaciones químicas, por ejemplo, en Uhlmann E y col. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST y col. (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker J y col. (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. En algunos aspectos, un oligonucleótido puede tener una o más modificaciones, en la que cada modificación se localiza en un puente internucleósido de fosfodiéster concreto y/o en una unidad de β -D-ribosa concreta y/o de una base nucleosídica natural concreta en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesta de ADN o ARN natural.

En algunos aspectos, los oligonucleótidos pueden comprender una o más modificaciones y en las que cada modificación se selecciona independientemente entre:

- a) la sustitución de un puente internucleósido fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido mediante un puente internucleósido modificado,
- b) la sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido mediante un puente defosfo,
- c) la sustitución de una unidad de azúcar fosfato procedente de la estructura principal de azúcar fosfato por otra unidad,
- d) la sustitución de una unidad β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada, y
- e) la sustitución de una base nucleosídica natural por una base nucleosídica modificada. En aspectos de la invención, los oligonucleótidos pueden incluir enlaces internucleótidos modificados,

tales como los descritos en a) o b) anteriormente. Estos enlaces modificados pueden ser parcialmente resistentes a la degradación (por ejemplo, están estabilizados). Una "molécula de oligonucleótido estabilizada" es un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exonucleasa o endonucleasa) resultante de dichas modificaciones. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato, en algunos aspectos, pueden proporcionar una actividad máxima y proteger el oligonucleótido de la degradación mediante exonucleasas y endonucleasas intracelulares.

Un puente internucleósido fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido puede estar sustituido mediante un puente internucleósido modificado, en el que el puente internucleósido modificado se selecciona, por ejemplo, entre fosforotioato, fosforditioato, NR¹R²-fosforamidoato, boranofosfato, α -hidroxibencil fosfonato, fosfato-alkil (C₁-C₂₁)-O-éster, fosfato-[aril (C₆-C₁₂)-alkil (C₁-C₂₁)-O]-éster, puentes de alquilfosfonato (C₁-C₈) y/o arilfosfonato (C₆-C₁₂), aril (C₇-C₁₂)- α -hidroximetilo (por ejemplo, desvelados en el documento WO 95/01363), en el que arilo (C₆-C₁₂), arilo (C₆-C₂₀) y arilo (C₆-C₁₄) están opcionalmente sustituidos por halógeno, alquilo, alcoxi, nitro, ciano, y donde R¹ y R² son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₈), arilo (C₆-C₂₀), aril (C₆-C₁₄)-alquilo-(C₁-C₈), preferentemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), preferentemente alquilo (C₁-C₄) y/o metoxietilo, o R¹ y R² forman, junto con el átomo de nitrógeno que los contiene, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que puede contener además un heteroátomo adicional procedente del grupo O, S y N.

La sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido mediante un puente defosfo (se describen puentes defosfo, por ejemplo, en Uhlmann E y Peyman A en "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pág. 355 ff), en el que se selecciona, por ejemplo, un puente defosfo entre los puentes defosfo de los grupos formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, dimetilensulfona y/o sililo.

Una unidad de azúcar fosfato (es decir, una β -D-ribosa y un puente internucleósido de fosfodiéster juntos forman una unidad de azúcar fosfato) procedente de la estructura principal del azúcar fosfato (es decir una estructura principal de azúcar fosfato está compuesta de unidades de azúcar fosfato) puede estar sustituida por otra unidad, en el que la otra unidad es, por ejemplo, adecuada para construir un oligómero "derivado de morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP y col. (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), es decir, por ejemplo, la sustitución por una unidad derivada de morfolino; o para construir un ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como se describe por ejemplo, en Nielsen PE y col. (1994) Bioconjug Chem 5:3-7), es decir, por ejemplo, la sustitución por una unidad de la estructura principal de PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina. El oligonucleótido puede tener otras modificaciones y sustituciones de la estructura principal del hidrato de carbono, tales como ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), y oligonucleótidos que tienen secciones de la estructura principal con enlazadores de alquilo o enlazadores de amino. El enlazador de alquilo puede estar ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido, y ser quiralmente puro o una mezcla racémica.

Una unidad de β -ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa puede estar sustituida por una unidad de azúcar modificado, en el que la unidad de azúcar modificado se selecciona, por ejemplo, entre β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-alkil (C₁-C₆)-ribosa, preferentemente 2'-O-alkil (C₁-C₆)-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-alquenil (C₂-C₆)-ribosa, 2'-[O-alkil (C₁-C₆)-O-alkil (C₁-C₆)]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilofuranosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexopiranososa, y carbocíclico (descrito, por ejemplo, en Froehler J (1992) Am Chem Soc 114:8320) y/o análogos de azúcares de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col. (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcares (descritos, por ejemplo, en Tarkov M y col. (1993) Helv Chim Acta 76:481).

En algunos aspectos, el azúcar es 2'-O-metilribosa, para uno o ambos nucleótidos unidos por un enlace internucleósido de tipo fosfodiéster o fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos incluyen también, aunque no de forma limitativa, purinas y pirimidinas sustituidas tales como C-5 propina pirimidina y bases modificadas de purina sustituida con 7-desaza-7. Wagner RW y col. (1996) Nat Biotechnol 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen, aunque no de forma limitativa, adenina, citosina, guanina, y timina, y otras nucleobases que se producen de forma natural y no naturalmente, restos aromáticos sustituidos y no sustituidos.

Una base modificada es cualquier base que es químicamente distinta de las bases naturales que se encuentran normalmente en el ADN y el ARN tales como T, C, G, A, y U, pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases naturales. La base de nucleósido modificada puede seleccionarse, por ejemplo, entre hipoxantina, uracilo, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquil (C₁-C₆)-uracilo, 5-alquenal (C₂-C₆)-uracilo, 5-alquenal (C₂-C₆)-uracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquil (C₁-C₆)-citosina, 5-alquenal (C₂-C₆)-citosina, 5-alquenal (C₂-C₆)-citosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-desazapurina sustituida, preferentemente purina sustituida con 7-desaza-7 y/o purina sustituida con 7-desaza-8, 5-hidroximetilcitosina, N⁴-alquilocitosina, por ejemplo, N⁴-etilcitosina, 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N⁴-alquildesoxicitidina, por ejemplo, N⁴-etilcitosina, 6-tiodesoxiguanosina, y desoxirribonucleósidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina, y diaminopurina, por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de bases de nucleósidos naturales.

Para algunas fórmulas descritas en el presente documento, se define un conjunto de bases modificadas. Por ejemplo, la letra Y se usa para referirse a un nucleótido que contiene una citosina o una citosina modificada. Una citosina modificada es un análogo de una base de pirimidina que se produce naturalmente o que no se produce naturalmente que puede sustituir esta base sin deteriorar la actividad inmunoestimuladora o inmunomoduladora del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen, aunque no de forma limitativa citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina, y 5-alquenal-citosina no sustituida o sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N⁴-sustituidas (por ejemplo, N⁴-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, los análogos de citosina con sistemas de anillos condensados (por ejemplo, N,N'-propileno citosina o fenoxazina), y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-bromoviniluracilo, 4-tiouracilo, 5-hidroxiuracilo, 5-propiniluracilo). En algunos aspectos, citosinas incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, y N⁴-etilcitosina. En algunos aspectos, la base de citosina está sustituida por una base universal (por ejemplo, 3-nitropirrol, base-P), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (Separador d).

La letra R se usa para referirse a guanina o una base de guanina modificada. Una guanina modificada es un análogo de una base de purina que se produce naturalmente o que no se produce naturalmente que puede sustituir esta base sin deteriorar la actividad inmunoestimuladora o inmunomoduladora del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen, aunque no de forma limitativa 7-desazaguanina, guanina sustituida con 7-desaza-7 (tal como, 7-desaza-7-alquenal (C₂-C₆)guanina), guanina sustituida con 7-desaza-8, hipoxantina, guaninas sustituidas con N² (por ejemplo, N²-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N⁶-metil-adenina, 8-oxo-adenina) guanina 8 sustituida (por ejemplo, 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina), y 6-tioguanina. En algunos aspectos, la base de guanina está sustituida por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitroindol, y base K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, bencimidazol o dicloro-bencimidazol, amida del ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) o un átomo de hidrógeno (Separador d).

En algunos aspectos, Se contemplan también otras modificaciones de bases. Por ejemplo, los restos T en cualquiera de los extremos de un oligonucleótido pueden estar sustituidos por desoxiuridina (U), el G de uno o más motivos CpG puede estar sustituido con desoxiinosina (I), y la modificación de los restos G como 7-desaza desoxiguanosina. En algunos aspectos, el T del extremo 5' de un oligonucleótido puede incluir una sustitución de halógeno. En algunos aspectos, la sustitución de halógeno es etil-uridina, bromo-uridina, cloro-uridina o yodo-uridina.

Los oligonucleótidos pueden sintetizarse *de novo* utilizando cualquiera de numerosos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de la b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S.L., y Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); el procedimiento del nucleósido de H-fosfonato (Garegg y col., *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler y col., *Nucl. Acid. Res.* 14:5399-5407, 1986; ; Garegg y col., *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986, Gaffney y col., *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Estas químicas se pueden llevar a cabo mediante una variedad de sintetizadores de ácido nucleico automatizados disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido aislado se refiere generalmente a un oligonucleótido que está separado de los componentes con los que está normalmente asociado en la naturaleza. Como ejemplo, un oligonucleótido aislado puede ser uno que está separado de una célula, de un núcleo, de una mitocondria o de cromatina.

Los enlaces internucleótidos en el oligonucleótido pueden ser un enlace no estabilizado o estabilizado (frente a las nucleasas), un fosfodiéster (no estabilizado), un fosforotioato (estabilizado) u otra estructura principal cargada, o un

enlace fosfodiéster. En algunos aspectos, si el enlace internucleótido en Y-R es un fosforotioato, la quiralidad de este enlace puede ser aleatoria, o es preferentemente un enlace fosforotioato de configuración Rp.

Pueden sintetizarse estructuras principales modificadas, tales como fosforotioatos, utilizando técnicas automatizadas que emplean tanto las químicas del fosforoamidato como del H-fosfonato. Se pueden preparar aril y alquil fosfonatos, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.469.863; y se pueden preparar alquilfosfotriésteres (en el que el resto de oxígeno cargado está alquilado, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.023.243 y en la patente Europea n.º 0.092.574) mediante síntesis en fase sólida automatizada utilizando reactivos comercialmente disponibles. Se han descrito procedimientos para preparar otras modificaciones y sustituciones de la estructura principal del ADN (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1:165, 1990). El símbolo * se refiere a la presencia de un enlace internucleósido estabilizado y _ se refiere a la presencia de un enlace fosfodiéster. En aspectos, la una o más moléculas inmunomoduladoras pueden tener cada una de manera independiente, una estructura principal de fosfodiéster completamente natural.

En aspectos de la invención, los oligonucleótidos de CpG incluyen al menos un dinucleótido de CpG sin metilar. Un oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido de CpG sin metilar es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de un dinucleótido de citosina-guanina sin metilar (es decir, "ADN de CpG" o ADN que contiene una 5' citosina seguida por 3' guanina y unida mediante un enlace fosfato) y activa el sistema inmunitario. El oligonucleótido de CpG completo puede estar sin metilar o las partes pueden estar sin metilar, pero al menos el C del 5' CG 3' debe estar sin metilar. CPG. Las expresiones oligonucleótido de CpG o ácido nucleico de CpG como se usa en el presente documento se refieren a un oligonucleótido de CpG inmunoestimulador o a un ácido nucleico salvo que se indique otra cosa.

En aspectos de la invención, Los oligonucleótidos de CpG son de Clase A, Clase B, Clase C, Clase T, Clase P o cualquier Clase con una modificación E.

Los oligonucleótidos de Clase A son potentes para inducir la activación de IFN- α y de los linfocitos NK, pero son relativamente débiles en la estimulación de linfocitos B. Los oligonucleótidos de Clase A tienen normalmente secuencias polio-G estabilizadas en los extremos 5' y 3' y una secuencia que contiene un dinucleótido de fosfodiéster CpG palindrómico de al menos 6 nucleótidos y forma estructuras multiméricas. Se han descrito oligonucleótidos de Clase A en la patente de Estados Unidos n.º 6.949.520, otorgada el 27 de septiembre de 2005 y en la solicitud PCT publicada n.º PCT/US00/26527 (documento WO 01/22990), publicada el 5 de abril de 2001. Los oligonucleótidos de Clase A no contienen necesariamente un hexámero GACGTC, AGCGCT, o AACGTT palindrómico, descrito por Yamamoto y sus colaboradores. Yamamoto S y col. J Immunol 148:4072-6 (1992). En aspectos, un oligonucleótido de CpG de "Clase A" tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO:17). En aspectos, un oligonucleótido de Clase A incluye, aunque no de forma limitativa, 5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO:18); en el que * se refiere a un enlace de fosforotioato y _ se refiere a un enlace fosfodiéster.

Los oligonucleótidos de Clase B son potentes en activar linfocitos B pero son relativamente débiles en inducir la activación de IFN- α y los linfocitos NK. Los oligonucleótidos de Clase B son monoméricos y pueden estabilizarse totalmente con una estructura principal completa de fosforotioato. Los oligonucleótidos de Clase B pueden tener también algunos enlaces de fosfodiéster naturales, por ejemplo, entre el C y G del CpG, en cuyo caso se denominan semiblandos. En aspectos, un oligonucleótido de CpG de clase B puede representarse por al menos la fórmula: 5' X₁X₂CGX₃X₄ 3', en la que X₁, X₂, X₃, y X₄ son nucleótidos. En aspectos, X₂ es adenina, guanina, o timina. En aspectos, X₃ es citosina, adenina, o timina. En aspectos, un oligonucleótido de CpG de clase B puede representarse por al menos la fórmula: 5' N₁X₁X₂CGX₃X₄N₂ 3', en la que X₁, X₂, X₃, y X₄ son nucleótidos y N es cualquier nucleótido y N₁ y N₂ son secuencias de ácidos nucleicos compuestas por entre aproximadamente 0-25 N cada una. En aspectos, X₁X₂ es un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT y TpG; y X₃X₄ es un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en TpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA y CpA. En algunos aspectos, X₁X₂ es GpA o GpT y X₃X₄ es TpT. En aspectos, X₁ o X₂ o ambos son purinas y X₃ o X₄ o ambos son pirimidinas o X₁X₂ es GpA y X₃ o X₄ o ambos son pirimidinas. En algunos aspectos, X₁X₂ es un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en TpA, ApA, ApC, ApG y GpG. En algunos aspectos, X₃X₄ es un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en TpT, TpA, TpG, ApA, ApG, GpA y CpA. X₁X₂, en algunos aspectos, es un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en TpT, TpG, ApT, GpC, CpC, CpT, TpC, GpT y CpG; X₃ es un nucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en A y T, y X₄ es un nucleótido, pero cuando X₁X₂ es TpC, GpT o CpG, X₃X₄ no es TpC, ApT o ApC. En aspectos, el oligonucleótido de CpG tiene la secuencia 5' TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄ 3'. Los oligonucleótidos de CpG de la invención, pueden incluir, por ejemplo, X₁X₂ seleccionado entre el grupo que consiste en GpT, GpG, GpA y ApA y X₃X₄ seleccionado entre el grupo que consiste en TpT, CpT y TpC. Se han descrito oligonucleótidos de Clase B en las patentes de Estados Unidos números 6.194.388 B1 y 6.239.116 B1, otorgadas el 27 de febrero de 2001 y 29 de mayo de 2001, respectivamente, y en la solicitud PCT publicada n.º WO/1996/002555, publicada el 1 de febrero de 1996 y en la solicitud PCT publicada n.º WO/1998/018810, publicada el 7 de mayo de 1998. En algunos aspectos, un oligodesoxinucleótido de Clase B es

CPG 7909 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO:1),

- CpG 24555 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:2),
 CPG 10104 TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:3),
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO:19),
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO:20),
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO:21),
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*TT*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO:22),
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO:23),
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO:24), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO:25) en el que
 * se refiere a un enlace de fosforotioato.

Los oligonucleótidos de Clase C tienen una secuencia CpG "estimuladora" tradicional y un motivo "rico en GC" o "que neutraliza los linfocitos B". Los oligonucleótidos de CpG de Clase A tienen propiedades intermedias a las Clases A y B de tal manera que activan los linfocitos B y los linfocitos NK e inducen IFN-α (Krieg AM y col. (1995) Nature 374:546-9; Ballas ZK y col. (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S y col. (1992) J Immunol 148:4072-6). Los oligonucleótidos de Clase C, contienen un único palíndromo, de tal manera que pueden formar estructuras secundarias tales como de bucles-tallo o estructuras terciarias tales como dímeros. La estructura principal de los oligonucleótidos de Clase C puede tener una estructura principal completamente estabilizada, química o semiblanda. Los oligonucleótidos de Clase C incluyen una secuencia de tipo Clase B y un palíndromo rico en GC o un palíndromo cercano. Esta Clase se ha descrito en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 20030148976, publicada el 7 de agosto de 2003 y en la solicitud PCT publicada n.º WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008. En algunos aspectos, un oligonucleótido de Clase C es CPG 10101 5' TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCCG 3' (SEQ ID NO:4), CPG 10109 5' TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTCCCG 3' (SEQ ID NO:5 donde las líneas punteadas representan enlaces de fosfodiéster semiblandos), CpG 23407 5' TC-GTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO:6 donde la línea punteada representa un enlace de fosfodiéster semiblando), 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:26), 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:27), 5' TCGGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:28), 5' TCGGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:29), 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:30), 5' TCGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:31), 5' TCGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:32), 5' TCGCGTCGTTTCGGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:33), 5' TCGGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:34), o 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:35).

En aspectos, un oligonucleótido de CpG de Clase C es 5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:38), 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:39), 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:40), 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:41), 5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:42), 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:43), 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:44), 5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:45), 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:46), 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:47), 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:48), 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*G*T*G*C*G 3' (SEQ ID NO:49) o 5' T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:50) en el que * se refiere a un enlace de fosforotioato y _ se refiere a un enlace de fosfodiéster. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir el 5' T; los ejemplos de sustituciones de halógeno incluyen, aunque no de forma limitativa, sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

Los oligonucleótidos de Clase P tienen la capacidad en algunos casos de inducir niveles mucho mayores de secreción de IFN-α que los oligonucleótidos de Clase C. Los oligonucleótidos de Clase P tienen la capacidad de autoensamblarse de forma espontánea en concatámeros ya sea *in vitro* y/o *in vivo*. Los oligonucleótidos de Clase P se desvelan adicionalmente en la solicitud PCT publicada n.º WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008. En algunos aspectos, un oligodesoxinucleótido de Clase P es

- CpG 21798 5' T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:7),
 CpG 23430 5' T*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO:8),
 CpG 24558 5' T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:9),
 CpG 23871 5' JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:10),
 CpG 23873 5' JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:11),
 CpG 23874 5' JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:12),
 CpG 23875 5' EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:13), CpG 23877 5' JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:14),
 CpG 23878 5' JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3' (SEQ ID NO:15) o
 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*G*C*G*C*G 3' (SEQ ID NO:37).

Los oligonucleótidos de Clase T inducen la secreción de niveles bajos de citoquinas y quimioquinas relacionadas con IFN-alfa e IFN y que los oligonucleótidos de Clase B o Clase C, reteniendo a la vez la capacidad de inducir niveles de IL-10 similares a los oligonucleótidos de Clase B. Los oligonucleótidos de Clase T se desvelan además en la

solicitud PCT publicada WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008.

Se pueden realizar modificaciones E en cualquier clase de oligonucleótidos de CpG. Estos son oligonucleótidos con análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos fuera del motivo CpG y tienen una capacidad potenciada para estimular la producción de interferón- α (IFN- α) e inducir la activación de TLR9. Los oligonucleótidos modificados en E se desvelan además en la publicación PCT publicada WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008.

En aspectos de la invención, Los oligonucleótidos de CpG están en una cantidad eficaz para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En algunos aspectos, la respuesta inmunitaria específica de antígeno potenciada es una respuesta inmunitaria Th1. En algunos aspectos, la respuesta inmunitaria Th1 da como resultado la inducción específica de antígeno de IFN- γ , o la inducción de linfocitos T polifuncionales que secretan dos o más citoquinas. En algunos aspectos, las citoquinas incluyen, aunque no de forma limitativa, IL-2 e IFN- γ o IFN- γ , TNF- α y IL-2.

En aspectos de la invención, la cantidad de oligonucleótido de CpG es de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 5 mg por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad es de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 4 mg por dosis de vacuna, de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 3 mg por dosis de vacuna, aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 2 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 1 mg por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad es de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 750 μ g por dosis de vacuna, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 500 μ g por dosis de vacuna, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 250 μ g por dosis de vacuna, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 100 μ g por dosis de vacuna, de aproximadamente 20 μ g a aproximadamente 100 μ g por dosis de vacuna, o de aproximadamente 30 μ g aproximadamente 100 μ g por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad es aproximadamente 500 μ g por dosis de vacuna. En algunos aspectos, la cantidad es aproximadamente 250 μ g por dosis de vacuna.

En aspectos de la invención, la cantidad de oligonucleótido de CpG con respecto a la cantidad de colesterol es mayor que la cantidad de colesterol. En aspectos de la invención, la relación de la cantidad del oligonucleótido de CpG a la cantidad de colesterol es aproximadamente 100:1, o aproximadamente 75:1, o aproximadamente 50:1, o aproximadamente 25:1, o aproximadamente 15:1, o aproximadamente 10:1, o aproximadamente 5:1 en peso. En aspectos de la invención, la cantidad del oligonucleótido de CpG con respecto a la cantidad de colesterol es aproximadamente la misma que la cantidad de colesterol. Es decir, la cantidad del oligonucleótido de CpG a la cantidad de colesterol está en una relación de aproximadamente 1:1 en peso. En aspectos de la invención, la cantidad del oligonucleótido de CpG con respecto a la cantidad de colesterol es menor que la cantidad de colesterol. En aspectos de la invención, la relación de la cantidad del oligonucleótido de CpG a la cantidad de colesterol es de aproximadamente 1:100, o aproximadamente 1:75, o aproximadamente 1:50, o aproximadamente 1:25, o aproximadamente 1:15, o aproximadamente 1:10, o aproximadamente 1:5 en peso. En un aspecto, la relación de la cantidad del oligonucleótido de CpG a la cantidad de colesterol es de aproximadamente 1:10 en peso. Un experto en la materia se daría cuenta de que las relaciones dadas pueden ser como se muestra o pueden ser aproximadamente como se muestra.

Como se usa en el presente documento, Los términos "trastorno", "dolencia" y "enfermedad" se usan de manera indistinta.

En aspectos de la invención, las vacunas son útiles como vacuna profiláctica para la prevención de una infección (por ejemplo, una enfermedad infecciosa), un trastorno asociado con un autoantígeno, o un trastorno asociado con una sustancia adictiva. Preferentemente, se usa la vacunación profiláctica en sujetos a los que no se les ha diagnosticado la dolencia para la cual se busca la vacuna, y más preferentemente, los sujetos se consideran en riesgo de desarrollar una de estas dolencias. Por ejemplo, el sujeto puede ser uno que está en riesgo de desarrollar una infección con un organismo infeccioso, o susceptible a un trastorno asociado con un autoantígeno, o susceptible a un trastorno asociado con una sustancia adictiva.

Un sujeto en riesgo, como se usa en el presente documento, es un sujeto que tiene algún riesgo de exposición a un patógeno que produce una infección, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa crónica o resistente al tratamiento, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una alergia, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar asma, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con una sustancia adictiva, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno que implica un plegamiento anómalo de la proteína, o un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario. Un sujeto en riesgo incluye también sujetos que tienen una predisposición a desarrollar dichos trastornos. Algunas predisposiciones pueden ser genéticas (y pueden por tanto identificarse tanto mediante análisis genético como mediante los antecedentes familiares). Algunas predisposiciones son ambientales (por ejemplo, exposición previa a agentes infecciosos, autoantígenos o sustancias adictivas). Para un sujeto en riesgo de desarrollar una infección, un ejemplo de dicho sujeto es un sujeto vivo en o que espera viajar a una zona donde está o se ha encontrado un tipo particular de agente infeccioso o puede ser un sujeto que debido al estilo de vida o a procedimientos médicos está expuesto a un organismo tanto directa como indirectamente por contacto con fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos. Los sujetos en riesgo de desarrollar infección incluyen también poblaciones generales a las cuales un organismo médico recomienda la vacunación para

un organismo infeccioso concreto.

Un sujeto es un ser humano o un animal no humano tratado mediante medicina veterinaria. Los sujetos animales no humanos incluyen, aunque no de forma limitativa, un perro, un gato, un pájaro, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un primate no humano (por ejemplo, mono, chimpancé) y un pescado (especies de acuicultura, por ejemplo, salmón).

Una enfermedad infecciosa, como se usa en el presente documento, es una enfermedad que surge de la presencia de un microorganismo extraño en el cuerpo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito o un hongo.

En aspectos de la invención, una bacteria incluye, aunque no de forma limitativa, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaliges eutrophus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, especies de *Bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, especies de *Bacteroides*, especies de *Bordetella*, *Bordetella bronchiseptica*, *Borrelia burgdorferi*, especies de *Brucella*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, especies de *Brachyspira*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, especies de *Camphylobacter*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, especies de *Chlamydophila*, *Chromobacterium viscosum*, especies de *Clostridium*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, especies de *Corynebacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Ehrlichia canis*, especies de *Enterobacter*, *Enterobacter aerogenes*, especies de *Enterococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, especies de *Escherichia*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Haemophilus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, especies de *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter suis*, especies de *Klebsiella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lawsonia intracellularis*, especies de *Legionella*, *Legionella pneumophila*, especies de *Leptospira*, such as *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii hardjoprajitno*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira*, *Leptospira bratislava*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Meningococcal bacteria*, especies de *Moraxella*, especies de *Mycobacterium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansaii*, *Mycobacterium gordonae*, especies de *Mycoplasma*, tales como, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, especies de *Neisseria*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Odoribacter denticanis*, especies de *Pasteurella*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, especies de *Proteus*, *Proteus vulgaris*, especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens C9*, *Pseudomonas fluorescens SIKW1*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp B11-1*, *Psychrobacter rimmobilis*, *Rickettsia spp*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, especies de *Salmonella*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enterica*, *Salmonella newport*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, especies de *Shigella*, *Spirulina platensis*, especies de *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, especies de *Streptococcus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus beta hemolíticos*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* (subespecies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptomyces exfoliatus*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis sp.*, especies de *Treponema*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema palladium*, *Treponema pertenue*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, especies de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, especies de *Yersinia* y combinaciones de las mismas.

En aspectos de la invención, un virus incluye, aunque no de forma limitativa, Virus del herpes aviar, Gripe aviar, Virus de la leucosis aviar, Paramixovirus aviar, Virus de la enfermedad de Border, Coronavirus bovino, Virus de la fiebre efímera bovina, Virus del herpes bovino, Virus de la inmunodeficiencia bovina, Virus de la leucemia bovina, Virus 3 paragripal bovino, Virus sincitial respiratorio bovino, Virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), BVDV de Tipo I, BVDV de Tipo II, Adenovirus canino, Coronavirus canino (CCV), Virus del moquillo canino, Virus del herpes canino, Virus del herpes equino, Virus de la gripe canina, Virus paragripal canino, Parvovirus canino, Coronavirus respiratorio canino, Virus de la peste porcina clásica, Virus de la encefalitis equina oriental (EEE), Virus de la anemia infecciosa equina, Virus de la gripe equina, Virus del Nilo occidental, Calicivirus de felino, Coronavirus entérico de felino, Virus de la inmunodeficiencia felina, Virus de la peritonitis infecciosa felina, Virus del herpes felino, Virus de la gripe felina, Virus de la leucemia felina (FeLV), Virus de la rinotraqueítis vírica de felino, Lentivirus, Virus de la enfermedad de Marek, Virus de la enfermedad de Newcastle, Virus del herpes ovino, Paragripal 3 de ovino, Virus de la neumonía progresiva, Virus de adenocarcinoma pulmonar ovino, VCC pantrópico, Circovirus de porcino (PCV) de Tipo I, PCV de Tipo II, Virus de la diarrea epidérmica de porcino, Virus de la encefalomielitis hemaglutinante de porcino, Virus del herpes porcino, Parvovirus de porcino, Virus del síndrome reproductor y respiratorio de porcino (PRRS), Virus de la pseudorabia, Rabia, Rotovirus, Rinovirus, Virus de la peste bovina, Virus de la gripe porcina, Virus de lagastroenteritis transmisible, Coronavirus de pavo, Virus de la encefalitis equina venezolana, Virus de la estomatitis vesicular, Virus del Nilo occidental, Virus de la encefalitis equina occidental y combinaciones de los

mismos.

En aspectos de la invención, un parásito incluye, aunque no de forma limitativa, una proteína de Anaplasma, Fasciola hepatica (parásito hepático), Coccidia, Eimeria spp., Neospora caninum, Toxoplasma gondii, Giardia, Dirofilaria (filarias), Ancylostoma (anquilostomas), Trypanosoma spp., Leishmania spp., Trichomonas spp.,
 5 Cryptosporidium parvum, Babesia, Schistosoma, Taenia, Strongyloides, Ascaris, Trichinella, Sarcocystis, Hammondia, o Isopora, y sus combinaciones. En aspectos, un parásito incluye, aunque no de forma limitativa, garrapatas, incluyendo especies de Ixodes, Rhipicephalus, Dermacentor, Amblyomma, Boophilus, Hyalomma, o Haemaphysalis, y combinaciones de los mismos.

En aspectos de la invención, Un hongo incluye, aunque no de forma limitativa, esporas, mohos y levaduras (por
 10 ejemplo, especies de *Candida*).

Una enfermedad infecciosa crónica o resistente al tratamiento, como se usa en el presente documento, es una enfermedad que tiene un periodo de infección prolongado, que dura algunas veces semanas, meses e incluso toda la vida, o una infección que resiste otros tratamientos que son normalmente satisfactorios. En algunos aspectos, una
 15 infección vírica crónica o resistente al tratamiento incluye, aunque no de forma limitativa, VHB, VHC, VIH, VPH, VHS-1 o VHS-2.

En aspectos de la invención, un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. los cánceres o tumores incluyen, aunque no de forma limitativa, cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello de útero; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer colorrectal; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico;
 20 glioblastoma; neoplasmas intraepiteliales; linfomas (por ejemplo, linfoma folicular); cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); leucemia (por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia cutánea de linfocitos T); melanoma (por ejemplo, melanoma maligno); mieloma múltiple; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; cáncer renal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer de testículos; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros
 25 carcinomas y sarcomas (por ejemplo, carcinoma escamocelular, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga, o carcinoma de colon).

En aspectos de la invención, un sujeto que tiene una alergia es un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las dolencias alérgicas incluyen, aunque no de forma limitativa, eczema, rinitis alérgica o
 30 rinitis, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (ronchas) y alergias alimentarias, y otras dolencias atópicas.

En la actualidad, las enfermedades alérgicas se tratan generalmente mediante la inyección de pequeñas dosis de antígeno seguido por una dosificación creciente posterior de antígeno. Se cree que este procedimiento induce la tolerancia al alérgeno para evitar reacciones alérgicas adicionales. Estos procedimientos, sin embargo, pueden
 35 tardar algunos años en ser eficaces y se asocian con el riesgo de efectos secundarios tales como choque anafiláctico.

Las alergias están producidas generalmente por la generación de anticuerpos IgE contra alérgenos perjudiciales. Las citoquinas que están inducidas por la administración sistémica o mucosal de ácidos nucleicos inmunoestimuladores son predominantemente de una clase denominada Th1 (los ejemplos son IL-12 e IFN-gamma)
 40 y estas inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares. Los tipos de anticuerpos asociados con una respuesta Th1 son generalmente más protectores debido a que tienen altas capacidades de neutralización y opsonización. El otro tipo mayor de respuesta inmunitaria, que se asocia con la producción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, es una respuesta inmunitaria Th2. Las respuestas Th2 implican predominantemente anticuerpos y estos tienen menos efecto protector frente a la infección y algunos isotipos Th2 (por ejemplo, IgE) se asocian con alergia.
 45 En general, parece que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunitarias de tipo Th2 mientras que las respuestas Th1 proporcionan la mejor protección frente a la infección, aunque respuestas de Th1 excesivas se asocian con una enfermedad autoinmunitaria. Basándose en la capacidad de la una o más moléculas moduladoras de cambiar la respuesta inmunitaria en un sujeto desde una Th2 (que se asocia con la producción de anticuerpos IgE y alergia) a una respuesta Th1 (que es protectora frente a reacciones alérgicas), una dosis eficaz
 50 para inducir una respuesta inmunitaria de una molécula inmunomoduladora puede administrarse a un sujeto para tratar o prevenir una alergia.

En aspectos de la invención, un alérgeno se refiere a una sustancia (por ejemplo, un antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. Los alérgenos incluyen, aunque no de forma limitativa, pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa de animales, esporas y fármacos fúngicos (por ejemplo, penicilina).
 55 Los ejemplos de alérgenos naturales, animales y vegetales incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas específicas de los siguientes géneros: Caninos (*Canis familiaris*); Dermatophagoides (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); Felis (*Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*); Lolium (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); Alder; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia*

vulgaris); Plantago (por ejemplo, Plantago lanceolata); Parietaria (por ejemplo, Parietaria officinalis o Parietaria judaica); Blattella (por ejemplo, Blattella germanica); Apis (por ejemplo, Apis multiflorum); Cupressus (por ejemplo, Cupressus sempervirens, Cupressus arizonica y Cupressus macrocarpa); Juniperus (por ejemplo, Juniperus sabinoides, Juniperus virginiana, Juniperus communis y Juniperus ashei); Thuya (por ejemplo, Thuya orientalis);
 5 Chamaecyparis (por ejemplo, Chamaecyparis obtusa); Periplaneta (por ejemplo, Periplaneta americana); Agropyron (por ejemplo, Agropyron repens); Secale (por ejemplo, Secale cereale); Triticum (por ejemplo, Triticum aestivum);
 Dactylis (por ejemplo, Dactylis glomerata); Festuca (por ejemplo, Festuca elatior); Poa (por ejemplo, Poa pratensis o Poa compressa); Avena (por ejemplo, Avena sativa); Holcus (por ejemplo, Holcus lanatus); Anthoxanthum (por ejemplo, Anthoxanthum odoratum); Arrhenatherum (por ejemplo, Arrhenatherum elatius); Agrostis (por ejemplo, Agrostis alba);
 10 Phleum (por ejemplo, Phleum pratense); Phalaris (por ejemplo, Phalaris arundinacea); Paspalum (por ejemplo, Paspalum notatum); Sorghum (por ejemplo, Sorghum halepensis); y Bromus (por ejemplo, Bromus inermis).

En aspectos de la invención, el asma se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación, que estrecha las vías aéreas y aumenta la reactividad de las vías aéreas a los agentes inhalados. Las citoquinas Th2, por ejemplo, IL-4 e IL-5 están elevadas en las vías aéreas de los sujetos asmáticos. Estas citoquinas
 15 promueven importantes aspectos de la respuesta inflamatoria asmática, incluyendo el cambio de isotipo IgE, la quimiotaxia de los eosinófilos y la activación y el crecimiento de los mastocitos. Las citoquinas Th1, especialmente IFN-gamma, e IL-12, pueden suprimir la formación de los clones Th2 y la producción de citoquinas Th2. Es frecuente el asma, aunque no se asocia exclusivamente con síntomas atópicos o alérgicos.

En aspectos de la invención, un trastorno que implica un plegamiento anómalo de la proteína es un trastorno resultante de una proteína asociada plegada tanto incorrectamente o bien un error en el ADN de un sujeto que conduce al plegamiento incorrecto de una proteína. En aspectos, Un trastorno que implica un plegamiento anómalo de la proteína es un trastorno de amiloidosis, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, EM, o un trastorno priónico, por ejemplo, encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), que incluye, aunque no de forma limitativa, encefalopatía espongiiforme bovina (BSA, enfermedad de las vacas locas), y enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD) en seres humanos. En aspectos, un trastorno que implica un error en el ADN de un sujeto que conduce al plegamiento incorrecto de una proteína incluye, aunque no de forma limitativa, fibrosis quística y cánceres asociados con la proteína p53.
 20
 25

En aspectos de la invención, un trastorno autoinmunitario es cualquier trastorno que implica una respuesta inmunitaria una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo del sujeto frente a sustancias y tejidos (por ejemplo, un autoantígeno) normalmente presentes en el sujeto. En algunos aspectos, un trastorno autoinmunitario es artritis reumatoide (AR), lupus o enfermedad de Crohn.
 30

En aspectos de la invención, un trastorno asociado con un autoantígeno es cualquier trastorno que está producido por un antígeno de las propias células o productos celulares de un sujeto que produce una respuesta inmunitaria en dicho sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un autoantígeno es un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo, o un antígeno que se expresa a partir de elementos retrovíricos endógenos humanos. En algunos aspectos, el antígeno tumoral es uno o más de WT1, MUC1, LMP2, VPH E6 o VPH E7, EGFR o una de sus formas variantes, por ejemplo, EGFRvIII, HER-2/neu, Idiotipo, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Mutante de Ras, gp100, mutante de p53, Proteinasa3 (PR1), bcr-abl, Tirosinasa, Survivina, PSA, hTERT, Puntos de rotura de la translocación del sarcoma, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, Receptor de andrógenos, Ciclina B1, ácido poliisálico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe (animal), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, Anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumain, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-beta, MAD-CT-2, o antígeno 1 relacionado con Fos. Un antígeno asociado con la enfermedad de Alzheimer puede ser tau o β -amiloido. Un antígeno contra un anticuerpo puede ser un antígeno contra un anticuerpo humano, por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno es IgE.
 35
 40
 45

En aspectos de la invención, las vacunas pueden utilizarse en la prevención de una infección vírica respiratoria en un animal. En algunos aspectos, la infección vírica respiratoria es BVDV 1, BVDV 2, IBRV, P13V o BRSV.

En aspectos de la invención, un trastorno asociado con una sustancia adictiva es cualquier trastorno que implica el desarrollo en un sujeto de una adicción a una sustancia adictiva química o biológica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una sustancia adictiva puede ser nicotina o cocaína. En algunas realizaciones, la vacuna para prevenir o tratar la adicción contiene nicotina o un hapteno análogo a nicotina conjugado con un transportador. En algunas realizaciones, el transportador al cual se conjuga la nicotina o el hapteno análogo a nicotina es un toxoide o derivado bacteriano, una exotoxina de *Pseudomonas*, KLH o una partícula análoga a virus. En algunos aspectos, el toxoide bacteriano es un toxoide de la difteria o uno de sus derivados, por ejemplo, CRM₁₉₇. En algunos aspectos, la partícula análoga a virus es HBsAg, HBcAg, bacteriófago Q β de *E. coli*, virus de Norwalk o gripe HA.
 50
 55

Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratado" o "que trata" cuando se utiliza con respecto a una enfermedad infecciosa se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de infección) a la infección con un patógeno, o en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto llegue a infectarse con el patógeno, así como un tratamiento después que el sujeto haya llegado a infectarse
 60

(un sujeto que se ha infectado) a fin de luchar contra la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o evitar que esta llegue a empeorar.

5 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a un cáncer se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer) al cáncer, o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle cáncer, así como un tratamiento después que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con cáncer) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas del desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

10 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a asma o alergia se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de desarrollar asma o alergia) a desarrollar dicho trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle asma o alergia así como un tratamiento después que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con asma o alergia) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas de desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

15 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a un trastorno asociado con una sustancia adictiva se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con una sustancia adictiva) a desarrollar dicho trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con una sustancia adictiva así como el tratamiento después de que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con un trastorno asociado con una sustancia adictiva) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas de desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

25 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a un plegamiento anómalo de la proteína se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado a un plegamiento anómalo de la proteína) a desarrollar dicho trastorno, o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con el plegamiento anómalo de la proteína, así como un tratamiento después que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con un trastorno asociado con un plegamiento anómalo de la proteína) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas del desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

30 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a un trastorno autoinmunitario se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de una enfermedad autoinmunitaria) a desarrollar dicho trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno autoinmunitario así como tratamiento después que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con un trastorno autoinmunitario) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas de desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

40 El término "tratar", "tratado" o "que trata", cuando se usa con respecto a un trastorno asociado con un autoantígeno se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con un autoantígeno) a desarrollar dicho trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con un autoantígeno así como el tratamiento después de que el sujeto (un sujeto que tiene o se ha diagnosticado con un trastorno asociado con un autoantígeno) ha desarrollado dicho trastorno o comience a desarrollar signos o síntomas de desarrollo de dicho trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reducir o eliminar los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitar que lleguen a empeorar.

45 El tratamiento de un sujeto o con las vacunas como se describe en el presente documento, da como resultado la reducción de la infección o la eliminación completa de la infección, la reducción de los signos/síntomas asociados con un trastorno asociado con un autoantígeno o la completa eliminación del trastorno, o la reducción de los signos/síntomas asociados con un trastorno relacionado con una sustancia adictiva o la completa eliminación del trastorno. Un sujeto puede considerarse como tratado si dichos síntomas relacionados con la enfermedad infecciosa, cáncer, alergia, asma, trastorno asociado con el plegamiento anómalo de la proteína, trastorno autoinmunitario, trastorno asociado con un autoantígeno o trastorno asociado con una sustancia adictiva si se reducen, se gestionan o se eliminan como resultado de dicho tratamiento. Para una enfermedad infecciosa, dicho tratamiento abarca también una reducción en la cantidad de agente infeccioso presente en el sujeto (por ejemplo, dichas cantidades pueden medirse utilizando ensayos normalizados tales como ELISA conocidos por las personas normalmente expertas en la materia). Para un cáncer, dicho tratamiento abarca también una reducción en las células o tejidos cancerosos, y/o una reducción en los signos/síntomas asociados con el cáncer. Para una alergia, dicho tratamiento abarca también una reducción en los signos/síntomas asociados con la alergia. Para un asma, dicho tratamiento abarca también una reducción en los signos/síntomas asociados con el asma. Para un trastorno autoinmunitario, dicho tratamiento abarca también una reducción en la respuesta inmunitaria frente al trastorno autoinmunitario, y/o una reducción en los signos/síntomas asociados con el trastorno. Para un trastorno asociado con el plegamiento

anómalo de la proteína, dicho tratamiento abarca también una reducción en la cantidad de proteína anómala, y/o una reducción o reversión en los signos/síntomas asociados con el trastorno. Para un trastorno asociado con un autoantígeno, dicho tratamiento abarca también una reducción en la cantidad de autoantígeno presente en el sujeto o una reducción en la respuesta inmunitaria inducida como resultado del autoantígeno. Para un trastorno asociado con una sustancia adictiva, dicho tratamiento abarca también una reducción en los signos/síntomas asociados con la adicción a la sustancia adictiva.

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, transportadores compatibles, adyuvantes, y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. Para determinadas formulaciones de vacunas que utilizan colesterol, el etanol puede estar sustituido con un tensioactivo farmacéuticamente aceptable y una solución acuosa para solubilizar el colesterol en la formulación acuosa.

Para su uso en terapia, puede administrarse una cantidad eficaz de la una o más moléculas inmunomoduladoras a un sujeto mediante cualquier modo que administre la molécula inmunomoduladora a la superficie deseada. Se puede llevar a cabo la administración de la composición farmacéutica de la presente invención mediante cualquier medio conocido por el técnico experto. Las rutas de administración preferidas incluyen, aunque no de forma limitativa la parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa), tópica a la piel (por ejemplo, transdérmica) o mucosal (por ejemplo, oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, transbucal, intraocular o sublingual). En el caso de tratamiento de cánceres, esto puede incluir administraciones intratumorales.

En aspectos de la invención, "cantidad eficaz" de un oligonucleótido de CpG se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido de CpG para tratar un trastorno sería la cantidad necesaria para eliminar una infección microbiana o un tumor. Una cantidad eficaz para su uso como un adyuvante de vacuna sería la cantidad útil para reforzar la respuesta inmunitaria de un sujeto a una vacuna. Una "cantidad eficaz" para tratar una enfermedad infecciosa, un cáncer, una alergia, asma, un trastorno autoinmunitario, un trastorno asociado con el plegamiento anómalo de la proteína, un trastorno asociado con un autoantígeno o un trastorno asociado con una sustancia adictiva puede ser la cantidad útil para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La cantidad eficaz para cualquier aplicación concreta puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o dolencia que se está tratando, la molécula inmunomoduladora concreta que se está administrando, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o dolencia. Una persona normalmente experta en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una molécula inmunomoduladora concreta sin necesitar una experimentación excesiva.

Las dosis sujeto de los compuestos descritos en el presente documento para la administración local varían normalmente de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 50 mg por administración que, dependiendo de la aplicación, se podría administrar diariamente, semanalmente, o mensualmente y cualquier otro lapso de tiempo entre los citados. De forma más normal, las dosis locales varían de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg por administración, y, opcionalmente, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, con 2-4 administraciones separadas días o semanas entre sí. Más normalmente, las dosis inmunoestimuladoras varían de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg por administración, y, lo más normalmente, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis sujeto de los compuestos descritos en el presente documento para la administración parenteral con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, en las que los compuestos se administran con un antígeno pero no con otro agente terapéutico son normalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.000 veces mayores que la dosis local eficaz para aplicaciones de adyuvantes de vacunas o de inmunoestimuladores, y más normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 veces mayores, y lo más normalmente de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 veces mayores. Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento para la administración parenteral, por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria innata, para aumentar ADCC, para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno cuando la una o más moléculas inmunomoduladoras se administran combinadas con otros agentes terapéuticos o en vehículos de administración especializados varían normalmente de aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 10 mg por intervalo de administración que, dependiendo de la aplicación, se podría administrar diariamente, semanalmente, o mensualmente y cualquier otro lapso de tiempo entre los citados. de forma más normal, las dosis parenterales para estos fines varían de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 5 mg por administración, y, más normalmente, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, con 2-4 administraciones separadas días o semanas entre sí. En algunas realizaciones, sin embargo, las dosis parenterales para estos fines pueden utilizarse en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.000 veces mayor que las dosis típicas descritas anteriormente.

Para cualquier compuesto descrito en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse también a partir de datos humanos de las moléculas inmunomoduladoras que se han ensayado en seres humanos (por ejemplo, se han iniciado ensayos clínicos en seres humanos) y para los compuestos que se sabe que presentan actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ejemplo, LT y otros antígenos a fines de vacunación. Se pueden requerir dosis mayores para la administración parenteral. La dosis aplicada puede ajustarse basándose en la biodisponibilidad y potencia relativas del compuesto administrado. Ajustar la dosis para conseguir la eficacia máxima basándose en los procedimientos descritos anteriormente y otros procedimientos como es bien

conocido en la técnica está bien comprendido en las capacidades del técnico normalmente experto.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier ruta descrita en el presente documento.

5 Las vacunas de la presente invención, cuando es deseable administrarlas sistémicamente, pueden formularse para su administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

10 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de las moléculas inmunomoduladoras en forma soluble en agua. Además, pueden prepararse suspensiones de las moléculas inmunomoduladoras como suspensiones oleosas adecuadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de las moléculas inmunomoduladoras para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

15 Se puede diluir o aumentar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes incluirían hidratos de carbono, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos y/o almidón modificado. Se pueden usar también determinadas sales inorgánicas como cargas que incluyen trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y/o cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

20 Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, puede añadirse un tensioactivo como un agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y/o dioctil sulfonato de sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos e incluirían cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que se incluiría en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y/o 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y/u 80, éster de sacarosa ácido graso, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. En aspectos, los detergentes no iónicos incluyen, aunque no de forma limitativa, octoxinoles, por ejemplo, t-octilfenoxi polietoxietanol (TRITON X-100™), ésteres de polioxietileno, por ejemplo, polioxietileno monooleato de sorbitán (TWEEN 80™), derivados de sales biliares y ácido cólico, por ejemplo, desoxicolato de sodio o taurodesoxicolato. En aspectos, una formulación puede comprender 3D-MPL, laureth 9, TRITON X-100™, TWEEN 80™, y desoxicolato de sodio. Estos tensioactivos estarían presentes en la formulación de las moléculas inmunomoduladoras tanto solos o como en una mezcla en diferentes relaciones.

35 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de las moléculas inmunomoduladoras en forma soluble en agua. Además, pueden prepararse suspensiones de las moléculas inmunomoduladoras como suspensiones oleosas adecuadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de las moléculas inmunomoduladoras para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Alternativamente, las moléculas inmunomoduladoras pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes del uso.

45 Para la administración oral, los compuestos (por ejemplo, moléculas inmunomoduladoras solas o con uno o más antígenos, colesterol y/u otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente combinando las moléculas inmunomoduladoras con transportadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos transportadores permiten a las moléculas inmunomoduladoras de la invención formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para uso oral como un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una de sus sales tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales pueden también formularse en solución salina o tampones, es decir, EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún transportador.

Se contemplan también formas de dosificación orales de los agentes o formulaciones anteriores. Los agentes o formulaciones pueden modificarse químicamente para que la administración oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto al propio agente o formulación, donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. Se desea también el aumento en la estabilidad global del agente o formulación y el aumento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de dichos restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., págs. 367-383; Newmark, y col., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que podrían utilizarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Preferidos para la utilización farmacéutica, como se ha indicado anteriormente, son los restos de polietilenglicol.

Se contempla también la administración intranasal de una composición farmacéutica de la presente invención. La administración intranasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente sanguíneo directamente tras administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para la administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano. En aspectos, una formulación para la administración intranasal (o administración mucosal) puede comprender 3D-MPL, laureth 9, TRITON X-100™, TWEEN 80™, y desoxicolato de sodio. En aspectos, dicha formulación puede combinarse con un antígeno, por ejemplo, un antígeno del virus de la gripe.

Para la administración intranasal, un dispositivo útil es una botella dura pequeña a la cual se une un pulverizador de dosis medida. En aspectos, la dosis medida se administra extrayendo la composición farmacéutica de la presente solución de la invención a una cámara de volumen definido, donde dicha cámara tiene una apertura dimensionada para aerosolizar una formulación en aerosol formando una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En aspectos, la cámara tiene es una disposición de tipo pistón. Dichos dispositivos están comercialmente disponibles.

Alternativamente, una botella de plástico flexible con una apertura o abertura dimensionada para aerosolizar una formulación en aerosol formando una pulverización cuando se aprieta la botella. La abertura se encuentra usualmente en la parte superior de la botella, y la parte superior de la botella es generalmente cónica para encajar parcialmente en los pasos nasales para una administración eficaz de la formulación en aerosol. En aspectos, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación en aerosol, para la administración de una dosis medida del fármaco.

Para la administración transbucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de una manera convencional.

Los compuestos pueden también formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también transportadores o excipientes sólidos o en fase gel adecuados. Los ejemplos de dichos transportadores o excipientes incluyen, aunque no de forma limitativa, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

Las formas de preparación farmacéutica líquida o sólida adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, aglomeradas para implante en la piel, o secas en un objeto puntiagudo para que se raspen en la piel. Las composiciones farmacéuticas incluyen también gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes se usan habitualmente como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de los procedimientos para la administración de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

Las moléculas inmunomoduladoras y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos pueden administrarse per se (puros) o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse de forma conveniente sales no farmacéuticamente aceptable para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen, aunque no de forma

limitativa, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y benceno sulfónico. Además, dichas sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

- 5 Las formulaciones pueden comprender también un ácido biliar o uno de sus derivados. En aspectos, este puede estar en la forma de una sal. En aspectos, los derivados incluyen, aunque no de forma limitativa, derivados de ácido cólico y sus sales. En aspectos, se contemplan sales de sodio de ácido cólico o derivados de ácido cólico. En aspectos, los ácidos biliares y sus derivados incluyen, aunque no de forma limitativa, ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y sus derivados, por ejemplo, derivados glico-, tauro-, amidopropil-1-propanosulfónico-, amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los ácidos biliares anteriormente mencionados, o N,N-bis(3D gluconoamidopropil) desoxicolamida. En aspectos, desoxicolato de sodio (NaDOC) puede estar presente en una vacuna de la invención.

- 10 Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

- 15 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de uno o más oligonucleótidos de CpG aislados y uno o más antígenos, colesterol y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos incluidos opcionalmente en un transportador farmacéuticamente aceptable. La expresión transportador farmacéuticamente aceptable significa una o más cargas sólidas o líquidas compatible, diluyentes, o sustancias encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término transportador denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el principio activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas son también capaces de mezclarse con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de una manera tal que no existe interacción que pudiera deteriorar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Colesterol como vehículo de administración para obtener datos de inmunogenicidad y eficacia de CpG ODN

- 30 El uso de liposomas que contienen lípidos catiónicos con colesterol ha mostrado una eficacia potenciada de CpG ODN. Se ensayó el uso de microesferas de colesterol, sin lípidos adicionales, como adyuvante para aumentar la inmunidad celular. Se inmunizaron ratones C57Bl/6 (n = 5 por grupo) por vía intramuscular en los días 0, 14 y 21 con ovoalbúmina (10 µg), CpG solo (CPG 24555, 10 µg), y CpG (CpG 24555, 10 µg) con colesterol (1 µg). Se midieron linfocitos T específicos de antígeno (CD4+ y CD8+) que secretan citoquinas únicas, dobles o triples (IL-2, IFN-γ y TNF-α) en el día 28 utilizando citometría de flujo.

Resultados y discusión:

- 40 CpG + colesterol potenció la población de linfocitos CD8+ polifuncionales en comparación con CpG solo. CpG solo y CpG + colesterol dieron como resultado linfocitos CD4+ que producen citoquinas únicas y dobles (Figura 1a). CpG + colesterol dio como resultado linfocitos CD4+ que producen citoquinas triples (Figura 1b). CpG solo y CpG + colesterol dieron como resultado linfocitos CD8+ que producen citoquinas únicas, dobles y triples (Figuras 1c y 1d).

Se mostró una secreción potenciada de IL-2 específica de antígeno (Figura 2a) e IFN-γ (Figura 2b) (citoquinas sesgadas a Th1) con CpG + colesterol. No se mostró potenciación en las citoquinas proinflamatorias o sesgadas a Th2.

- 45 Se midieron las respuestas de los linfocitos T citotóxicos a CpG solo y CpG + colesterol. CpG + colesterol potenció las respuestas de los linfocitos T citotóxicos específicas de ovoalbúmina (Figuras 3a y 3b) y se aumentó la población de linfocitos T CD8 específicos de antígeno (Figuras 3c y 3d) en comparación con CpG solo. El colesterol solo mostró niveles similares al control sin adyuvante.

- 50 Se midieron las respuestas humorales a CpG solo y CpG + colesterol. CpG + colesterol mostró un título de anticuerpo específico de ovoalbúmina potenciado y un sesgo a Th1 sobre CpG solo (Figura 4). Los números encima de cada barra representan la relación de IgG2c/IgG1. En ratones, una IgG2a o 2c mayor es indicativa de una respuesta inmunitaria sesgada a Th1 mientras que un título de IgG1 mayor es indicativo de una respuesta inmunitaria sesgada a Th2. Para CpG y CpG + colesterol, la cantidad de IgG2c fue mayor que IgG1 (2,04 y 4,66 respectivamente) que es indicativo de una respuesta inmunitaria sesgada a Th1.

En cada caso, el colesterol solo no mostró significativa actividad adyuvante.

La administración simultánea de antígeno y CpG, y de antígeno con CpG + colesterol, no mostró retardo de la movilidad de CpG en electroforesis. Se observó la misma cantidad de CpG en sobrenadantes de CpG + colesterol cuando se cuantificó mediante UV en comparación con CpG libre. Esto sugiere que no hubo una fuerte asociación de CpG con colesterol.

- 5 La inmunización subcutánea fue menos eficaz que la inyección intramuscular, lo que no sugiere evidencias de administración simultánea. Sin embargo, la administración simultánea parece tener algún papel, ya que una formulación simultánea del antígeno y CpG demuestra la respuesta más fuerte.

10 Sin pretender quedar limitado a teoría particular alguna, la microscopía de transmisión de electrones (TEM) sugirió que el colesterol formó micelas helicoidales insolubles que pueden interactuar con las membranas celulares para permitir la administración de CpG (Figura 5).

Ejemplo 2: Inmunogenicidad, seguridad y eficacia de una vacuna inactivada pentavalente (IBR, BRSV, P13, BVDV1 y 2) en terneros frente al estímulo de BVDV-2

15 Se midieron las reacciones en los sitios de inyección en terneros inmunizados con la vacuna vírica inactivada pentavalente del virus de la diarrea bovina (BVDV 1 y 2, rinotraqueitis bovina infecciosa (IBRV), virus paragripal 3 (PI3V) y virus sincitial respiratorio de bovino (BRSV) (con respecto al antígeno vírico al 15 % de una dosis de 2 ml) en presencia de un adyuvante. Se administraron adyuvantes de CpG + colesterol (a relaciones de 1:1 o 1:10 CpG:colesterol), Advasure-DEAE/Dextrano, QCDCR (complejo de saponina transportador) o QCDCR + CpG. Algunos animales se inmunizaron con la vacuna comercial. Los animales placebo recibieron solución salina estéril. Se vacunaron terneros (7/gp); de 9-12 meses de edad) en el día 0 y el día 22 por vía subcutánea con 2 ml de BVDV 1 y 2, IBRV, PI3V y BRSV inactivados y se estimularon con 4 ml de BVDV-2 (Virus de la diarrea vírica bovina no citopático de Tipo 2; Cepa 24515) por vía intranasal en el día 42.

25 Los adyuvantes usados en las vacunas de cada grupo de tratamiento fueron del siguiente modo: El Grupo de Tratamiento T01 recibió solución salina estéril (sin adyuvante). El Grupo de Tratamiento T02 recibió una vacuna en la que el adyuvante era la emulsión oleosa contenida en una vacuna comercial. El Grupo de Tratamiento T03 recibió una vacuna en la que el adyuvante era CpG-23877 (250 µg)/colesterol (250 µg), proporcionando por tanto una relación de CpG:colesterol de 1:1. El Grupo de Tratamiento T04 recibió una vacuna en la que el adyuvante era CpG-23877 (250 µg)/colesterol (2.500 µg), proporcionando por tanto una relación de CpG:colesterol de 1:10. El Grupo de Tratamiento T05 recibió una vacuna en la que el adyuvante era Advasure®, una emulsión oleosa que contiene DEAE-DEXTRANO (100 mg) e ISC (800 µg). El Grupo de Tratamiento T06 recibió una vacuna en la que el adyuvante era Quil A (250 µg), colesterol (250 µg), bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA; 100 µg), Carbopol® (0,0375 µg), e hidroacetato de N-(2-Desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida, conocido también por el nombre comercial Bay R1005® (1.000 µg). Esta combinación de componentes se denomina en el presente documento QCDCR. El Grupo de Tratamiento T07 recibió una vacuna en la que el adyuvante era QCDCR (en las cantidades proporcionadas en T06) y CpG 23877 (250 µg).

35 Se recogieron muestras de sangre en los días 0, 22, 42 y 56 y se analizaron utilizando ELISA para los títulos del anticuerpo IgG. Se desarrolló el ELISA de BVDV y se optimizó a PAH utilizando el fragmento p67 H de BVDV como antígeno. En resumen, placas NUNC Maxisorp se revistieron con 0,2 µg/ml de fragmento p67 H recombinante de antígeno de BVDV en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación se descartó el antígeno de revestimiento y las placas se humedecieron y bloquearon utilizando ovoalbúmina al 1 % en PBS-Tween (300 µl/pocillo) durante 1 h a 37 °C. A continuación se retiró el tampón de bloqueo y se añadieron las muestras de suero diluidas (siete diluciones en serie de 5 veces; comenzando a 1:50) y se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C. Se lavaron las placas cuatro veces en PBS-T (0,05 % Tween 20) antes de añadir 100 µl de anticuerpo de oveja dirigido contra IgG de bovino conjugado con h+I-HRP en tampón de bloqueo (1:4.000) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron las placas de nuevo en PBS-T como se ha descrito anteriormente y se añadió sustrato TMB (100 µl/pocillo). Tras la incubación durante 5-10 minutos, se detuvo la reacción utilizando ácido sulfúrico 2 N (50 µl/pocillo) y se midió la densidad óptica (DO) DO a 450 nM. Los resultados se expresaron como la media geométrica de los títulos.

Resultados y discusión

50 Los síntomas del estímulo de BVDV-2 son fiebre, leucopenia (aproximadamente una disminución del 40 % en el recuento de WBC a partir de la media del recuento de WBC previo al estímulo) desde el día 3 al 12 tras el estímulo y la inmunomodulación, trombocitopenia, insuficiencia respiratoria, depresión, trastornos de la reproducción (aborto) y diarrea. La inmunidad protectora frente a BVDV es una respuesta inmunitaria de tipo Th-1. La inmunidad mediada por células está mediada por linfocitos T CD4+. Los linfocitos T CD8+ son importantes para el aclaramiento del virus y las respuestas de memoria. IFN-α e IFN-γ son protectores frente a la infección por BVDV. Las vacunas deben generalmente inducir CMI y la inmunidad humoral frente a BVDV. La Tabla 1 representa el porcentaje de terneros con enfermedad clínica, fiebre, leucopenia o viremia tras la estimulación con BVDV-2 después de la vacunación con la vacuna vírica inactivada pentavalente BVDV 1 y 2, IBRV, PI3V y BRSV en presencia de CpG + colesterol (en las relaciones 1:1 (T03) o 1:10 (T04) de CpG:colesterol), Advasure-DEAE/Dextrano (T05), QCDCR (T06), QCDCR + CpG (T07), vacuna comercial (T02) o solución salina estéril (T01).

Tabla 1. Porcentaje de terneros con enfermedad clínica, fiebre, leucopenia o viremia

Grupo de tratamiento	% clínicamente enfermo	% de fiebre	% leucopénico	% virémico
Control no vacunado (PBS)	42,9	85,7	100	100
vacuna comercial	57,1	14,3	100	85,7
5V+CpG Colesterol (1:1)	14,3	0	42,9	28,6
5V+CpG Colesterol (1:10)	0	14,3	71,4	0
5V + Advasure DEAE-Dextrano/ISC	66,7	33,3	83,3	33,3
5V+QCDCR	57,1	28,6	85,7	42,9
5V+QCDCR-CpG (1:1)	42,9	14,3	71,4	0

Las vacunas administradas a terneros en los grupos T02 (vacuna comercial), T03 (CpG:colesterol 1:1), T04 (CpG colesterol 1:10), T05 (Advasure-DEAE/Dextrano), T06 (QCDCR) y T07 (QCDCR + CpG) fueron superiores en la supresión de la fiebre en comparación con los controles de solución salina. Las vacunas administradas a terneros en T03 (CpG:colesterol 1:1), T04 (CpG:colesterol 1:10), T05 (Advasure-DEAE/Dextrano), T06 (QCDCR) y T07 (QCDCR + CpG) fueron superiores en la supresión de la viremia en comparación con la vacuna comercial (T02) y los grupos con solución salina (T01). T04 y T07 suprimieron la viremia completamente y los terneros con la vacuna comercial (T02) fueron virémicos durante un periodo más corto que los controles. Aunque no se evitó totalmente la leucopenia en ninguno de los grupos vacunados, se observó un efecto vacuna durante múltiples días entre T03 (CpG:colesterol 1:1), T04 (CpG:colesterol 1:10), T05 (Advasure-DEAE/Dextrano), T06 (QCDCR) y T07 (QCDCR + CpG) en comparación con los grupos del control y la vacuna comercial (T02). Los terneros en los grupos T03 y T04 experimentaron menos enfermedad clínica en comparación con los otros grupos. En su conjunto, los datos sugieren que las vacunas que contienen CpG (T03, T04 y T07), tales como CpG de clase P modificado en E, demostraron una eficacia potenciada y estas vacunas fueron más eficaces que la vacuna comercial.

En la Figura 6a se muestran las reacciones en el sitio de inyección que se desarrollaron tras la administración de los adyuvantes. La vacuna comercial (T02) y las vacunas Advasure-DEAE/Dextranos (T05) fueron más reactivas que las otras vacunas ensayadas. Las vacunas que contienen QCDCR + CpG (T07) y CpG + colesterol (T03 y T04) fueron las más seguras. En terneros inmunizados con CpG + colesterol, todos los síntomas del estímulo de BVDV-2 se redujeron en comparación con los animales del control no vacunados.

La primera dosis de vacuna administrada indujo un bajo nivel de títulos de anticuerpos neutralizantes en suero. Todas las vacunas ensayadas indujeron una seroconversión del 100 % en los antígenos de BVDV 1 e IBRV en el día 42. Todas las vacunas ensayadas, excepto la vacuna Advasure-DEAE/Dextrano (T05), indujeron una seroconversión del 100 % en BVDV 2 en el día 42. La vacuna Advasure-DEAE/Dextrano (T05) indujo una seroconversión del 83 % en el día 42. Tras el estímulo, las respuestas de los anticuerpos contra BVDV 1 y BVDV 2 se reforzaron hasta niveles significativamente mayores en todos los grupos (Tabla 2).

Tabla 2, parte A

Grupo	títulos con SN de BVDV 2			títulos con SN de BVDV 1		
	Día 22	42	56	Día 22	42	56
T01	1,4 (0/7)	1,0 (0/7)	109,6 (5/7)	1,2 (0/7)	1,0 (0/7)	5,8 (2/7)
T02	2,9 (2/7)	211,5 (7 de 7)	18207,5 (7 de 7)	1,8 (0 de 7)	76,3 (7 de 7)	3119,4 (7 de 7)
T03	2,3 (0 de 7)	69,3 (7 de 7)	4783 (7 de 7)	3,4 (0 de 7)	163,9 (7 de 7)	3530,5 (7 de 7)
T04	3,2 (0 de 7)	129,2 (7 de 7)	11979,8 (7 de 7)	10,8 (7 de 7)	371,1 (7 de 7)	8823,7 (7 de 7)
T05	1,7 (0 de 7)	16,6 (5 de 6)	2598,3 (6 de 6)	3,4 (2 de 7)	362,4 (6 de 6)	8689,6 (6 de 6)
T06	3,1 (0 de 7)	153,6 (7 de 7)	17379,6 (7 de 7)	15,1 (4 de 7)	1217,7 (7 de 7)	24346,5 (7 de 7)
T07	6,7 (3 de 7)	228,3 (7 de 7)	20162,6 (7 de 7)	25,5 (7 de 7)	1103 (7 de 7)	19972,2 (7 de 7)

Tabla 2, parte B

Grupo	títulos con SN de IBR (BHV-1)		
	Día 22	42	56
T01	1,0 (0/7)	1,0 (0/7)	1,0 (0/7)
T02	3,1 (6 de 7)	110,4 (7 de 7)	78,1 (7 de 7)
T03	2,0 (6 de 7)	7,8 (7 de 7)	7,2 (7 de 7)
T04	2,1 (5 de 7)	10,3 (7 de 7)	8,4 (7 de 7)
T05	20,3 (7 de 7)	100,7 (6 de 6)	63,3 (6 de 6)
T06	3,9 (6 de 7)	67 (7 de 7)	46,2 (7 de 7)
T07	5,0 (7 de 7)	57,9 (7 de 7)	41 (7 de 7)
SN - Neutralización del suero			

5 La vacunación primaria respectiva (T02-T07) estimuló las respuestas de anticuerpos IgG específicos de BVDV que se aumentaron mediante la vacunación de refuerzo y mediante el estímulo de BVDV2. No hubo diferencias significativas entre los títulos de IgG entre los grupos.

10 Todas las formulaciones de vacunas fueron inmunógenas e indujeron la neutralización del suero (BVDV 1 y BVDV 2) y los anticuerpos IgG específicos de BVDV que se reforzaron mediante revacunación y estímulo. La protección frente al estímulo de BVDV es mediante inmunidad mediada por células (CM); secreción de IFN γ y activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de BVDV), aunque el anticuerpo puede neutralizar el virus libre y proteger por tanto frente al estímulo si está presente a altos niveles, por ejemplo, en el calostro del que se alimentan los terneros en el nacimiento. Se detectaron respuestas de CMI (tipo Th-1) mediante la secreción de la citoquina IFN γ *in vitro* y se determinaron las respuestas humorales (tipo Th-2) detectando IL-4.

15 Los antígenos de BVDV 1 y BVDV 2 indujeron un bajo nivel de respuestas IFN γ y no hubo diferencias significativas ($P > 0,1$) entre los grupos de tratamiento (no se muestran los datos). El antígeno de BSRV indujo respuesta de IFN γ en todos los grupos excepto en los grupos T01 (solución salina) y T03 (CpG:colesterol 1:1), El antígeno de IBR indujo las respuestas de IFN γ más fuertes en T05 (Advasure-DEAE/Dextrano) y T06 (QCDCR) en todos los días ensayados tras la vacunación y respuestas débiles, pero positivas en T02 (vacuna comercial), T04 (CpG:colesterol 1:10), y T07 (QCDCR + CpG). el antígeno de PI3 indujo respuestas de IFN γ en T02 (vacuna comercial), T05 (Advasure-DEAE/Dextrano), T06 (QCDCR) y T07 (QCDCR + CpG).

20 **Ejemplo 3: Inmunogenicidad en cerdo de una subunidad de vacuna (Pertactina) de Bordetella bronchiseptica formulada con diferentes adyuvantes**

Se evaluaron las respuestas inmunitarias específicas de antígeno de cerdos inmunizados con pertactina (p68) formulada con diversos adyuvantes, incluyendo CpG + colesterol.

25 Los productos veterinarios de investigación (IVP) utilizados en el estudio fueron del siguiente modo: Las vacunas se administraron en dosis de 1 ml. El Grupo de Tratamiento T01 recibió solución salina tamponada con fosfato 20 mM. El Grupo de Tratamiento T02 recibió una vacuna que contenía Quil A (250 μ g), colesterol (250 μ g), bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA; 100 μ g), Carbopol® (0,075 %), Hidroacetato de N-(2-Desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida, conocido también por el nombre comercial Bay R1005® (1.000 μ g). Esta combinación de componentes se denomina en el presente documento QCDCR. La composición contenía también CpG 23878 (250 μ g) y pertactina (10 μ g). El Grupo de Tratamiento T03 recibió una vacuna que contenía colesterol (2.500 μ g), CpG 23877 (250 μ g), y pertactina (10 μ g). El Grupo de Tratamiento T04 recibió una vacuna que contenía colesterol (2.500 μ g), CpG 23878 (250 μ g), y pertactina (10 μ g) El Grupo de tratamiento T05 recibió una vacuna que contenía 6 % de aluminio como Al(OH) $_3$ y pertactina (10 μ g).

35 Sesenta y cuatro (64) cerdos clínicamente sanos con un estado de salud alto de ambos sexos se utilizaron en el estudio. Los cerdos o sus madres no tenían antecedentes de vacunación contra o exposición a *B. bronchiseptica*. Ninguno de los cerdos tenía un título de pertactina positivo (definido como > 200) en el suero recogido en la granja de origen, o en el Día -1.

40 En el Día 0, se vacunaron los cerdos en la parte izquierda del cuello con una dosis de 1,0 ml proporcionada mediante inyección IM. En el Día 21, Se volvieron a vacunar los cerdos con el mismo IVP y dosis como anteriormente, administrada en la parte derecha del cuello. En el lapso de una hora desde cada vacunación, el investigador o el técnico cualificado observaron los cerdos para determinar los eventos adversos inmediatos relacionados con la vacunación.

La variable de resultado principal fueron los títulos del anticuerpo de pertactina en suero (IgG total). Se ensayaron las muestras de suero para determinar los anticuerpos de pertactina utilizando un ELISA. Se revistieron placas Nunc Maxisorp con 50 ng/pocillo de pertactina en tampón carbonato (pH 9,1). Se lavaron las placas y se bloquearon con 1x PBS con Tween 20 al 0,05 % y leche desnatada al 1 % (1 h, TA). Las muestras de suero, diluidas en tampón de bloqueo, se añadieron a las placas, se incubaron (1 h, TA), se lavaron y se incubaron (1 h, TA) con anticuerpo de cabra Bethyl dirigido contra IgG de cerdo (h+I) conjugado con HRP diluido 1:1250 en tampón de bloqueo. Tras un lavado final, se añadió sustrato ABTS (KPL 50-62-00) y se leyeron los valores de la DO después de una incubación de 12 minutos a TA. Los títulos se calcularon basándose en un corte del 20 % del valor de la DO de una dilución 1:1000 de un combinado sérico del control positivo.

Se ensayaron también muestras de suero de T01, T03, T04, T05, y T08 para los anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos de pertactina utilizando un ELISA. Se revistieron placas Nunc Maxisorp con 50 ng/pocillo de pertactina en tampón carbonato (pH 9,1). Se lavaron las placas y se bloquearon con 1x PBS con Tween 20 al 0,05 % y leche desnatada al 1 % (1 h, TA). Las muestras de sueros, diluidas en tampón de bloqueo, se añadieron a las placas, se incubaron (1 h, TA), se lavaron y se incubaron (1 h, TA) con anticuerpos monoclonales (IgG1-Serotec MCA635 o IgG2-Serotec MCA636) diluido 1:100 en tampón de bloqueo. Se incubaron las placas (1 h, TA), se lavaron y se añadió un anticuerpo dirigido contra Ig de ratón conjugado con HRP (Jackson Laboratories) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. Tras un lavado final, se añadió sustrato ABTS (KPL 50-62-00) y se leyeron los valores de la DO después de una incubación de 20 minutos a TA. Se calcularon los títulos de IgG1 basándose en un corte del 50 % del valor de la DO de una dilución 1:1000 de un combinado sérico del control positivo. Se calcularon los títulos de IgG2 basándose en un corte de una DO de 0,2.

Se recogieron PBMC procedentes de sangre heparinizada, se ensayaron para determinar la producción de IFN- γ específica de antígeno. Se ensayó la respuesta de IFN- γ mediante ELISPOT (Th1) para determinar la frecuencia de células secretoras de INF- γ /millones de células SFC/10⁶ a partir de las PBMC (tras sustraer el fondo en los controles del medio). Además, se ajustaron las respuestas de IFN- γ según el índice de estimulación (SI) de las células estimuladas con pertactina en comparación con el control del medio. Se requirió un índice de estimulación de al menos 2X para que la muestra se considerara positiva.

Resultados y discusión

Se vacunaron los cerdos en el día 0 y 21 con las vacunas que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Grupo de vacuna	Adyuvante (Dosis)	Transportador
T01	Ninguno	Ninguno
T02	CpG23878 (250 μ g)	QCDCR
T03	CpG23877 (1:10)	Colesterol
T04	CpG23878 (1:10)	Colesterol
T05	Alhidrogel	Ninguno

Las muestras de sangre para el aislamiento de PBMC y las muestras de suero se tomaron en el día -1, día 7, día 20, día 28 y día 35 y se analizaron. Las muestras de suero se ensayaron para determinar la IgG total, utilizando los anticuerpos IgG1 e IgG2 mediante un ELISA para la pertactina recombinante purificada exenta de LPS. Se obtuvieron anticuerpos isotípicos de Bethyl Labs o AbD Serotec.

Se aumentaron los niveles de IgG específicos de pertactina en los grupos T02 (CpG + QCDCR), T03 (CpG 23877 + colesterol; 1:10) y T04 (CpG 23878 + colesterol; 1:10) en comparación con las otras vacunas ensayadas.

No se notificaron efectos adversos posteriores a la vacunación durante el tiempo de observación inmediatamente después de la vacunación. No se registraron observaciones de reacciones producidas por la vacunación. Los cerdos en el grupo de tratamiento T01 siguieron siendo negativos para los anticuerpos ELISA específicos de pertactina a lo largo del estudio.

todos los cerdos tuvieron títulos ELISA específicos de pertactina negativos (≤ 200) en el Día -1. El porcentaje de cerdos con seroconversión en algún momento después de la vacunación fue del 0 % para T01, 100 % para T02, T03, T04 y T08. El grupo de tratamiento (T02) con el adyuvante CpG n.º 23878 y el transportador QCDCR, tuvo GMT de 906,0 y 24728,5 en los Días 20 y 35 respectivamente, y las GMT en ambos días fueron significativamente mayores ($P \leq 10$) que todos los otros grupos de tratamiento (Tablas 4 y 5). T01, el control negativo, tuvo medias que fueron significativamente menores que los otros grupos en los Días 20 y 35. Las GMT de T08 (formuladas con hidróxido de aluminio) fueron significativamente menores que las GMT de las vacunas de pertactina formuladas con los CpG utilizando los transportadores QCDCR o colesterol (T02, T03, T04) en ambos puntos temporales posteriores

a la vacunación. En la Figura 7 se presenta un gráfico de la respuesta del anticuerpo específico de antígeno en cerdos inmunizados con pertactina (p68) formulada con diversos adyuvantes que incluyen CPG + colesterol.

Tabla 4. Títulos ELISA de IgG total específicos de pertactina en el Día 20

Ajustes por mínimos cuadrados de las medias geométricas, errores estándar, e intervalos de títulos de anticuerpo de cerdos 20 días después de administrar un IVP.

Grupo de tratamiento	Adyuvante	Transportador	Media geométrica	Error estándar	Intervalo
T01	Ninguno	Ninguno	250 ^a	6,88	25 a 25
T02	CpG n.º 23878	QCDCR	906,0 ^b	265,29	428 a 3188
T03	(250 µg)	Colesterol	367,4 ^c	101,10	57 a 973
T04	CpG n.º 23878 (250 µg)	Colesterol	254,2 ^c	69,97	66 a 473
T05	Alhidrogel	Ninguno	46,5 ^d	12,79	25 a 163

a,b,c,d las medias geométricas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P≤ 0,10)

5

Tabla 5. Títulos ELISA de IgG total específicos de pertactina en el Día 35

Ajustes por mínimos cuadrados de las medias geométricas, errores estándar, e intervalos de títulos de anticuerpo de cerdos 35 días después de administrar un IVP.

Grupo de tratamiento	Adyuvante	Transportador	Media geométrica	Error estándar	Intervalo
T01	Ninguno	Ninguno	25,0 ^a	5,79	25 a 25
T02	CpG n.º 23878 (250 µg)	QCDCR	24728,5 ^b	6077,46	10450 a 46473
T03	CpG n.º 23877 (250 µg)	Colesterol	7608,8 ^c	1763,31	4619 a 17106
T04	CpG n.º 23878 (250 µg)	Colesterol	4360,1 ^d	1010,43	1968 a 11829
T05	Alhidrogel	Ninguno	625,6 ^e	144,97	233 a 1997

a,b,c,d,e las medias geométricas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P≤ 0,10)

Se ensayaron muestras procedentes solo de tratamientos seleccionados para los títulos de anticuerpos en suero contra pertactina específicos de isotipo (Tabla 6). La relación IgG2/IgG1 fue de 0,40 para T03 (CpG 23878 formulada con QCDCR) y 2,64 (CpG23878 formulada con colesterol).

10

Tabla 6. Títulos de anticuerpos en suero contra pertactina específicos de isotipo

Trt	Título de la media geométrica de LS								
	Día-1			Día 20			Día 35		
	IgG1	IgG2	Relación *	IgG1	IgG2	Relación *	IgG1	IgG2	Relación *
T01	29,7	25,0	0,84	25,0	25,0	1,00	25,0	25,0	1,00
T02	29,3	25,0	0,85	76,9	51,4	0,67	3255,3	1316,1	0,40
T03	36,5	25,0	0,68	33,6	89,3	2,66	767,7	2027,3	2,64
T04	25,0	25,0	1,00	30,1	29,9	0,99	360,8	501,2	1,39
T05	37,1	25,0	0,67	25,0	25,0	1,00	142,1	215,9	1,52

* relación IgG2/IgG1

se midieron las respuestas promedio de IFN- γ específicas de pertactina mediante el índice de Estimulación (SI) y las células formadoras de manchas (SFC/10⁶). Hubo una considerable variabilidad de las respuestas de IFN- γ específicas de pertactina de los cerdos dentro de los grupos y entre puntos temporales, debido en parte a que solo había 8 sujetos por grupo. Hubo diferencias significativas ($P \leq 0,10$) entre tratamientos en todos los puntos temporales, incluyendo la prevacunación (Día -1). Para todos los puntos temporales posteriores a la vacunación (Días 7, 20, 28 y 35) la media de SI para T02 fue significativamente mayor que T01 y T03. Por el contrario, el SI para T05 no fue diferente de T01 en cualquier punto temporal posterior a la vacunación. El SI par T04 fue significativamente mayor que T01 en los Días 20 y 35. La media de SFC/10⁶ para T02 fue significativamente mayor que T01 y T05 en 3 de 4 puntos temporales posteriores a la vacunación. Las respuestas de IFN- γ (SI y SFC/10⁶) de T03 y T08 no fueron diferentes de T01 en cualquier punto temporal posterior a la vacunación.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir no utilizando más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritos en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Davis, Heather L
Weeratna, Risini
- <120> ANTÍGENOS Y VACUNAS INMUNOMODULADORAS JUNTO CON COLESTEROL Y SUS USOS
- <130> PC33995
- <140> Aún no asignado
- 20 <141> Aún no asignado
- <160> 50
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 24
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética
- <400> 1
- 30 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Secuencia sintética
- <400> 2
- tcgtcgtttt tcggtgctt t 21
- <210> 3
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética
- 45 <400> 3
- tcgtcgtttc gtcgtttgt cgtt 24
- <210> 4
- <211> 22
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 4
 tcgtcgtttt cggcgccgc cg 22

5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 5
 tcgtcgtttt acggcgccgt cccg 24

15

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 6
 tcgtcgtttt cggcgccgc cgt 23

25

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 7
 tcgtcgacga tcggcgccgc ccg 23

35

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 8
 tcgacgtcga tcggcgccgc ccg 23

45

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia sintética

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es un nucleótido modificado con yodo

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> N es uracilo

10

<400> 10
 nncgacgtcg atcggcgcgccg 24

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia sintética

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es un nucleótido modificado con yodo

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> N es uracilo

25

<400> 11
 nncgacgtcg atcggcgcgccgt 25

30

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 12
 cgacgtcgat cggcgcgccg cgt 23

40

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia sintética

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es un nucleótido modificado con etilo

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> N es uracilo

<400> 13
 nncgacgtcg atcggcgcgccg gccg 24

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es un nucleótido modificado con yodo
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> N es uracilo
 <400> 14
 nncgtcgacg atcgcggcc gccgt 25
 15 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es un nucleótido modificado con yodo
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> N es uracilo
 <400> 15
 nncgtcgacg atcgcggcc gccgt 25
 30 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N es inosina
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> N es inosina
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> N es inosina
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> N es inosina
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (9)..(9)
 <223> N es inosina

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (11)..(11)
 <223> N es inosina

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (13)..(13)
 <223> N es inosina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> N es inosina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> N es inosina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N es inosina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N es inosina

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> N es inosina

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N es inosina

35 <400> 16
 ncnncncnc ncnncncnc ncnncnc 26

40 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

45 <400> 17
 ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 18
 ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 19

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 19
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24

10

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

15

<400> **20**
 tcgtcgtttt gtcgttttt tcga 24

<210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 21
 tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21

25

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

30

<400> 22
 tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21

35

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

40

<400> 23
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 24
 tcgtcgtttc gtcgtttgt cggt 24

50

<210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

 <400> 25
 tcgctgtttt gtcgttttt tcga 24
 5 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 10 <400> 26
 tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22

 <210> 27
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 27
 20 tcgctgacgt tcggcgcgcg ccg 23

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia sintética

 <400> 28
 tcggacgttc ggccgcgcgc g 21
 30 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 35 <400> 29
 tcggacgttc ggccgcgcgc 19

 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 30
 tcgcgtcgtt cggcgcgcgc 20
 45 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Secuencia sintética

	<400> 31 tcgacgttcg gcgcgcgcg	20
5	<210> 32 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
10	<400> 32 tcgacgttcg gcgcgcgcg	18
15	<210> 33 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
20	<400> 33 tcgcgtcgtt cggcgcgcg	18
25	<210> 34 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
30	<400> 34 tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg	22
35	<210> 35 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
40	<400> 35 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg	22
45	<210> 36 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
50	<400> 36 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23
55	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Secuencia sintética	
60	<400> 37 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23

<210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 38
 tcgctcgtt cggcgcgcgc cg 22
 10 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 15 <400> 39
 tcgtcgactc tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 40
 tcggacttc ggccgcgcc g 21
 25 <210> 41
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia sintética
 <400> 41
 tcggacttc ggccgcgcc 19
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 42
 40 tcgctcgtt cggcgcgcc 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 43
 tcgacttcg gccgcgccg 20
 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 44
 5 tcgacgttcg gcgcgccc 18
 <210> 45
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 45
 10 tcgctcgttc cggcgccc 18
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 46
 20 tcgctcgttc cggcgccc cg 22
 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 47
 tcgtcgtttt cggcgccc cg 22
 30 <210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 48
 tcgtcgtttt cggcgccc cg 22
 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 49
 45 tcgtcgtttt acggcgccc gccg 24
 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

ES 2 683 316 T3

<223> Secuencia sintética

<400> 50

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende uno o más antígenos y un adyuvante, en la que el uno o más antígenos son cada uno de forma independiente, un antígeno microbiano, un autoantígeno, un antígeno tumoral, un alérgeno, o una sustancia adictiva y el adyuvante consiste en uno o más oligonucleótidos CpG aislados o un agonista del TLR que es un oligorribonucleótido, y colesterol.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que el uno o más antígenos son cada uno de forma independiente, un péptido, un péptido conjugado a una proteína transportadora, un péptido conjugado a una partícula análoga a virus, un polipéptido, una proteína recombinante, una proteína purificada, un patógeno muerto completo, un virus atenuado vivo o un vector vírico que expresa un antígeno, una bacteria atenuada viva o un vector bacteriano que expresa un antígeno, un polisacárido, un polisacárido conjugado a una proteína transportadora, un hapteno, un hapteno conjugado a una proteína transportadora o a una molécula pequeña.
3. La vacuna de la reivindicación 2, en la que el antígeno es de origen bacteriano, de origen vírico o de origen parasítico.
- 15 4. La vacuna de la reivindicación 3, en la que
- a) el antígeno bacteriano es una bacteria muerta completa, una bacteria atenuada viva o proteínas bacterianas purificadas; o
- b) el antígeno vírico es un virus muerto completo, un virus atenuado vivo o proteínas víricas purificadas.
- 20 5. La vacuna de la reivindicación 2, en la que la proteína transportadora es un toxoide o derivado bacteriano, una exotoxina de *Pseudomonas*, KLH o una partícula análoga a virus.
6. La vacuna de la reivindicación 5, en la que
- a) el toxoide bacteriano es un toxoide de la difteria o uno de sus derivados; o
- b) la partícula análoga a virus es HBsAg, HBcAg, bacteriófago Q β de *E. coli*, virus de Norwalk o gripe HA.
- 25 7. La vacuna de la reivindicación 1, en la que
- a) la sustancia adictiva es nicotina o una molécula análoga a nicotina; o
- b) el antígeno tumoral es uno o más de survivina, Her-2, EFGRvIII, PSA, PAP o PMSA.
8. La vacuna de la reivindicación 2, en la que el hapteno conjugado a una proteína transportadora es nicotina o una molécula análoga a nicotina conjugada con el toxoide de la difteria o derivado del mismo.
9. La vacuna de la reivindicación 1, en la que la cantidad de colesterol con respecto a la cantidad de antígeno es de 0,1 a 50 veces mayor en peso, de 1 a 10 veces mayor en peso o igual en peso al antígeno.
- 30 10. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además un transportador farmacéutico.
11. Una vacuna de acuerdo con un cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto que lo necesita, en la que la vacuna se administra en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en el sujeto.

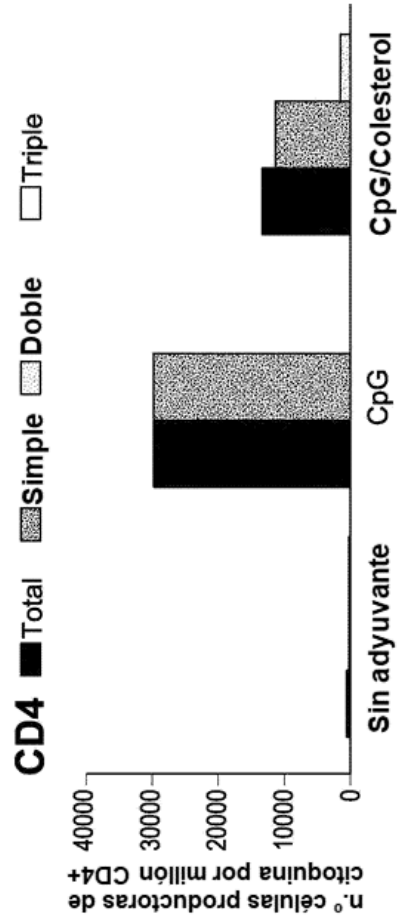


FIG. 1A

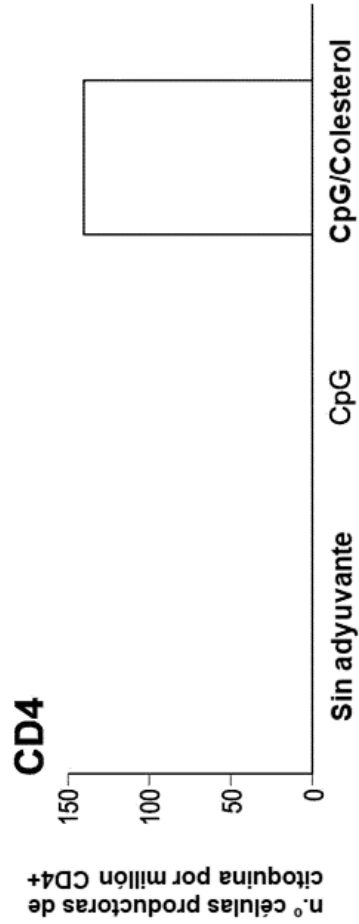


FIG. 1B

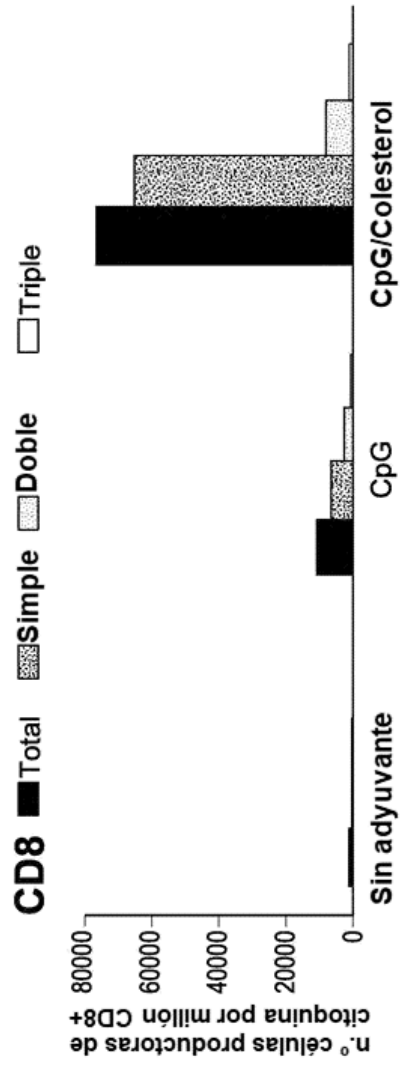


FIG. 1C

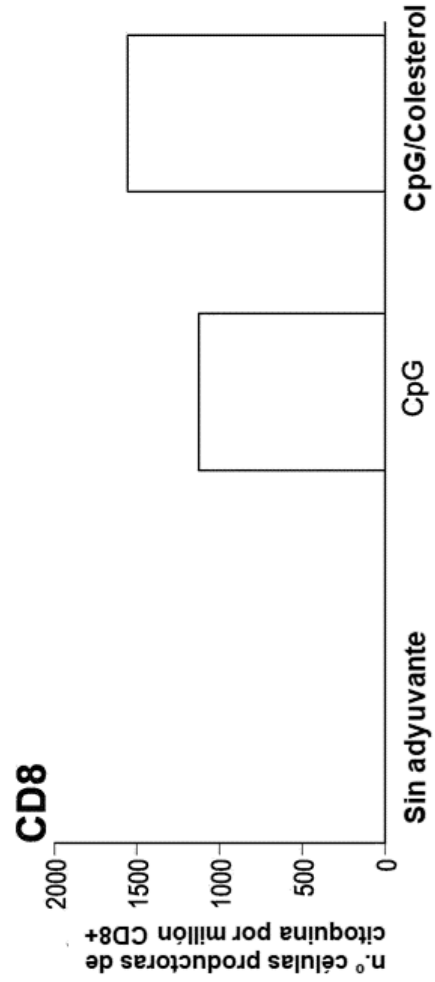


FIG. 1D

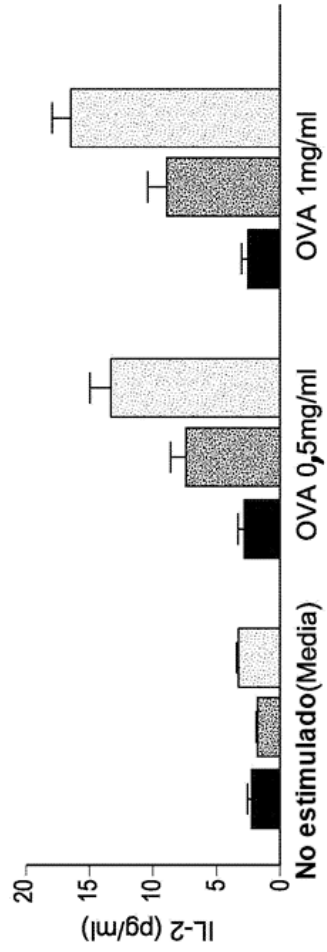


FIG. 2A

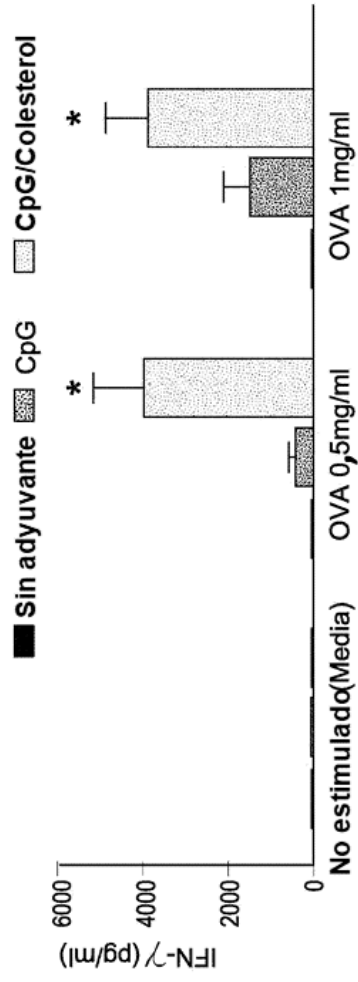


FIG. 2B

FIG. 3A

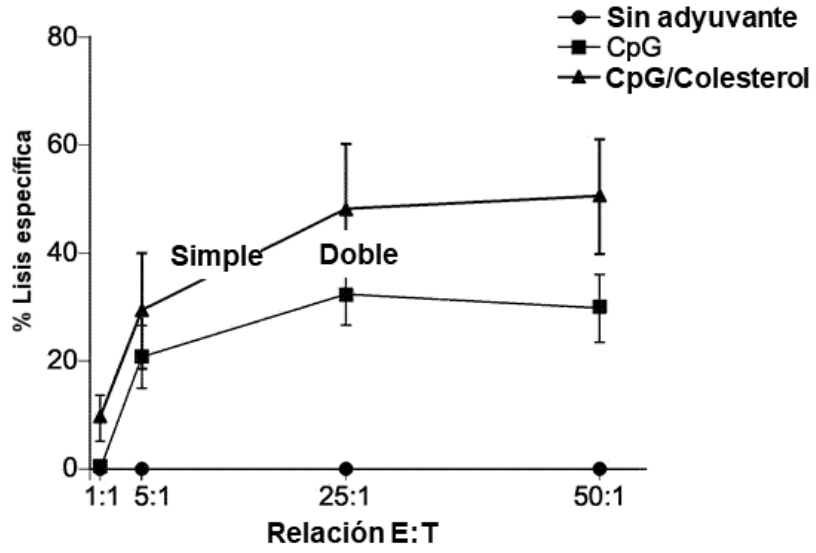


FIG. 3B

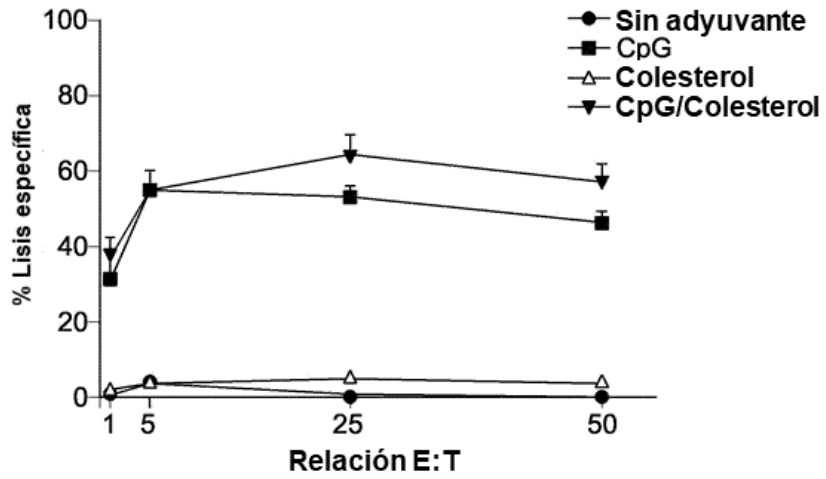


FIG. 3C

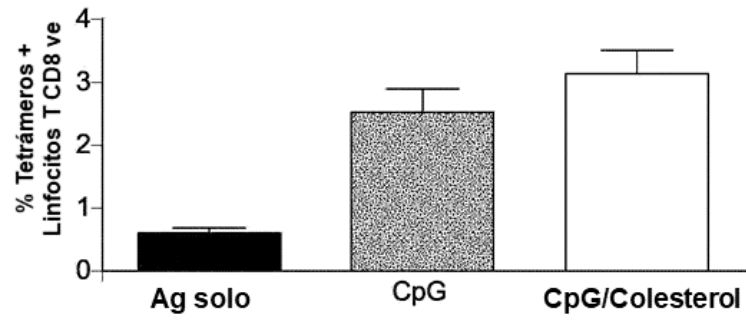


FIG. 3D

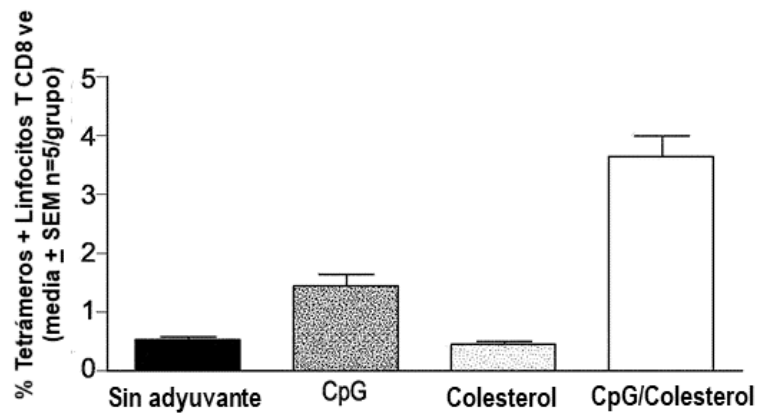


FIG. 4

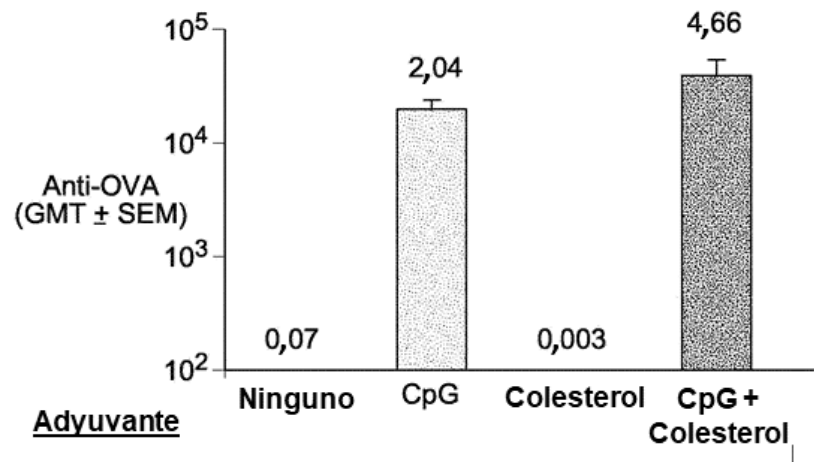
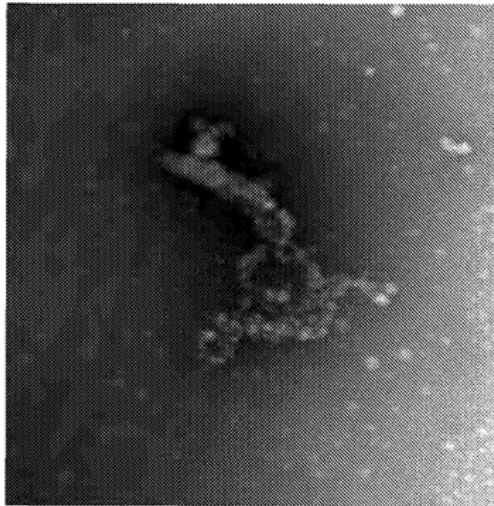


FIG. 5



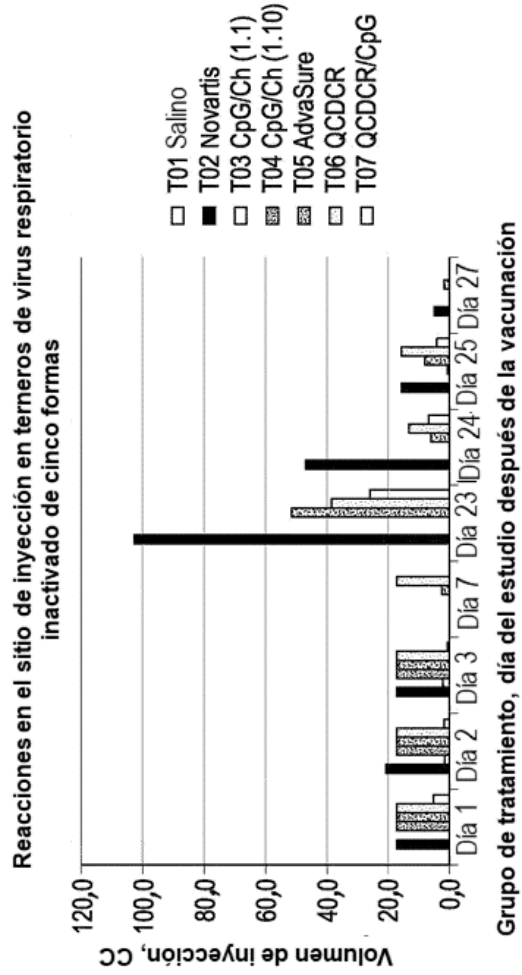


FIG. 6

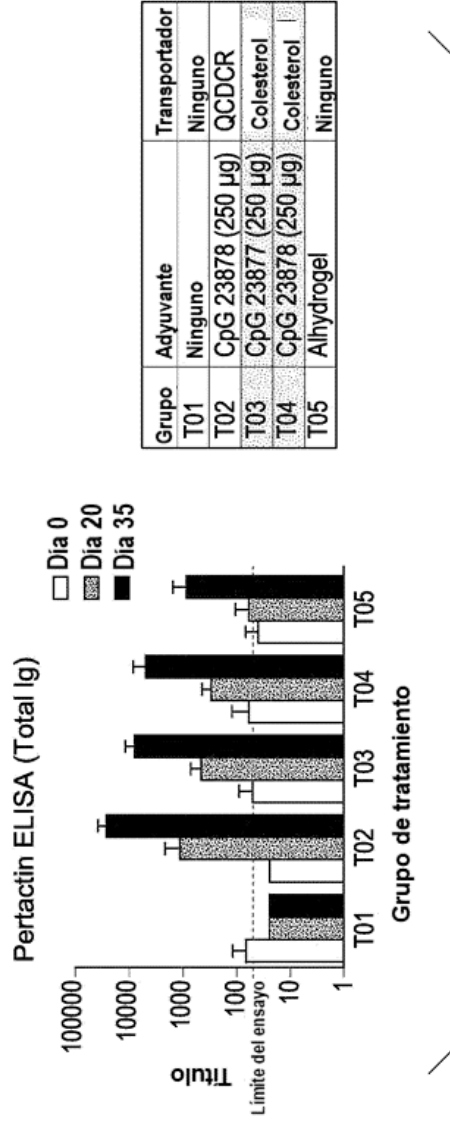


FIG. 7