

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 325**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/008** (2006.01)

**A61K 39/27** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2014** **PCT/US2014/037705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014** **WO14186291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2014** **E 14729191 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 2996719**

54 Título: **Composiciones de vacuna novedosas que comprenden oligonucleótidos inmunoestimulantes**

30 Prioridad:

**14.05.2013 US 201361823189 P**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)  
10 Sylvan Way  
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH;  
RAI, SHARATH, K.;  
SLY, LAUREL, MARY;  
COOK, COREY, PATRICK;  
MWANGI, DUNCAN;  
FOSS, DENNIS, L. y  
KREBS, RICHARD, LEE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 742 325 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

Composiciones de vacuna novedosas que comprenden oligonucleótidos inmunoestimulantes

### Campo de la invención

Esta invención se refiere a coadyuvantes novedosos para potenciar la respuesta inmunitaria a las vacunas contra *Leishmania* y virus equino del caballo.

### Antecedentes de la invención

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria importante y grave de seres humanos, cánidos (perros, lobos, zorros, coyotes, chacales) y félidos (leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros grandes gatos y otros felinos, incluyendo guepardos y linces). El agente de la leishmaniosis es un protozoo parásito que pertenece al complejo *Leishmania donovani*. Este parásito está ampliamente distribuido por países templados y subtropicales de Europa meridional, África, Asia, Sudamérica y América central (Desjeux P., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2001, 95: 239-43). *Leishmania donovani infantum* (*L. infantum*) es responsable de la enfermedad felina y canina en Europa meridional, África y Asia. En Sudamérica y América central, el agente es *Leishmania donovani chagasi* (*L. chagasi*), que está estrechamente relacionado con *L. infantum*. En seres humanos, el agente es *Leishmania donovani* (*L. donovani*), que está estrechamente relacionado con *L. infantum* y *L. chagasi*.

Estos parásitos causan leishmaniosis visceral y/o leishmaniosis cutánea. La leishmaniosis visceral da como resultado síntomas clínicos como fiebre, caquexia, hepatoesplenomegalia (agrandamiento de hígado y bazo) y citopenia sanguínea. La leishmaniosis cutánea aparece en diversas presentaciones, desde las formas cutáneas autolimitadas e incluso autocurables hasta la enfermedad sistémica mortal. Las lesiones de leishmaniosis cutánea pueden aparecer en cualquier lugar del cuerpo, pero los sitios más comunes son aquellos que están expuestos al entorno y que son por lo tanto más susceptibles de picaduras por las moscas de la arena. La pápula inicial da lugar rápidamente a una úlcera. La leishmaniosis sistémica es rara, pero es invariablemente mortal si no se trata rápidamente. La leishmaniosis sistémica afecta a los órganos corporales internos, específicamente a bazo e hígado.

En cánidos, la enfermedad está asociada a síntomas cutáneos o a síntomas viscerales, o a síntomas tanto cutáneos como viscerales, y es mortal en ausencia de terapia.

Se han descrito numerosos tratamientos, pero ninguno es totalmente satisfactorio debido a la toxicidad del tratamiento mismo o a la tendencia a la recaída del animal.

Bode y col. (Expert Review of Vaccines 2011; 10(4) 499-511) analizan diferentes tipos de oligonucleótidos de CpG y su potencial como adyuvantes en general.

Davis y col. (documento WO2011/148356) desvelan una combinación de oligonucleótidos de CpG y colesterol.

Debelak y col. (documento WO2008/068638) desvelan oligonucleótidos de CpG de clase P que tienen base 5' sustituida con análogos lipófilos. Stacey y col. (Infection and Immunity 1999, 67(8): 3719-3726) analizan la utilidad del ADN inmunoestimulante como un adyuvante en una vacuna anti-*Leishmania*. Olivera-Freitas y col., (Vaccine, 2006, 24(18): 3909-3920) desvelan una vacuna de *Leishmania* FML que comprende saponinas.

Por consiguiente, son necesarias nuevas formulaciones de vacuna para proteger a animales domésticos frente a infecciones por EHV y *Leishmania*.

### Sumario de la invención

La presente invención se enfrenta a los inconvenientes de la técnica anterior proporcionando, en un aspecto, una composición de vacuna que comprende un componente antigénico en el que el componente antigénico es un antígeno de *Leishmania* y un componente coadyuvante, en la que el componente coadyuvante comprende un oligonucleótido inmunoestimulante de clase P y una combinación de una saponina y un estero.

Preferentemente, el oligonucleótido inmunoestimulante de clase P, que puede estar modificado y/o estabilizado, está presente en una cantidad de 20-500 µg por dosis, por ejemplo de 100-250 µg por dosis.

Preferentemente, el componente coadyuvante comprende una saponina tal como Quil A o una fracción purificada de la misma, y un estero, tal como colesterol, cada uno en una cantidad de entre aproximadamente 5 y 100 µg/ml. En una realización específica, cada uno de Quil A y colesterol está presente en una cantidad de 50 µg/ml.

En ciertas realizaciones de la invención, la formulación de vacuna es no liposómica.

### Descripción detallada de realizaciones seleccionadas

Las siguientes definiciones se proporcionan para una mejor comprensión de la invención:

"Aproximadamente" o "alrededor de", cuando se usa con relación a una variable numérica mensurable, hace referencia

- al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media) o dentro del 10 % del valor indicado, el que sea mayor, a menos que se use “aproximadamente” con referencia a intervalos de tiempo en semanas, donde “aproximadamente 3 semanas” es de 17 a 25 días y de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 semanas es de 10 a 40 días.
- 5 “Coadyuvante” significa cualquier sustancia que aumente la respuesta inmunitaria humoral o celular ante un antígeno. Los coadyuvantes se usan generalmente para lograr dos objetivos: para retardar la liberación de antígenos desde el sitio de inyección y para la estimulación del sistema inmunitario.
- 10 “Anticuerpo” hace referencia a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmunitaria ante ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas compuestas por cadenas polipeptídicas “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variables” y que se dividen en clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) basándose en la composición de las regiones constantes.
- 15 “Antígeno” o “inmunógeno” hace referencia a cualquier sustancia que estimule una respuesta inmunitaria. El término incluye bacterias, virus o parásitos muertos, inactivados, atenuados o vivos modificados. El término antígeno incluye también polinucleótidos, polipéptidos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, extracto de proteína, células (incluyendo células tumorales), tejidos, polisacáridos o lípidos o fragmentos de los mismos, individualmente o en cualquier combinación de los mismos. El término antígeno incluye también anticuerpos tales como anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos de los mismos, y mimotopos peptídicos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epitopo).
- 20 “Bacterina” significa una suspensión de una o más bacterias muertas que puede usarse como componente de una vacuna o composición inmunogénica.
- 25 “Tampón” significa un sistema químico que evita el cambio de concentración de otra sustancia química, por ejemplo, los sistemas donantes y aceptores de protones sirven como tampones que evitan cambios acusados de la concentración del ión de hidrógeno (pH). Es un ejemplo adicional de tampón una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada) o una base débil y su sal (ácido conjugado).
- “Respuesta inmunitaria celular” o “respuesta inmunitaria mediada por células” es aquella mediada por linfocitos T u otros leucocitos o ambos, e incluye la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por linfocitos T activados, leucocitos o ambos.
- 30 “Que consiste esencialmente”, como se aplica a formulaciones de coadyuvantes, hace referencia a una formulación que no contiene agentes coadyuvantes ni inmunomoduladores adicionales no indicados en cantidades a las que dicho agente ejerce efectos coadyuvantes o inmunomoduladores mensurables.
- 35 “Dosis” hace referencia a una vacuna o composición inmunogénica administrada a un sujeto. Una “primera dosis” o “vacuna de sensibilización” hace referencia a la dosis de dicha composición administrada el día 0. Una “segunda dosis” o una “tercera dosis” o una “dosis anual” hace referencia a una cantidad de dicha composición administrada posteriormente a la primera dosis, que puede ser o no la misma vacuna o composición inmunogénica que la primera dosis.
- “Respuesta inmunitaria humoral” hace referencia a aquella mediada por anticuerpos.
- 40 “Respuesta inmunitaria” en un sujeto hace referencia al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular, o una respuesta inmunitaria humoral y celular ante un antígeno. Las respuestas inmunitarias pueden determinarse habitualmente usando inmunoensayos y ensayos de neutralización estándares que son conocidos en la materia.
- 45 “Cantidad inmunológicamente protectora” o “cantidad inmunológicamente eficaz” o “cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria” de un antígeno es una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor. La respuesta inmunogénica puede ser suficiente con fines de diagnóstico u otro ensayo, o puede ser adecuada para prevenir signos o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, causados por infección por un agente patológico. Pueden inducirse tanto inmunidad humoral como inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal ante una composición inmunogénica puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente mediante la medida de títulos de anticuerpo o mediante ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente mediante la monitorización de los signos y síntomas después de la exposición a la cepa de tipo silvestre, mientras que la inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de los signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, valor de temperatura, estado físico global y salud global y desempeño del sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral.
- 50 “Inmunogénico” significa provocar una respuesta inmunitaria o antigénica. Por tanto, una composición inmunogénica sería cualquier composición que induzca una respuesta inmunitaria.
- 55

"Molécula inmunoestimulante" hace referencia a una molécula que genera una respuesta inmunitaria.

"Lípidos" hace referencia a cualquiera del grupo de compuestos orgánicos, incluyendo grasas, aceites, ceras, esteroides y triglicéridos, que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos no polares, son aceitosos al tacto y, junto con carbohidratos y proteínas, constituyen el material estructural principal de las células vivas.

5 "Farmacéuticamente aceptable" hace referencia a sustancias que están dentro del alcance del criterio médico común adecuadas para uso en contacto con los tejidos de los sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidas, correspondientemente con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaces para su uso pretendido.

10 "Reactogenicidad" hace referencia a los efectos secundarios desencadenados en un sujeto en respuesta a la administración de un coadyuvante, un inmunógeno o una composición de vacuna. Puede aparecer en el sitio de administración y se valora habitualmente en términos de desarrollo de una serie de síntomas. Estos síntomas pueden incluir inflamación, rojez y abscesos. Se valora también en términos de aparición, duración y gravedad. Una reacción "baja" implicaría, por ejemplo, hinchazón que es solo detectable por palpación y no a simple vista, o sería de corta duración. Una reacción más grave sería, por ejemplo, aquella que es visible a simple vista o de mayor duración.

"Temperatura ambiente" significa una temperatura de 18 a 25 °C.

15 "Saponina" hace referencia a un grupo de glucósidos tensioactivos de origen vegetal compuestos por una región hidrófila (habitualmente de varias cadenas de azúcar) en asociación con una región hidrófoba de estructura esteroide o triterpenoide.

20 "Esteroides" hace referencia a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos que pertenecen a la clase bioquímica de lípidos, que son fácilmente solubles en disolventes orgánicos y ligeramente hidrosolubles. Los esteroides comprenden un sistema de cuatro anillos fusionados de tres anillos de ciclohexano (seis carbonos) fusionados más un cuarto anillo de ciclopentano (cinco carbonos).

25 "Esteroides" hace referencia a compuestos en animales que son producidos biológicamente a partir de precursores terpenoides. Comprenden una estructura de anillo esteroide que tiene un grupo hidroxilo (OH) habitualmente enlazado al carbono 3. La cadena hidrocarbonada del sustituyente de ácido graso varía en longitud, habitualmente de 16 a 20 átomos de carbono, y puede ser saturada o insaturada. Los esteroides contienen comúnmente uno o más dobles enlaces en la estructura de anillo y también una variedad de sustituyentes enlazados con los anillos. Los esteroides y sus ésteres de ácido graso son esencialmente no hidrosolubles.

30 "Sujeto" hace referencia a cualquier animal para el que se desee la administración de una composición coadyuvante. Incluye mamíferos y no mamíferos, incluyendo primates, ganado, animales de compañía, animales de ensayo de laboratorio, animales salvajes cautivos, aves (incluyendo en huevo), reptiles y peces. Por tanto, este término incluye, pero sin limitación, monos, seres humanos, cerdos, bóvidos, ovejas, cabras, equinos, ratones, ratas, conejillos de Indias, hámsteres, conejos, felinos, cánidos, pollos, pavos, patos, otras aves de corral, ranas y lagartos.

35 "Cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad de antígeno o vacuna que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto que recibe el antígeno o vacuna que es adecuado para prevenir o reducir los signos o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, causados por la infección por un patógeno tal como un virus o una bacteria. Puede inducirse tanto inmunidad humoral como inmunidad mediada por células, o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal ante una vacuna puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente mediante la medida de los títulos de anticuerpo o mediante ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente monitorizando los signos y síntomas después de exposición a la cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de los signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, valor de temperatura, estado físico global y salud global y desempeño del sujeto. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del coadyuvante particular usado, el antígeno particular usado o la afección del sujeto, y puede ser determinada por un especialista en la materia.

45 "Tratar" hace referencia a prevenir un trastorno, afección o enfermedad al que se aplica dicho término, o a prevenir o reducir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

"Tratamiento" hace referencia al acto de "tratar" como se define anteriormente.

50 "Triterpenoides" hace referencia a una clase amplia y diversa de moléculas orgánicas de origen natural derivadas de 6 unidades de isopreno de 5 carbonos (2-metil-1,3-butadieno), que pueden ensamblarse y modificarse de miles de maneras. La mayoría son estructuras policíclicas que difieren entre sí en los grupos funcionales y en sus esqueletos de carbono básicos. Estas moléculas pueden encontrarse en todas las clases de seres vivos.

"Vacuna" hace referencia a una composición que incluye un antígeno, como se define en la presente memoria. La administración de la vacuna a un sujeto da como resultado una respuesta inmunitaria, generalmente contra una o más enfermedades específicas. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del antígeno particular usado, o de la afección del sujeto, y puede ser determinada por un especialista en la materia.

Como se observa anteriormente, la presente invención proporciona una composición de vacuna que es un antígeno de *Leishmania* y un componente coadyuvante, en la que el componente coadyuvante comprende (o consiste esencialmente en, o consiste en) un oligonucleótido inmunoestimulante de clase P y una combinación de una saponina y un esteroles.

- 5 En un conjunto de realizaciones, las composiciones de vacuna de la presente invención son no liposómicas. En realizaciones en que está presente aceite, el antígeno se dispersaría o disolvería generalmente en la fase acuosa y no estaría recubierto por liposomas ni estructuras similares. En composiciones de vacuna en que están presentes saponina y esteroles, dichas saponinas y dichos esteroles formarían micelas helicoidales y el antígeno estaría mezclado, pero no integrado, con dichas micelas helicoidales.

## 10 Antígenos

Son adecuados para la presente invención diferentes antígenos derivados de *Leishmania*. Los antígenos pueden incluir, sin limitación, organismos completos (inactivados, atenuados y vivos modificados), nucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, extracto de proteína, polisacáridos, carbohidratos, ácidos grasos, ácido teicoico, peptidoglicanos, lípidos o glucolípidos, individualmente o en cualquier combinación de los mismos.

La cantidad de antígeno usada para inducir una respuesta inmunitaria variará considerablemente dependiendo del antígeno usado, del sujeto y del nivel de respuesta deseado, y puede ser determinada por un especialista en la materia.

- 20 El número de células para un antígeno de *Leishmania* administrado en una vacuna oscila de aproximadamente  $1 \times 10^2$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  por dosis, inclusive. En otras realizaciones, el número de células oscila de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  por dosis, inclusive.

- 25 Una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno en vacunas que contienen virus inactivados puede medirse también en términos de potencia relativa (PR) por ml. Una cantidad terapéuticamente eficaz está a menudo en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 PR por ml, inclusive. En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 PR por ml, inclusive, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 PR por ml, inclusive, de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 PR por ml, inclusive, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 PR por ml, inclusive, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 PR por ml, inclusive.

- 30 Ejemplos adecuados de antígenos de *Leishmania* incluyen organismos completos, extractos de proteína, glucoproteínas, proteínas de cápsida externa y extractos y secuencias de ácido nucleico que codifican dichas proteínas de cápsida externa. Los antígenos específicos pueden incluir Gp63, PSA-2 y ligando de fucosa-manosa. En otra realización, pueden usarse antígenos excretorios-secretorios (ESA) de *leishmania*. Se han identificado ESA para al menos 17 ESA de pesos moleculares relativos 11, 13, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 35, 42, 51, 54, 58, 64, 70 y 80 kDa.
- 35 Se han encontrado que dos fracciones, F1 (11, 13 y 16 kDa) y F3 (26, 29 y 33 kDa), son altamente inmunogénicas ya que inducían significativamente las actividades NADPH oxidasa y SOD, así como la producción de NOx, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 en macrófagos RAW 264.7 estimulados. Adicionalmente, estos antígenos inducían también una proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica humana junto con una producción aumentada de IFN- $\gamma$  e IL-12. Véase Gour *et al.*, Experimental Parasitology, 2012; 132(3), 355-361.

## 40 Saponinas y CpG

Las saponinas triterpenoides adecuadas para uso en las composiciones coadyuvantes pueden proceder de muchas fuentes, tanto derivadas de plantas como equivalentes sintéticos incluyendo, pero sin limitación, *Quillaja saponaria*, tomatina, extractos de ginseng, hongos y un glucósido alcaloide estructuralmente similar a las saponinas esteroideas. Por tanto, los triterpenoides adecuados para uso en las composiciones coadyuvantes incluyen saponinas, escualeno y lanosterol. La cantidad de triterpenoides adecuada para uso en las composiciones coadyuvantes depende de la naturaleza del triterpenoide usado. Sin embargo, se usan generalmente a una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000  $\mu\text{g}$  por dosis. Se usan también a una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.000  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.000  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2.000  $\mu\text{g}$  por dosis y de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000  $\mu\text{g}$  por dosis. Se usan también a una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 750  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 5 a aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  por dosis, de aproximadamente 15 a aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  por dosis y a una cantidad de aproximadamente 30 a aproximadamente 75  $\mu\text{g}$  por dosis.

- 55 Si se usa una saponina, las composiciones coadyuvantes contienen generalmente una fracción de saponina inmunológicamente activa de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina puede ser, por ejemplo, Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada, que puede obtenerse comercialmente. Por ejemplo, Quil A se vende en los EE.UU. por E.M Sergeant Company. QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 pueden obtenerse en Antigenics Company, Massachusetts, EE.UU. Por tanto, los extractos de saponina pueden usarse como mezclas o

componentes individuales purificados tales como QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. En una realización, Quil A es al menos un 85 % puro. En otras realizaciones, Quil A es al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % puro.

Los oligonucleótidos CpG son una clase recientemente descrita de agentes farmacoterapéuticos que se caracterizan por la presencia de un dinucleótido CG no metilado en contextos de secuencia de base específicos (motivo CpG). (Hansel TT, Barnes PJ (eds): "New Drugs for Asthma, Allergy and COPD". Prog. Respir. Res. Basilea, Karger, 2001, vol 31, pág 229-232). Estos motivos CpG no se observan en ADN eucariótico, en el que los dinucleótidos CG se suprimen y, cuando están presentes, habitualmente están metilados, pero están presentes en ADN bacteriano al que confieren propiedades inmunoestimulantes.

Los coadyuvantes de la presente invención utilizan el denominado oligonucleótido inmunoestimulante de clase P, más preferiblemente oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P modificados. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P son oligonucleótidos CpG caracterizados por la presencia de palíndromos, generalmente de 6-20 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en concatémeros, *in vitro* y/o *in vivo*. Estos oligonucleótidos son, en sentido estricto, monocatenarios, pero la presencia de palíndromos permite la formación de concatémeros o posiblemente estructuras de tallo y bucle. La longitud global de los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P está entre 19 y 100 nucleótidos, por ejemplo, 19-30 nucleótidos, 30-40 nucleótidos, 40-50 nucleótidos, 50-60 nucleótidos, 60-70 nucleótidos, 70-80 nucleótidos, 80-90 nucleótidos y 90-100 nucleótidos.

En un aspecto de la invención, el oligonucleótido inmunoestimulante contiene un dominio de activación 5' TLR y al menos dos regiones palindrómicas, siendo una región palindrómica la región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y conectada con la región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud directamente o a través de un espaciador.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P pueden modificarse según técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la modificación J hace referencia a nucleótidos modificados con yodo. La modificación E hace referencia a un nucleótido o nucleótidos modificados con etilo. Por tanto, los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P con modificación E son oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P en los que al menos un nucleótido (preferiblemente nucleótido 5') está etilado. Modificaciones adicionales incluyen el enlazamiento de 6-nitrobencimidazol, la O-metilación, la modificación con propinil-dU, la modificación con inosina y el enlazamiento 2-bromovinilo (preferiblemente con uridina).

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P pueden contener también un ligamiento internucleotídico modificado incluyendo, sin limitaciones, ligamientos fosfodiéster y ligamientos fosforotioato. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse u obtenerse de fuentes comerciales.

Los oligonucleótidos de clase P y oligonucleótidos de clase P modificados se dan a conocer adicionalmente en la solicitud PCT publicada nº WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008. Se proporcionan a continuación ejemplos adecuados no limitantes de oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P modificados ("\*" hace referencia a un enlace fosforotioato y "\_" hace referencia a un enlace fosfodiéster).

|               |                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1  | 5' T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*G 3'      |
| SEQ ID NO: 2  | 5' T*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: 3  | 5' T*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: 4  | 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: 5  | 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: 6  | 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: 7  | 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: 8  | 5' JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3' |
| SEQ ID NO: 9  | 5' JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3' |
| SEQ ID NO: 10 | 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*G 3'.     |

La cantidad de oligonucleótido inmunoestimulante de clase P para uso en las composiciones coadyuvantes depende de la naturaleza del oligonucleótido inmunoestimulante de clase P usado y de la especie pretendida. Sin embargo, se usan generalmente en una cantidad de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 µg por ml. Se usan también en una cantidad de aproximadamente 25 µg a aproximadamente 400 mg por ml, de aproximadamente 40 a aproximadamente 250 µg por ml, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 µg por ml o de aproximadamente 100 g por ml a aproximadamente 200 µg por ml.

#### Esteroles

Los esteroides adecuados para uso en composiciones coadyuvantes incluyen β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Estos esteroides son bien conocidos en la materia y pueden adquirirse comercialmente. Por ejemplo, el colesterol se da a conocer en "Merck Index", 12ª ed., pág. 369. La cantidad de esteroides adecuada para uso en las composiciones coadyuvantes depende de la naturaleza del esteroide usado. Sin embargo, se usan generalmente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000 µg por ml. Se usan también en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.000 µg por ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente

3.000 µg por ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2.000 µg por ml, y de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 µg por ml. Se usan también en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 750 µg por ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 µg por ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 µg por ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 µg por ml, de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 µg por ml y de aproximadamente 30 a aproximadamente 75 µg por ml.

La preparación de las composiciones que contienen la saponina y el esteroil según la presente invención está dentro de las habilidades ordinarias en la materia. Brevemente, se prepara una mezcla acuosa, comprendiendo dicha mezcla el antígeno, el oligonucleótido inmunomodulador de clase P y la saponina. Se añade entonces gradualmente (o gota a gota) el esteroil a esa mezcla.

#### 10 Fase oleosa

La composición coadyuvante puede comprender una fase oleosa en una cantidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 % v/v de la composición de vacuna, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 %, etc. La fase oleosa comprende generalmente un aceite y, opcionalmente, uno o más emulsionantes. La fase oleosa puede comprender dos emulsionantes, uno de los cuales es liposoluble y el otro es hidrosoluble.

Son adecuados múltiples aceites y combinaciones de los mismos para uso como se desvela en el presente documento. Estos aceites incluyen, sin limitaciones, aceites animales, aceites vegetales, así como aceites no metabolizables. Son ejemplos de aceites vegetales adecuados en la presente invención aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva. Es un ejemplo de aceites animales el escualano. Ejemplos adecuados de aceites no metabolizables incluyen aceite mineral ligero, aceites saturados de cadena lineal o ramificada, escualano y similares.

El aceite usado en las formulaciones coadyuvantes desvelado en el presente documento es un aceite mineral ligero. Como se usa en la presente memoria, el término "aceite mineral" hace referencia a una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de vaselina mediante una técnica de destilación. El término es sinónimo de "parafina licuada", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". Se pretende también que el término incluya "aceite mineral ligero", concretamente aceite que se obtiene de forma similar por destilación de vaselina, pero que tiene una densidad relativa ligeramente menor que la del aceite mineral blanco. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, en las páginas 788 y 1323). El aceite mineral puede obtenerse de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, J. T. Baker (Phillipsburg, Pa.), USB Corporation (Cleveland, Ohio). El aceite mineral preferido es el aceite mineral ligero disponible comercialmente con el nombre DRAKEOL®.

Alternativamente, el aceite es aceite SP, que comprende un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno (disponible en BASF, Mt. Olive, NJ), escualano (disponible en Kodak, Rochester, NY) y monooleato de polioxietilensorbitán (TWEEN®80, disponible en Sigma Chemical, St. Louis, MO). El escualano se usa a alrededor del 5 % (p/v), el copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno se usa a alrededor del 2,5 % (p/v), el monooleato de polioxietilensorbitán (TWEEN®-80) se usa a alrededor del 0,2 % (p/v) preparados en un diluyente farmacéuticamente aceptable de cualquiera de tampón, agua, solución salina normal o medio de crecimiento de cultivo celular.

La fase oleosa incluye aceite y emulsionantes oleosolubles (por ejemplo, SPAN 80), si están presentes algunos de dichos emulsionantes. El volumen de la fase oleosa se calcula como la suma de volúmenes de aceite y emulsionante oleosoluble. Por tanto, por ejemplo, si el volumen del aceite es de un 10 % y el volumen del emulsionante oleosoluble es de un 2 % de una composición, entonces la fase oleosa estaría presente a un 12 % v/v de la composición. De forma similar, si el aceite está presente a una cantidad de aproximadamente un 5 % y el emulsionante liposoluble está presente a una cantidad de aproximadamente un 6 % de la composición, entonces la fase oleosa está presente a aproximadamente un 11 % v/v de la composición.

Los emulsionantes adecuados para uso en las emulsiones incluyen emulsionantes biológicamente compatibles naturales y tensioactivos sintéticos no naturales. Los emulsionantes biológicamente compatibles incluyen compuestos fosfolípidicos o una mezcla de fosfolípidos. Son fosfolípidos preferidos las fosfatidilcolinas (lecitina) tales como lecitina de soja o de huevo. La lecitina puede obtenerse como una mezcla de fosfatidas y triglicéridos mediante el lavado con agua de aceites vegetales brutos, y separación y secado de las gomas hidratadas resultantes. Puede obtenerse un producto refinado fraccionando la mezcla en fosfolípidos insolubles en acetona y los glucolípidos que permanecen después de la retirada de los triglicéridos y el aceite vegetal mediante lavado con acetona. Como alternativa, puede obtenerse lecitina de diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.

Los emulsionantes usados en la presente memoria no incluyen lecitina, o usan lecitina en una cantidad que no es inmunológicamente eficaz.

Los emulsionantes sintéticos no naturales adecuados para uso en las formulaciones coadyuvantes de la presente

invención incluyen tensioactivos no iónicos basados en sorbitán, por ejemplo, tensioactivos de sorbitán sustituidos con ácido graso (comercialmente disponibles con el nombre SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácido graso de sorbitol polietoxilado (TWEEN®), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes tales como aceite de ricino (EMULFOR®); ácido graso polietoxilado (por ejemplo, ácido esteárico disponible con el nombre SIMULSOL M-53), polímero de isoocitilfenol/formaldehído polietoxilado (TYLOXAPOL®), polioxietilenéteres de alcoholes grasos (BRIJ®); polioxietilenonilfeniléteres (TRITON® N), polioxietilenisooctilfeniléteres (TRITON® X). Son tensioactivos sintéticos preferidos los tensioactivos disponibles con el nombre SPAN® y TWEEN®, tales como TWEEN-80 (monooleato de polioxietilen-(20)-sorbitán) y SPAN-80 (monooleato de sorbitán).

Hablando en general, el emulsionante o emulsionantes pueden estar presentes en la composición de vacuna en una cantidad de 0,01 a 10 % en volumen, preferiblemente de 0,1 a 5 %, más preferiblemente de 1 a 3 %.

La preparación de las composiciones de vacuna que comprenden la fase oleosa es directa y conlleva mezclar la fase acuosa que comprende el antígeno, el oligonucleótido inmunoestimulante de clase P y, opcionalmente, un emulsionante hidrosoluble, con una fase oleosa que contiene el aceite y, opcionalmente, un emulsionante liposoluble. La mezcla resultante se emulsiona.

Otros componentes de las composiciones pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables tales como portadores, disolventes y diluyentes, agentes isotónicos, agentes de tamponación, estabilizadores, conservantes, agentes vasoconstrictores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y similares. Los portadores, disolventes y diluyentes típicos incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, aceite y similares. Agentes isotónicos representativos incluyen cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa y similares. Los estabilizadores útiles incluyen gelatina, albúmina y similares.

Como se usa en la presente memoria, "un portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, coadyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. El portador o portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de las composiciones y no nocivos para el sujeto. Típicamente, los portadores serán estériles y exentos de pirógenos y seleccionados basándose en el modo de administración en que se usarán. Es bien conocido por los especialistas en la materia que las formulaciones preferidas para el portador farmacéuticamente aceptable que comprende las composiciones son aquellos portadores farmacéuticos aprobados en los reglamentos aplicables promulgados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (EE.UU.) o la Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU. o la agencia estatal equivalente en un país distinto de EE.UU. Por lo tanto, el portador farmacéuticamente aceptado para producción comercial de las composiciones es un portador que ya se ha aprobado o será aprobado por la agencia estatal apropiada de EE.UU. o de un país extranjero.

Las composiciones pueden incluir opcionalmente diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables compatibles (es decir, estériles o no tóxicos) que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina entre otros.

Las composiciones pueden contener también antibióticos o conservantes incluyendo, por ejemplo, gentamicina, mertiolato o clorocresol. Las diversas clases de antibióticos o conservantes de las que se selecciona son bien conocidas para el especialista en la materia.

#### Administración y uso de las composiciones

Los tamaños de dosis de las composiciones oscilan típicamente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 ml inclusive, dependiendo del sujeto y del antígeno. Por ejemplo, para un cánido o un felino, se usa típicamente una dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 ml, mientras que en animales más grandes se usa típicamente una dosis de aproximadamente 1-5 ml. Sin embargo, estos coadyuvantes pueden formularse también en microdosis, pudiendo usarse dosis de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 µl.

Las vías de administración para las composiciones coadyuvantes incluyen, sin limitaciones, subcutánea, intramuscular, parenteral, oral, buconasal, intranasal, intratraqueal, tópica, etc. Puede usarse cualquier dispositivo adecuado para administrar las composiciones, incluyendo jeringuillas, goteros, dispositivos de inyección sin aguja, parches y similares. La vía y dispositivo seleccionados para uso dependerán de la composición del coadyuvante, del antígeno y del sujeto, y estos son bien conocidos por el especialista en la materia.

La invención se describirá adicionalmente con los siguientes ejemplos.

#### Ejemplos

##### **Ejemplo 1: Antígeno de *Leishmania***

Se obtuvieron 50 perros Beagle machos y hembras criados en laboratorio en Marshall BioResources (NY), y se

asignaron aleatoriamente 5 perros a cada uno de 10 grupos (Tabla 1). Los perros tenían entre 3 y 4 meses de edad en el momento de la primera inyección. Se administraron tres inyecciones a intervalos de 21 días; se observaron los sitios de inyección y se recogieron muestras de sangre a los intervalos prescritos para ensayo. Se usó P-CpG de SEQ ID NO: 8 para este estudio.

5

**Tabla 1: Diseño experimental del estudio de antígeno de *Leishmania* en perros**

| Tabla 1. Diseño experimental del estudio de antígeno de <i>Leishmania</i> en perros                                                                       |            |                                     |                    |                                 |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|
| Grupo                                                                                                                                                     | Antígeno   | Coadyuvante                         |                    | Nº de dosis                     | Vía y vol./ dosis |
| (N=5)                                                                                                                                                     |            | 1                                   | 2                  | Días                            |                   |
| T01                                                                                                                                                       | FML        | MDP (200 µg)                        |                    | 3 dosis días: <b>0, 21 y 42</b> | <b>SC 1 ml</b>    |
| T02                                                                                                                                                       | Leishmune® | Según la formulación comercializada |                    |                                 |                   |
| T03                                                                                                                                                       | FML        | P-CpG (100 µg)                      | Aceite SP (10 %)   |                                 |                   |
| T04                                                                                                                                                       | FML        | P-CpG (200 µg)                      | Aceite SP (10 %)   |                                 |                   |
| T05                                                                                                                                                       | FML        | P-CpG (100 µg)                      | QC (50 µg / 50 µg) |                                 |                   |
| T06                                                                                                                                                       | FML        | P-CpG (200 µg)                      | QC (50 µg / 50 µg) |                                 |                   |
| T07                                                                                                                                                       | FML        | E-SA (5% v/v)                       | Aceite SP (10 %)   |                                 |                   |
| T08                                                                                                                                                       | FML        | MDP (200 µg)                        | QC (50 µg / 50 µg) |                                 |                   |
| T09                                                                                                                                                       | FML        | PBS                                 | ---                |                                 |                   |
| T10                                                                                                                                                       | PBS        | ---                                 | ---                |                                 |                   |
| CpG – oligonucleótido de clase P<br>Q - Quil A<br>C - Colesterol<br>MDP - dipéptido de muramilo<br>FML – ligando de fucosa-manosa<br>E-SA - Emulsigen®-SA |            |                                     |                    |                                 |                   |

Se aislaron PBMC los días -1, 7, 28 y 49. Se cultivaron las PBMC aisladas en (MEDIA) y se estimularon con FML (20 µg/ml), LICE (extracto bruto de *Leishmania infantum*, 17,5 µg/ml) y ConA (concanavalina A, 2,5 µg/ml). Se midió el IFN-g por ELISpot usando kits comercialmente disponibles. Se resumen los resultados de los experimentos en las tablas siguientes.

10

**Tabla 2: Resultados del índice de estimulación por ELISpot de PBMC para el estudio de antígeno de *Leishmania***

| Grupo | Índice de estimulación del Ag FML el día: |   |    |    | Índice de estimulación del Ag LICE el día: |   |    |    |
|-------|-------------------------------------------|---|----|----|--------------------------------------------|---|----|----|
|       | -1                                        | 7 | 28 | 49 | -1                                         | 7 | 28 | 49 |
| T01   | 2                                         | 5 | 3  | 8  | 1                                          | 1 | 1  | 3  |
| T02   | 2                                         | 6 | 6  | 3  | 1                                          | 2 | 2  | 2  |
| T03   | 2                                         | 4 | 4  | 3  | 1                                          | 2 | 1  | 1  |
| T04   | 2                                         | 4 | 4  | 3  | 1                                          | 1 | 1  | 1  |
| T05   | 2                                         | 9 | 25 | 28 | 1                                          | 3 | 5  | 12 |
| T06   | 2                                         | 7 | 15 | 21 | 1                                          | 2 | 4  | 6  |
| T07   | 2                                         | 5 | 13 | 11 | 1                                          | 2 | 2  | 3  |
| T08   | 2                                         | 6 | 18 | 18 | 1                                          | 2 | 5  | 6  |
| T09   | 2                                         | 3 | 3  | 4  | 1                                          | 2 | 2  | 1  |
| T10   | 3                                         | 3 | 3  | 3  | 2                                          | 1 | 2  | 2  |

**Tabla 3: Resultados de las células formadoras de manchas (SFC) por ELISpot de PBMC / 10<sup>6</sup> PBMC para el estudio de antígeno de *Leishmania***

| Grupo | SFC del Ag FML/10 <sup>6</sup> PBMC el día: |     |     |      | SFC del Ag LICE/10 <sup>6</sup> PBMC el día: |    |     |     |
|-------|---------------------------------------------|-----|-----|------|----------------------------------------------|----|-----|-----|
|       | -1                                          | 7   | 28  | 49   | -1                                           | 7  | 28  | 49  |
| T01   | 20                                          | 25  | 29  | 64   | 6                                            | 4  | 2   | 13  |
| T02   | 12                                          | 69  | 306 | 374  | 3                                            | 12 | 50  | 94  |
| T03   | 5                                           | 230 | 897 | 1165 | 3                                            | 22 | 72  | 91  |
| T04   | 16                                          | 304 | 519 | 1054 | 1                                            | 50 | 58  | 159 |
| T05   | 14                                          | 115 | 638 | 977  | 6                                            | 31 | 132 | 403 |
| T06   | 10                                          | 107 | 570 | 766  | 0                                            | 28 | 113 | 193 |
| T07   | 16                                          | 28  | 85  | 122  | 2                                            | 5  | 7   | 21  |
| T08   | 10                                          | 64  | 295 | 326  | 1                                            | 17 | 56  | 107 |
| T09   | 21                                          | 29  | 74  | 97   | 4                                            | 4  | 8   | 10  |
| T10   | 29                                          | 16  | 25  | 22   | 8                                            | 2  | 4   | 8   |

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el CpG (100 µg) con QC parece ser el mejor coadyuvante para

FML, con respecto al índice de estimulación de IFN-g. El CpG (100 µg) con aceite de SP inducía las SFC de IFN-g mayores, pero tenía también la estimulación de fondo más alta. Sorprendentemente, el control positivo de vacuna Leishmune era ligeramente mejor que el control negativo (PBS o FML solo), aunque se coadyuvaba con 500 µg de Quil A por dosis. En otras palabras, la adición de CpG permitía reducir Quil A 10 veces y seguir consiguiendo resultados superiores. Los efectos de los coadyuvantes previamente conocidos MPD y E-SA eran comparables o ligeramente mejores que Leishmune®, pero inferiores a CpG con QC.

## LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> ZOETIS LLC DOMINOWSKI, PAUL JOSEPH RAI, SHARATH K. SLY, LAUREL MARY COOK, COREY  
 PATRICK MWANGI, DUNCAN FOSS, DENNIS L. KREBS, RICHARD LEE  
 10 <120> COMPOSICIONES DE VACUNA NOVEDOSAS QUE COMPRENDEN OLIGONUCLEÓTIDOS  
 INMUNOESTIMULANTES  
 15 <130> ZP000011A  
 <150> US 61/823189  
 <151> 14-05-2013  
 20 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 25 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido CpG  
 <400> 1  
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23  
 35 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido CpG  
 <400> 2  
 tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23  
 45 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido CpG  
 <400> 3  
 tcgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24  
 55 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido CpG  
 <220>

|    |                                |    |
|----|--------------------------------|----|
|    | <221> base_modificada          |    |
|    | <222> (1)..(1)                 |    |
|    | <223> 5'-Yodo-2'-desoxiuridina |    |
| 5  | <400> 4                        |    |
|    | tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg      | 23 |
|    | <210> 5                        |    |
|    | <211> 24                       |    |
| 10 | <212> ADN                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido CpG      |    |
| 15 | <220>                          |    |
|    | <221> base_modificada          |    |
|    | <222> (1)..(1)                 |    |
|    | <223> 5'-Yodo-2'-desoxiuridina |    |
| 20 | <400> 5                        |    |
|    | tcgacgtcga tcggcgcgcg ccgt     | 24 |
|    | <210> 6                        |    |
|    | <211> 24                       |    |
| 25 | <212> ADN                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido CpG      |    |
| 30 | <220>                          |    |
|    | <221> base_modificada          |    |
|    | <222> (1)..(1)                 |    |
|    | <223> 5'-Yodo-2'-desoxiuridina |    |
| 35 | <400> 6                        |    |
|    | tcgacgtcga tcggcgcgcg ccgt     | 24 |
|    | <210> 7                        |    |
|    | <211> 23                       |    |
| 40 | <212> ADN                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |
|    | <220>                          |    |
| 45 | <223> Oligonucleótido CpG      |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <221> base_modificada          |    |
|    | <222> (1)..(1)                 |    |
| 50 | <223> 5'-Etil-2'-desoxiuridina |    |
|    | <400> 7                        |    |
|    | tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg      | 23 |
| 55 | <210> 8                        |    |
|    | <211> 24                       |    |
|    | <212> ADN                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial     |    |
| 60 | <220>                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido CpG      |    |
|    | <220>                          |    |
|    | <221> base_modificada          |    |
| 65 | <222> (1)..(1)                 |    |

|    |                                |  |
|----|--------------------------------|--|
|    | <223> 5'-Yodo-2'-desoxiuridina |  |
|    | <400> 8                        |  |
| 5  | tcgtcgacga tcggcggccg ccgt 24  |  |
|    | <210> 9                        |  |
|    | <211> 24                       |  |
|    | <212> ADN                      |  |
| 10 | <213> Secuencia artificial     |  |
|    | <220>                          |  |
|    | <223> Oligonucleótido CpG      |  |
|    | <220>                          |  |
| 15 | <221> base_modificada          |  |
|    | <222> (1)..(1)                 |  |
|    | <223> 5'-Yodo-2'-desoxiuridina |  |
|    | <400> 9                        |  |
| 20 | tcgtcgacga tcggcggccg ccgt 24  |  |
|    | <210> 10                       |  |
|    | <211> 23                       |  |
|    | <212> ADN                      |  |
| 25 | <213> Secuencia artificial     |  |
|    | <220>                          |  |
|    | <223> Oligonucleótido CpG      |  |
|    | <400> 10                       |  |
| 30 | tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23   |  |

# REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende un componente antigénico y un componente coadyuvante, en la que el componente coadyuvante comprende un oligonucleótido CpG de clase P y una combinación de una saponina y un estero; y en la que dicho componente antigénico es un antígeno de *Leishmania*.
- 5 2. Una composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el coadyuvante consiste esencialmente en el oligonucleótido CpG de clase P y la combinación de la saponina y el estero.
3. La composición de vacuna según la reivindicación 1 o 2, que es una composición no liposómica.
4. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la saponina es Quil A y el estero es colesterol.
- 10 5. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la saponina está presente en una cantidad de 5-100 µg/ml.
6. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el estero está presente en una cantidad de 5-100 µg/ml.
- 15 7. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el estero y la saponina están presentes cada uno en una cantidad de 50 µg/ml.
8. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno es Ligando de Fucosa Manosa (FML).
9. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicho oligonucleótido CpG de clase P está presente en una cantidad de 20-500 µg/ml.
- 20 10. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que dicho oligonucleótido CpG de clase P está presente en una cantidad de 100-250 µg/ml.
11. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho oligonucleótido CpG de clase P está modificado.
- 25 12. La composición de vacuna de la reivindicación 11, en la que dicho oligonucleótido CpG de clase P modificado tiene modificación JU o modificación E.
13. La composición de vacuna de la reivindicación 12, en la que dicho oligonucleótido CpG de clase P modificado es el de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.