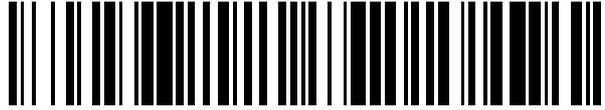


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 369**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2005 E 05787543 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1761276**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

25.06.2004 US 582999 P

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

03.12.2013

73 Titular/es:

**ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC
(50.0%)
525 Cartier Boulevard West
Laval, QC H7V 3S8, CA y
THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRENKEL, DAN;
MARON, RUTH;
BURT, DAVID y
WEINER, HOWARD L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 369 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 y métodos para tratar trastornos neurológicos

Campo de la invención

5 Se describen composiciones útiles para tratar trastornos neurológicos incluyendo trastornos neurodegenerativos asociados con la agregación perjudicial de proteínas, plegamiento aberrante de proteínas y/o trastornos neurodegenerativos autoinmunes tales como enfermedades amiloidogénicas cerebrales. También se describen métodos para usar dichas composiciones.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades neurológicas se caracterizan generalmente por la pérdida de neuronas de una o más regiones del sistema nervioso central. Los ejemplos de enfermedades neurológicas incluyen enfermedad de Alzheimer, neurofibromatosis, enfermedad de Huntington, depresión, esclerosis lateral amiotrófica, Esclerosis Múltiple, ictus, enfermedad de Parkinson y demencia multi-infarto. Son complejas tanto en el origen como la progresión y se ha probado que son algunos de los tipos de enfermedades más difíciles de tratar. De hecho, para algunas enfermedades neurológicas, no existen fármacos disponibles que proporcionen un beneficio terapéutico significativo. La dificultad para proporcionar terapia es todavía más trágica dados los efectos devastadores que tienen estas enfermedades en sus víctimas.

20 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno cerebral degenerativo caracterizado clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria, cognición, razonamiento, juicio y estabilidad emocional que da lugar gradualmente a un deterioro mental profundo y finalmente a la muerte. AD es una causa muy común de fallo mental progresivo (demencia) en los seres humanos ancianos y se cree que representa la cuarta causa médica más común de muerte en los Estados Unidos. Se ha observado AD en todas las razas y grupos étnicos en todo el mundo y presenta un problema importante de salud pública presente y futuro. Actualmente se estima que la enfermedad afecta aproximadamente a cuatro millones de individuos sólo en los Estados Unidos. Actualmente, AD es incurable. La administración de determinadas terapias se ha usado para tratar los síntomas de AD en los seres humanos. Sin embargo, actualmente no se conoce ningún tratamiento que prevenga eficazmente AD o revierta sus síntomas o curso en los seres humanos.

30 Los cerebros de los individuos con AD presentan lesiones características, denominadas placas seniles, y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles características de AD se localizan lo más frecuentemente extracelularmente mientras que los ovillos neurofibrilares se localizan lo más frecuentemente intracelularmente. Grandes números de estas lesiones se encuentran generalmente en los pacientes con AD en varias áreas del cerebro humano importantes para la memoria y la función cognitiva. Algunas veces se encuentran números más pequeños de estas lesiones en una distribución anatómica más restringida en los cerebros de seres humanos ancianos que no tienen AD clínica. El principal constituyente químico de las placas seniles y depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) característico de AD es una proteína designada péptido β -amiloide ($A\beta$), que también puede referirse como β AP, $A\beta$ P o β /A4. Las placas extracelulares que contienen $A\beta$ pueden ser densas o difusas. Las placas densas se refieren frecuentemente como placas fibrilares. $A\beta$ se purificó por primera vez y se publicó una secuencia de aminoácidos parcial por Glenner y Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 885-890. El procedimiento de aislamiento y los datos de la secuencia para los primeros 28 aminoácidos se describen en Pat. U.S. No. 4.666.829. Las formas de $A\beta$ que tienen aminoácidos más allá del número 40 se publicaron por primera vez por Kang et al. (1987) Nature 325: 733-736.

40 Neuropatológicamente, AD se caracteriza, en varios grados, por cuatro lesiones principales: a) depósitos intraneuronales, citoplásmicos de ovillos neurofibrilares (NFT), b) depósitos amiloides parenquimáticos denominados placas neuríticas, c) amiloidosis $A\beta$ cerebrovascular (por ejemplo, angiopatía amiloide), y d) pérdida sináptica y neuronal. Uno de los eventos clave de AD es la deposición de amiloide (por ejemplo, péptido $A\beta$) como masas fibrosas insolubles (amiloidogénesis) lo que resulta en placas neuríticas extracelulares y depósitos alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales. El constituyente principal de las placas neuríticas y angiopatía amiloide cerebral es $A\beta$, aunque estos depósitos también pueden contener otras proteínas tales como glicosaminoglicanos y apolipoproteínas.

45 Solomon, B. et al. (1997) PNAS 94(8): 4109-1.2 mostraron que un anticuerpo monoclonal frente al extremo N de $A\beta$ puede unirse a y disgregar ensamblajes preexistentes de péptido $A\beta$ y/o prevenir la agregación de fibrillas *in vitro* y prevenir la toxicidad para cultivos de células neuronales. Schenk, D. et al., Nature 400(6740): 173-177 (1999) demostraron que la inmunización con β -amiloide atenuaba la patología semejante a la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos PDAPP que sirven como un modelo animal para la deposición de β -amiloide y neuropatologías semejantes a la enfermedad de Alzheimer. Publicaron que la inmunización de animales jóvenes antes del inicio de las neuropatologías del tipo de la enfermedad de Alzheimer prevenía esencialmente el desarrollo de formación de placas β -amiloides, distrofia neurítica y astrogliosis, mientras que se observó que el tratamiento en animales más viejos después

- del inicio de neuropatologías del tipo de la enfermedad de Alzheimer reducía el grado y progresión de estas neuropatologías. Este efecto está mediado por anticuerpos, ya que se ha mostrado que los anticuerpos administrados periféricamente frente a A β reducen la carga amiloide parenquimática cerebral (Bard F. et al., (2000) Nat. Med. 6(8): 916-9). Además, la inmunización intranasal con A β 1-40 recién solubilizado reduce la carga amiloide cerebral (Weiner, H.L. et al., (2000) Ann. Neuro. 48(4): 567-79). Dos estudios, realizados por Morgan, D. et al., (2000) Nature 408(6815): 982-5; y Janus, C. et al., (2000) Nature 408(6815): 979-82, usando sistemas de modelos animales demostraron que una reducción inducida por vacunación de los depósitos amiloides cerebrales resultaba en mejoras cognitivas. Estudios adicionales han abordado varios aspectos del mismo tópico, incluyendo Dodart et al., (2002) Nat. Neuroscience 5(5): 452-7 y Kotilinek, L.A. et al., (2002) J. Neuroscience 22(15): 6331-5. Aunque la vacunación con A β ha mostrado algún éxito en varios estudios usando modelos animales de AD, los estudios clínicos en seres humanos inmunizados con péptidos A β 1-40/42 formulados en un adyuvante (QS21) terminaron debido a la alta ocurrencia de efectos secundarios perjudiciales y/o inaceptables tales como meningoencefalitis. Así, existe una necesidad de modalidades terapéuticamente aceptables para el tratamiento y/o prevención de AD y trastornos neurodegenerativos relacionados asociados con la agregación de proteínas.
- 15 Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una respuesta inmune anormal dirigida a tejidos propios o autólogos. Tomando como base el tipo de respuesta inmune (o reacción inmune) implicada, las enfermedades autoinmunes en mamíferos pueden clasificarse generalmente en uno de dos tipos diferentes: trastornos mediados por células (es decir, mediados por células T) o mediados por anticuerpos. La Esclerosis Múltiple (MS) es una enfermedad autoinmune mediada por células T (Trapp et al. New Eng. J. Med. 338(5): 278 (1998)). Más de 1.000.000 de adultos jóvenes en todo el mundo entre las edades de treinta y cuarenta tienen MS. MS es la enfermedad más común del sistema nervioso central y es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes. Patofisiológicamente, las células T circulantes autoreactivas median la mayor parte de la destrucción del sistema nervioso central observada en pacientes con MS (Rudick et al. New Eng. J. Med. 337: 1604 (1997)).
- 20 En MS, las células T reaccionan con la proteína básica de mielina (MBP) que es un componente de la mielina en el sistema nervioso central. La demostración de que las células T activadas específicas para MBP pueden aislarse de pacientes con MS apoya la propuesta de que MS es una enfermedad autoinmune en la que las células T destruyen el tejido neural propio o autólogo (Allegretta et al. Science: 247: 778 (1990)).
- MS se trata actualmente con determinados agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores, dichos agentes incluyen: (i) corticosteroides, que tienen tanto efectos inmunomoduladores como inmunosupresores; (ii) interferón- β ; (iii) acetato de glatiramer (GA); (iv) azatioprina, un análogo de purina que disminuye tanto la inmunidad mediada por células como humoral; (v) globulina inmune intravenosa; (vi) metotrexato, que inhibe la dihidrofolato reductasa y disminuye la inmunidad mediada por células y humoral; (vii) ciclofosfamida, un agente alquilante que tiene efectos citotóxicos e inmunosupresores; y (viii) ciclosporina, que tiene efectos inmunosupresores potentes inhibiendo la activación de las células T. A pesar del tratamiento con dichos fármacos anti-inflamatorios o inmunosupresores, más del 50% de los pacientes con MS se deterioran de forma continua como resultado de destrucción focal de la médula espinal, cerebelo y corteza cerebral.
- 30 Muchos de los fármacos usados actualmente para tratar MS tienen una eficacia a largo plazo limitada, en parte, porque tienen efectos citotóxicos significativos. Por ejemplo, el tratamiento prolongado con ciclofosfamida puede dar lugar a alopecia, náusea, vómito, cistitis hemorrágica, leucopenia, miocarditis, infertilidad y fibrosis pulmonar intersticial. El tratamiento con agentes inmunosupresores puede inducir eventualmente inmunosupresión "global" en el paciente tratado, lo que incrementa en gran medida el riesgo de infección. Los pacientes sometidos a inmunosupresión global prolongada tienen un riesgo incrementado de desarrollar complicaciones médicas graves del tratamiento, tales como malignidades, fallo renal y diabetes.
- Una estrategia alternativa al tratamiento de MS es el uso de la administración intravenosa u oral de MBP para modular la respuesta inmune de células T que puede estar asociada con ella. La administración intravenosa de MBP o fragmentos de ésta que contienen epítomos inmunodominantes de MBP suprime el sistema inmune causando anergia clonal o falta de respuesta de células T lo que inactiva las células T específicas para MBP. El resultado final es que las células T específicas de MBP no proliferan más en respuesta a MBP. La incapacidad de las células T de proliferar resulta en una disminución de la destrucción mediada por células T de los tejidos neurales.
- 45 Un análogo inmunoquímico de MBP usado para tratar MS es acetato de glatiramer (GA), o copolímero-1 (COP-1) (Pat. U.S. No. 3.849.550; Solicitud PCT WO/95/31990). GA, en su forma disponible comercialmente, es una mezcla de polipéptidos sintéticos al azar compuesta por L-alanina, L-ácido glutámico, L-lisina y L-tirosina en una proporción molar de 6,0:1,9:4,7:1,0. Se sintetizó por primera vez como un mimético inmunoquímico de MBP. Por ejemplo, determinados anticuerpos monoclonales frente a GA reaccionan de manera cruzada con MBP (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9258 (1991)). También, se ha encontrado que GA induce células T supresoras específicas para MBP (Lando et al. J. Immunol. 123: 2156 (1979)). Los experimentos en ratones indican que GA también inhibe específicamente las

células T específicas de MBP que están implicadas en la destrucción del tejido del sistema nervioso central en Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE) (Teitelbaum et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9724 (1995)).

La administración de GA puede: (i) incrementar el porcentaje de células NK; (ii) reducir los receptores de IL-2 séricos; (iii) suprimir TNF- α ; e (iv) incrementar TGF- β e IL-4 (Ariel et al. Multiple Sclerosis 3(5), S053 (1997)).

- 5 Aunque los pacientes con MS se han tratado con relativo éxito con GA administrado parenteralmente (Bornstein et al. Transactions American Neurological Association, 348 (1987)), el régimen de tratamiento actual y los efectos globales podrían mejorarse.

WO 02/072012 describe la fabricación de Protolina (IVX-908) y su uso como un adyuvante para la producción de vacunas, en el que la vacunación se realiza a través de la ruta mucosal, transdérmica, tóptica o transmucosal.

- 10 Jones, T. et al. (Vaccine Vol. 22, No. 27-28, Sept. 9, 2004, p. 3691-7) revela el uso de Protolina como un adyuvante nuevo que comprende proteosomas formando complejos no covalentes con LPS y la inmunización intranasal de ratones con Protolina.

Lowell G.H. (NEW GENERATION VACCINES, 1997, p. 193-206) describe proteosomas para vacunas nasales, orales o inyectables mejoradas.

- 15 WO 01/52878 describe métodos para tratar daño a o enfermedad del sistema nervioso central o periférico mediante la administración de Cop-1 (Acetato de Glatiramer) o un péptido o polipéptido relacionado con Cop-1 para estimular la regeneración nerviosa o para prevenir o inhibir la degeneración neuronal en el sistema nervioso.

Kipnis, J. et al. (J. Neurotrauma, Vol. 20, no. 6, junio 2003, p. 559-69) describe una vacunación terapéutica para lesión cerrada de la cabeza por la vacunación post-traumática con Cop-1 (Glatiramer) en ratones.

- 20 Todas las declaraciones respecto a la fecha o representación respecto a los contenidos de estos documentos se basa en la información disponible para el solicitante y no constituye ninguna admisión respecto a la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

Resumen de la invención

- 25 La presente invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos beta-amiloides en mamíferos. Dichas enfermedades o trastornos neurológicos están asociados con una deposición sistémica o localizada de material proteico o proteináceo (amiloidosis), agregación perjudicial de proteínas (plegamiento incorrecto de proteínas) y/o autoinmunidad neurodegenerativa. Hay un interés particular en las enfermedades que forman amiloide tal como enfermedad de Alzheimer y/o otras enfermedades amiloidogénicas cerebrales incluyendo enfermedades relacionadas con priones, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Revesz, T. et al. (2003) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62(9): 885-98). El tratamiento de dichas enfermedades relacionadas con amiloide puede incluir prevenir la formación de nuevas placas amiloides (deposición), mantener los niveles actuales de placas amiloides y/o disminuir la cantidad de placa amiloide existente o proteína amiloide cerebral total (incluyendo A β que puede no estar depositado en placas) según se mide determinando la carga amiloide total (A β soluble e insoluble) o la cantidad de carga de A β -amiloide fibrilar. El tratamiento de dichos trastornos autoinmunes puede incluir prevenir la formación de células T autoreactivas, mantener las concentraciones actuales de células T autoreactivas y/o disminuir la concentración de células T autoreactivas.
- 30
- 35

- 40 La presente invención utiliza varias formulaciones de una composición basada en proteosoma y/o una composición de GA, opcionalmente en una emulsión submicrónica, o una nanoemulsión, como terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos neurológicos en mamíferos incluyendo enfermedades o trastornos relacionados con placas de A β y enfermedades o trastornos autoinmunes mediados por células.

Descripción breve de los dibujos

- Figura 1: Efecto de inmunización subcutánea en los niveles totales de A β en el cerebro. Para cuantificar la carga amiloide, se extrajo el hemisferio derecho en 5,0 M cloruro de guanidinio (pH 8) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se usaron diluciones para medir los niveles de A β 40 y A β 42 por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) en sandwich.
- 45

Figura 2: Efecto de inmunización nasal en los niveles totales de A β en el cerebro. Niveles totales de concentración de A β de A β 40 y A β 42 de ratones individuales después del tratamiento nasal medidos por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) en sandwich.

Figura 3: La activación de células CD11b+ dio lugar al aclaramiento de fibrillas de A β en ratones tratados parenteralmente y nasalmente. (A) Tinción de fibrillas de A β en la región del hipocampo con tioflavina-S (Aumento x10) o co-tinción para A β total con anticuerpo anti-A β (R1288) y anti-CD11b (microglía/macrófago) Aumento x40) después de inmunización subcutánea. (B) Co-tinción con anticuerpo anti A β (R1288) y anti-CD11b (microglía/macrófago) (en la región del hipocampo Aumento x40) después de inmunización nasal.

Figura 4: Inmunohistología de secciones cerebrales después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones seriadas de la región del hipocampo de ratones no tratados o inmunizados 50 días después de la inmunización usando anticuerpos anti CD11b, CD3, IFN- γ y TGF- β (aumento x20, aumento de la figura insertada x60).

Figura 5: Reducción en la astrocitosis después de administración nasal de GA+IVX-908. Se seleccionaron regiones del hipocampo bien definidas (Bregma - 1,44 mm) para la cuantificación de astrocitos activados usando tinción con GFAP. El nivel de la activación de los astrocitos se expresó como un porcentaje por mm² de región del hipocampo; p= 0,039 GA+IVX-908 frente a control; p= 0,02 frente a EAE (MOG).

Figura 6: Neuropatología en secciones cerebrales después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones seriadas de la corteza de ratones no tratados o tratados 50 días después de la inmunización usando marcadores de neurotoxicidad: SMI32, TUNEL e iNOS (aumento original x20). Las flechas identifican el marcaje para los marcadores estudiados. El marcaje para los marcadores de neurotoxicidad se observó en animales EAE, pero no en animales tratados con GA-IVX-908.

Figura 7: Integridad de la barrera hemato encefálica en la sección del hipocampo después de de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones seriadas de la corteza de ratones no tratados o tratados 50 días después de la inmunización usando marcadores de tinción plasmática-fibrinógeno. El marcaje para los marcadores de fibrinógeno se observó en animales EAE, pero no en animales tratados con GA-IVX-908. (Aumento x20, aumento de la figura pequeña x40).

Figura 8: Neuropatología en secciones olfativas después de inmunización subcutánea con MOG y vacunación nasal con acetato de glatiramer. Se marcaron secciones seriadas de la corteza de ratones no tratados o tratados 50 días después de la inmunización usando marcadores de amiloide fibrilar: ThS, activación de microglía CD11b, integridad BBB, Fibrinógeno. (Aumento x20).

Figura 9: Tinción para células CD68+ en el SNC de ratones no tratados, inmunizados con MOG y tratados con GA+IVX-908. Las flechas identifican células CD68+ que se infiltran en el SNC en EAE, pero que permanecen localizadas en el plexo coroideo en ratones tratados con GA+IVX-908. No se observó ninguna tinción en los ratones no tratados. Las secciones se tomaron del cerebelo (Aumento x20).

Modos para poner en práctica la invención

El término "enfermedad neurológica" se refiere a una enfermedad o trastorno, que implica a las células neuronales del sistema nervioso. Específicamente están incluidas: enfermedades de priones (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob); patologías del cerebro en desarrollo (por ejemplo, defectos congénitos en el metabolismo de aminoácidos, tal como argininosuccinicaciduria, cistationinuria, histidinemia, homocistinuria, hiperamonemia, fenilcetonuria, tirosinemia y síndrome de X frágil); patologías del cerebro maduro (por ejemplo, neurofibromatosis, enfermedad de Huntington, depresión, esclerosis lateral amiotrófica, Esclerosis Múltiple); afecciones que afectan en la edad adulta (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick); y otras patologías del cerebro (por ejemplo, accidentes cerebrales, daño cerebral, coma, infecciones por varios agentes, deficiencias en la dieta, ictus, demencia con infarto múltiple y accidentes cardiovasculares).

Las enfermedades o trastornos preferidos de la presente invención son aquellas enfermedades que típicamente afectan en la edad adulta, tal como la enfermedad de Alzheimer.

El término "enfermedad de Alzheimer", abreviado en la presente memoria como "AD" se refiere a una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central. Hablando en general, la enfermedad tiene dos categorías: inicio tardío, que se produce en edad avanzada (típicamente más de 65 años) e inicio temprano, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, por ejemplo, entre 35 y 60 años. En ambos tipos de la enfermedad, la patología es similar, pero las anormalidades tienden a ser más graves y extendidas en los casos que empiezan a una edad temprana. AD se caracteriza por la acumulación de amiloide cerebral localizado extracelularmente (por ejemplo, péptido A β), placas amiloides (que pueden distinguirse adicionalmente como densas o difusas) y ovillos neurofibrilares localizados intracelularmente concentrados en determinadas regiones vulnerables del cerebro tales como el hipocampo y la corteza.

AD es una enfermedad progresiva que resulta en demencia senil. Las placas amiloides son áreas de fibras neurofibrilares desorganizadas que pueden estar asociadas con neutrófilos hasta 150 mm de ancho con depósitos de beta-amiloide (A β) extracelular en el centro, visible por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares con depósitos intracelulares de proteína tau (frecuentemente hiperfosforilada) que consisten en dos filamentos girados uno alrededor del otro en parejas. AD está asociada con la acumulación anormal de péptido A β que resulta en un procesamiento proteolítico alterado de la proteína precursora de amiloide (APP). La acumulación anormal de A β se ha correlacionado con una variedad de mutaciones, tales como mutaciones autosómicas dominantes de APP y mutaciones en genes que codifican proteínas referidas como presenilina 1 (PS 1) y presenilina 2 (PS 2), que posteriormente afecta la actividad proteolítica de la secretasa γ (gamma) o β (beta), causando niveles incrementados, por ejemplo, de A β 1-42; mientras que la actividad proteolítica de la secretasa α (alfa) está asociada presumiblemente con el procesamiento normal de APP. En AD se encuentran varios tipos de placas, incluyendo, pero no limitado a, placas neuríticas asociadas con neuritis distróficas anormales. También es característica de la enfermedad la presencia de una respuesta inflamatoria en el SNC, incluyendo microglía y astrocitos activados. Se piensa que la acumulación de agregados de proteína disfuncional (por ejemplo, A β y proteína de prión) asociada con trastornos neurológicos causa o contribuye a o influye de otra forma en el desarrollo de determinados trastornos neurológicos (Ingelsson, M. y Hyman B.T. (2002) *Annals of Med.* 34: 259-271). Los trastornos neurodegenerativos asociados con agregación perjudicial de proteínas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de priones, Huntington y trastornos de neuronas motoras. (Shastry, *Neurochemistry International*, 2002, 43: 1-7).

El término "amiloide" se refiere a la deposición extracelular (por ejemplo, A β , enfermedades de priones y enfermedad de mieloma múltiple de cadena ligera) o intracelular (por ejemplo, ovillos neurofibrilares de proteína tau en AD y alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson) de agregados proteicos (Trajanowski J.Q. y Mathson M.P. (2003) *Neuromolecular Medicine* 4: 1-5). La deposición amiloide puede encontrarse en el cerebro de pacientes con AD y Síndrome de Down así como en arterias, arteriolas, capilares y venas del sistema nervioso central. Los depósitos amiloides pueden reconocerse por la capacidad de unir colorantes tales como rojo Congo y tioflavina S y formar fibrillas, incluyendo una conformación de lámina β plegada cruzada.

El término "amiloidosis" se refiere a un gran grupo heterogéneo de trastornos caracterizado por depósitos insolubles aberrantes de proteínas normalmente solubles, que pueden ser proteínas plegadas incorrectamente, incluyendo agregados proteicos.

Además de la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y enfermedad de Alzheimer presintomática, otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son, por ejemplo, amiloidosis de Amiloide A Sérico (SAA), síndrome islándico hereditario, mieloma múltiple, enfermedades de priones y semejantes, u otras enfermedades amiloidogénicas cerebrales (Revesz, T. et al. (2003) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62(9): 885-98). Las enfermedades de priones más comunes en animales son tembladera de ovejas y cabras y encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) del ganado vacuno (Wilesmith y Wells (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172: 22-38). Se han identificado cuatro enfermedades de priones en los seres humanos: (i) kuru, (ii) enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (iii) enfermedad de Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS) y (iv) insomnio familiar mortal (FFI) (Gajdusek, D.C. (1977) *Science* 197(4307): 943-60 y Medori, R. et al., (1992) *N. Engl. J. Med.* 326(7): 444-9).

El constituyente principal de las placas seniles es el péptido A β . El péptido A β es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de la proteína precursora APP. Varias mutaciones en la proteína APP se han correlacionado con la presencia de enfermedad de Alzheimer (Véase, por ejemplo, Goate, A. et al., (1991) *Nature* 349(6311): 704-6, Murrell, M. et al., (1991) *Science* 254(5028): 97-9, Mullan, M. et al., (1992) *Nat. Genet.* 1(5): 345-7).

El término "proteína precursora de β -amiloide" (APP) tal y como se usa en la presente memoria se define como un polipéptido que está codificado por un gen del mismo nombre localizado en los seres humanos en el brazo largo del cromosoma 21 y que incluye A β en su tercio carboxilo. APP es una proteína glicosilada, con un único recorrido en la membrana expresada en una amplia variedad de células en muchos tejidos de mamíferos.

Se piensa que las mutaciones en APP influyen en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer mediante el procesamiento proteolítico incrementado alterado de APP a A β , particularmente el procesamiento de APP a cantidades incrementadas de la forma larga de A β (es decir, A β 1-42 y A β 1-43). Se piensa que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el procesamiento proteolítico de APP para generar cantidades incrementadas de la forma larga de A β (véase Hardy, J. (1997) *Trends Neurosci.* 20(4): 154-9). Estas observaciones indican que A β , y particularmente su forma larga, es un elemento causante en la enfermedad de Alzheimer.

El término "fragmentos de APP" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a fragmentos de APP distintos de aquellos que consisten solamente en A β o fragmentos de A β . Esto es, los fragmentos de APP incluirán las secuencias de aminoácidos de APP además de aquellas que forman A β intacto o un fragmento de A β .

5 El término "péptido beta-amiloide" es sinónimo de "péptido β -amiloide", " β AP", " β A" y "A β ". Todos estos términos se refieren a un péptido formador de placas derivado de fragmentos de la proteína precursora de amiloide.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, la definición de los términos A β fibrilar y A β total es como sigue. A β "fibrilar" es péptido A β contenido en depósitos amiloides extracelulares que también pueden referirse como placas A β o placas; en algunos casos, las placas A β pueden distinguirse adicionalmente como difusas o densas. Carga amiloide "total" o carga A β total es la suma del péptido A β soluble e insoluble (por ejemplo, fibrilar), la mayor parte del cual se presume que es extracelular. Se aprecia que existe una relación dinámica entre A β soluble e insoluble, en el que, A β no fibrilar extracelular puede representar una fuente de A β que puede convertirse en amiloide fibrilar.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE) es el modelo animal principal para MS. EAE puede inducirse fácilmente en mamíferos pequeños por inmunización con MBP en un adyuvante apropiado o por transferencia pasiva de células T CD4+, reactivas para MBP (Alvord Jr, E.C., et al. eds. en *Experimental Allergic Encephalomyelitis a Useful Model for Multiple Sclerosis*, A.R. Liss, N.Y., 1984; Makhtarian et al. *Nature* 309: 356 (1984); Ben-Nun et al. *J. Immunol.* 129: 303 (1982)). Las células T que inducen EAE tanto en ratones como en ratas reconocen los péptidos correspondientes a regiones inmunodominantes de MBP presentadas por células presentadoras de antígeno en moléculas de la clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

20 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico beta-amiloide en un mamífero. Este aspecto de la presente invención puede efectuarse administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de GA y una composición basada en proteosoma a un sujeto que lo necesita en el que dicha enfermedad o trastorno neurológico es una enfermedad o trastorno en el que se forman placas amiloides. La enfermedad o trastorno neurológico más prominente tratado con GA y una composición basada en proteosoma según la presente invención es la enfermedad de Alzheimer. Además de un uso de una composición terapéutica del GA combinado con un proteosoma para el tratamiento de las enfermedades o trastornos neurológicos mencionados anteriormente, las realizaciones adicionales incluyen, el uso de las composiciones terapéuticas siguientes para tratamiento: una composición basada en proteosoma sin una composición de GA, GA en una composición de emulsión submicrónica o GA en una composición de nanoemulsión. Las realizaciones previas también incluirían cualquier diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Un aspecto adicional más de la presente invención es en el que el tratamiento de dicha enfermedad o trastorno neurológico en un mamífero comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de GA y una composición basada en proteosoma que incita una respuesta independiente de anticuerpo en dicho mamífero.

35 Una realización adicional de la presente invención consiste en un tratamiento de una enfermedad beta-amiloide, que puede ser la enfermedad de Alzheimer. El tratamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, previniendo un incremento de la carga amiloide fibrilar, previniendo un incremento en la carga amiloide total, manteniendo la carga amiloide fibrilar y/o total actual o disminuyendo la carga amiloide fibrilar y/o total en el cerebro. Como se sabe que las proteínas amiloidales pueden residir en todo el cuerpo, las realizaciones de la presente invención no están limitadas a amiloide cerebral. La presente invención discute específicamente β -amiloide. Otras clases de amiloide son amiloide A sérico (SAA), enfermedad de priones, síndrome islándico hereditario, enfermedad de Huntington, Parkisonismo, Síndrome de Down y angiopatía amiloide cerebral. Según las enfermedades beta-amiloidales mencionadas anteriormente, el tratamiento puede conseguirse por la administración de una de las composiciones terapéuticas siguientes: una cantidad terapéuticamente eficaz de GA y una composición basada en proteosoma, una composición basada en proteosoma sin una composición de GA, GA en una emulsión submicrónica y/o GA en una nanoemulsión. Las realizaciones previas también incluirían cualquier diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 **Acetato de glatiramer**

Un análogo inmunoquímico de MBP que es eficaz en el tratamiento de esclerosis múltiple (MS) es acetato de glatiramer (GA), o copolímero-1 (Cop-1) (Pat. U.S. No. 3.849.550; Solicitud PCT WO/95/31990). GA, en su forma disponible comercialmente, es una mezcla de polipéptidos sintéticos al azar compuesta por L-alanina, L-ácido glutámico, L-lisina y L-tirosina en una proporción molar de 6,0:1,9:4,7:1,0. Se sintetizó por primera vez como un mimético inmunoquímico de MBP. Por ejemplo, determinados anticuerpos monoclonales frente a GA reaccionan de manera cruzada con MBP (Teitelbaum et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9258 (1991)). También, se ha encontrado que GA induce células T supresoras específicas para MBP (Lando et al. *J. Immunol.* 123: 2156 (1979)). Los experimentos en ratones indican que GA también inhibe específicamente las células T específicas de MBP que están implicadas en la destrucción del tejido del sistema nervioso central en EAE (Teitelbaum et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9724 (1995); y Angelov, D.N. et al.

PNAS 100(8): 4790-4795 (2003)), indican que GA puede usarse para tratar esclerosis lateral amiotrófica, en el que la inducción de una respuesta autoinmune bien regulada parece influir en la supervivencia en presencia de una respuesta de células T anti-propio, que puede potenciarse por la administración de GA.

5 GA, según la presente invención, puede prepararse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, GA puede prepararse por el proceso descrito en Pat. U.S. No. 3.849.550, en el que los N-carboxianhídridos de tirosina, alanina, glutamato de γ -bencilo y ϵ -N-trifluoro-acetilisina se polimerizan a temperatura ambiente en dioxano anhidro con dietilamina como un inhibidor. El desbloqueo del grupo γ -carboxilo de los ácidos glutámicos se lleva a cabo con bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial y es seguido de la eliminación de los grupos trifluoroacetilo de los residuos de lisina por 1M piperidina. La mezcla resultante de polipéptidos consiste esencialmente en polímeros de alanina, ácido glutámico, lisina y tirosina en una proporción molar de aproximadamente 6:2:5:1.

GA también está disponible comercialmente en Teva Pharmaceuticals, Kfar-Saba, Israel.

15 GA puede prepararse para uso según la presente invención en cualquiera de las formas que mantienen su utilidad terapéutica. Éstas incluyen mezclas de péptidos que tienen varios intervalos de pesos moleculares. Puede obtenerse GA que tiene un intervalo de peso molecular deseado por métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen cromatografía líquida de alta presión por filtración en gel de GA para eliminar especies de alto peso molecular como se describe en WO 95/31990. En una realización, el GA tiene aproximadamente 75% de sus especies poliméricas en el intervalo de peso molecular de aproximadamente 2 KDa a aproximadamente 20 KDa. En otra realización, el GA tiene un peso molecular medio de aproximadamente 4 KDa a 9 KDa. Se entiende que GA puede someterse a degradación enzimática u otra con el fin de comprender especies poliméricas con una longitud diferente de, o modificada de otra forma, de GA convencional según los métodos conocidos.

GA y proteosomas

25 GA formulado con proteosomas (por ejemplo, IVX-908 o Protolina) puede administrarse, por ejemplo, por inyección o intranasalmente. Cuando se administra por inyección, dicha administración puede ser como una inyección (administración combinada simultánea). Alternativamente, la administración de una composición de GA y una composición basada en proteosoma puede administrarse separadamente, lo que se consigue por la inyección en una pluralidad de sitios que puede ocurrir simultáneamente o en tiempos temporalmente distintos y en el que un sitio se presenta sólo con una composición de GA (es decir, sin proteosomas) y, en un segundo sitio, sólo se administra una composición basada en proteosoma (es decir, sin GA). También se contempla que GA puede administrarse por inyección mientras que en el mismo tiempo o diferente una composición basada en proteosoma se administra, por ejemplo, intranasalmente. Así, en una realización de la presente invención, una composición de GA se administra por inyección y, separadamente, una composición basada en proteosoma se administra intranasalmente.

35 Los péptidos GA de la presente invención también pueden prepararse para contener un resto de secuencia de anclaje hidrofóbico que se esperaría que potenciara la asociación no covalente con proteosomas. La producción y fabricación de vacunas proteosoma-determinante anfílico diseñadas para la administración parenteral o especialmente mucosal incluyendo, administración gastrointestinal para inducir respuestas de anticuerpo tanto sistémicas como mucosales se discute en Pat. U.S. No. 6.476.201. Un determinante anfílico es una molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que, cuando se formulan apropiadamente con proteosomas, se alinean con los proteosomas para formar un complejo que incita una respuesta inmunológica en un sujeto. Los determinantes anfílicos típicos incluyen glicolípidos, liposacáridos (incluyendo lipopolisacáridos destoxificados), lipopéptidos, dominios transmembrana, proteínas de cubierta o de toxoide o proteínas o péptidos con anclajes de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos.

Composiciones en emulsión

45 GA puede administrarse en o formularse con una emulsión submicrónica o nanoemulsión como se describe en la Patente U.S. 5.961.970 ó 5.716.637, respectivamente. La composición comprende una emulsión submicrónica de aceite en agua con aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50% de un aceite, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% de un emulsionante, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5% de un tensioactivo no iónico y aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 1,0% de GA como una fase acuosa continua. La emulsión submicrónica tiene un tamaño medio de gotita en el intervalo entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,5 μm y preferiblemente 0,05 y 0,2 μm .

50 La estrategia de nanoemulsión proporciona composiciones de vacuna que contienen nanoemulsiones de partículas que tienen un núcleo lipídico, rodeado por al menos una bicapa de fosfolípidos. Las partículas tienen un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 nm, según se determina tomando como base el peso, y el GA se incorpora en ellas, bien intrínsecamente antes del proceso de homogeneización o extrínsecamente posteriormente. Las partículas se suspenden típicamente en una fase acuosa continua y cada partícula lipídica comprende un núcleo

lipídico, en el que el lípido es un cristal sólido o líquido en masa a una temperatura de aproximadamente 25°C o mayor. Habitualmente, la cantidad de GA atrapado es aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5%. Alternativamente, el GA puede formularse con un proteosoma y/o la nanoemulsión puede comprender además una macromolécula bioadhesiva o mucoadhesiva.

5 Mecanismo propuesto

La invención también incluye, por ejemplo, medios para inhibir o reducir el nivel de un péptido β -amiloide (soluble y/o insoluble), fragmento o derivado de éste, que comprende inmunizar un mamífero con GA formulado con una composición basada en proteosoma, o una composición basada en proteosoma sin GA, en el que se produce la reducción o inhibición del péptido, fragmento o derivado de éste sin la generación de anticuerpos, como se demuestra en la presente memoria usando ratones deficientes en células B (μ MT), que son incapaces de incitar una respuesta de anticuerpo. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, preferiblemente, la inhibición o reducción de amiloide (por ejemplo, péptido A β) es mediante una activación de células inmunes tales como microglía localizadas en el cerebro o neutrófilos y/o macrófagos que pueden encontrarse en el cerebro o periféricamente, en el que la activación de estas células es independiente de cualquier mecanismo de anticuerpo o específico de antígeno. Lo más preferido es que la reducción o inhibición se produzca sin causar Encefalomielitis Alérgica Experimental (EAE) en el mamífero (incluyendo meningoencefalitis).

La reducción de carga beta amiloide (por ejemplo, A β que comprende placas fibrilares más A β no fibrilar que puede no estar depositado en placas) se refiere a la reducción de deposición beta-amiloide y/o formación de placas A β y de esta manera al tratamiento de AD y enfermedades relacionadas o enfermedades o trastornos beta-amiloidogénicos. Se cree que la microglía activada se co-localiza con las placas amiloides y la activación de células microgliales depende de la presencia de deposición amiloide, deposición que ceba a las células microgliales endógenas para activación. Así, las células microgliales activadas participan en el aclaramiento de los depósitos amiloides (por ejemplo, placa A β). La información adicional sobre el posible mecanismo para AD se encuentra en Schenk, D. (2002) Nature 3: 824-828. La deposición de A β y la formación de placas amiloides parece que está acompañada de una cascada compleja inflamatoria y neurotóxica. Por lo tanto, se piensa que puede ser beneficioso un mecanismo de tratamiento anti-inflamatorio. Dichos procesos anti-inflamatorios son consistentes frecuentemente con la expresión de respuestas anti-inflamatorias IL-4/IL-10 (Th2) e inmunes TGF- β (Th3). Consecuentemente, es un descubrimiento sorprendente e inesperado que las presentes formulaciones que comprenden composiciones basadas en proteosoma y GA estimulen una respuesta inmune no mediada por anticuerpo que causa la reducción de placas que contienen A β , ya que se ha propuesto previamente que los proteosomas están más frecuentemente asociados con la estimulación de una respuesta inmune de tipo Th1 (citoquina) asociada con una respuesta inmune pro-inflamatoria y sería apositivo de y distinta de una respuesta inmune Th2. Sin embargo, el aumento de la fagocitosis microglial por la citoquina de tipo Th1, INF-gamma (75% por encima de los no tratados), también podría sugerir un mecanismo de retroalimentación para el aclaramiento acelerado del infiltrado inflamatorio en el SNC (Cha, A. et al. (2001) GLIA 33(1):87-95). Además, INF-gamma por sí mismo también puede dar lugar a la inhibición transcripcional de la proteína precursora de beta-amiloide (Ringheem G.E. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) 224(1): 246-51).

Composiciones basadas en proteosoma

La materia de las Patentes US 6.476.201 y 5.961.970 describe cómo para que vacunas de subunidad multivalente estimulen respuestas inmunes óptimas para cada uno de los componentes, los componentes apropiados deben estar asociados apropiadamente y cada uno debe estar disponible para el sistema inmune de manera que puedan ser reconocidos y procesados eficazmente por las células del sistema inmune. Dicho reconocimiento y procesamiento puede incluir la captación por células membranosas (células M) localizadas, por ejemplo, en los epitelios nasales y administración posterior a las células subyacentes del sistema inmune del huésped. Los ejemplos principales de dichas vacunas que forman complejos no covalentemente incluyen vacunas basadas en proteosomas que pueden consistir en las proteínas de la membrana externa de *Neisseria* formando complejo no covalentemente con una amplia variedad de antígenos incluyendo péptidos, lipopéptidos, proteínas transmembrana o de toxoide, polisacáridos o lipopolisacáridos (LPS) (para una revisión adicional véanse las referencias siguientes: Patente U.S. 5.726.292, Immunogenicity and Efficacy of Oral or Intranasal Shigella flexneri 2a and Shigella sonnei Proteosome-Lipopolysaccharide Vaccines in Animal Models; Infect. Immun. 61: 2390; Mallett, C.P., T.L. Hale, R. Kaminski, T. Larsen, N. Orr, D. Cohen y G.H. Lowell. (1995)); Intranasal or intragastric immunization with proteosome-Shigella lipopolysaccharide vaccines protect against lethal pneumonia in a murine model of shigellosis (Infect. Immun. 63: 2382-2386; Lowell G.H., Kaminski R.W., Grate S. et al. (1996)); Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice (Infect. Immun. 64: 1706-1713; Lowell, G.H. (1990)); Proteosomes, Hydrophobic Anchors, Iscoms and Liposomes for Improved Presentation of Peptide and Protein Vaccines (en New Generation Vaccines: G.C. Woodrow y M.M. Levine, eds. (Marcel Dekker, NY) Capítulo 12 (p. 141-160)); y

Proteosome-lipo-peptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides; (Lowell, G.H., W.R. Ballou, L.F. Smith, R.A. Wirtz, W.D. Zollinger y W.T. Hockmeyer (1988) Science 240: 800)).

Las composiciones basadas en proteosoma tal y como se usan en la presente memoria se refiere a preparaciones de proteínas de la membrana externa (OMP, también conocidas como porinas) de bacterias Gram-negativas, tales como especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell et al., J. Exp. Med. 167: 658, 1998; Lowell et al., Science 240: 800, 1988; Lynch et al., Biophys. J. 45: 104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2ª ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basilea, Hong Kong, páginas 193, 1997; Patente U.S. No. 5.726.292; Patente U.S. No. 4.707.543), que son útiles como un vehículo o un adyuvante para inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o virales. Los proteosomas preparados como se describe anteriormente también contienen un lipopolisacárido (LPS) endógeno que se origina de las bacterias usadas para producir las porinas OMP (por ejemplo, especie de *Neisseria*). En la definición de proteosoma se incluye cualquier método de preparación que resulta en que el componente proteico de la membrana externa esté en forma vesicular o semejante a vesícula, incluyendo estructuras membranosas multi-moleculares o composiciones de OMP semejantes a globular fundido de una o más OMP.

"Liposacárido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a lipopolisacárido o lipooligosacárido nativo o modificado (en conjunto, también referido como "LPS") derivado de bacterias Gram-negativas tales como *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides* u otras bacterias Gram-negativas (incluyendo *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Hemophyllus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Providencia*, otras *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, otras *Shigella*, *Spirillum*, *Veillonella*, *Vibrio* o especies de *Yersinia*). Debe indicarse que LPS tal y como se usa en la presente memoria puede estar no destoxificado o destoxificado.

En otras realizaciones, el LPS exógeno aislado de la misma bacteria o diferente de la que se preparó un proteosoma puede mezclarse con éste; una composición como ésta basada en proteosoma se refiere en la presente memoria como IVX-908 (también puede referirse como Protolina). En otras palabras, los proteosomas del tipo IVX-908 son preparaciones de OMP mezcladas con al menos una clase de liposacárido para proporcionar una composición OMP-LPS (que puede funcionar como una composición inmunoestimuladora). Así, el adyuvante OMP-LPS (IVX-908) puede estar comprendido por dos de los componentes básicos (1) una preparación de proteína de la membrana externa de proteosomas preparada a partir de bacterias Gram-negativas, tales como *Neisseria meningitides*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. También se contempla que los componentes de IVX-908 pueden ser o incluir lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, moléculas pequeñas o semejantes.

Las composiciones basadas en proteosoma como se describe en la presente memoria pueden incluir uno o más componentes que, al menos en parte, funcionan como un adyuvante que posee la capacidad de estimular el sistema inmune de un huésped. Se aprecia que dichos componentes de proteosoma pueden incluir un componente de proteína de membrana externa (OMP) (proteína de fusión o fragmento de ésta) de bacterias gram negativas así como un componente de lipopolisacárido (LPS) de la misma bacteria gram negativa o una diferente. Dichos componentes pueden funcionar, por ejemplo, como ligandos que estimulan la respuesta inmune de un huésped interactuando con determinados receptores (por ejemplo, receptores semejantes a Toll) producidos por una o más células huésped del receptor de una vacuna.

Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, uno o más componentes de las formulaciones de vacuna descritas en la presente memoria pueden interactuar con receptores semejantes a Toll (TLR) asociados con una respuesta inmune innata y/o adaptativa del receptor de una vacuna. Existen al menos 10 TLR (véase Takeda et al., Annu. Rev. Immunology (2003) 21: 335-76). Uno o más ligandos que interactúan con y posteriormente activan determinados TLR se han identificado, con la excepción de TLR8 y TLR10. Las proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitides*, por ejemplo, OMP 2 (también referida como Por B), interactúa con TLR2, mientras que los LPS de la mayor parte pero no todas las bacterias gram negativas interactúan con TLR4. De acuerdo con esto, un mecanismo por el que las formulaciones de vacuna descritas en la presente memoria pueden contribuir a un efecto biológico incluye la activación de uno o ambos TLR2 y TLR4. Sin embargo, en otro aspecto de la presente invención, es igualmente posible que la activación de otros TLR (distintos de TLR2 y TLR4) pueda realizar una función similar o potenciar adicionalmente el perfil cualitativo y/o cuantitativo de las citoquinas expresadas, y que puede estar asociado con una respuesta inmune Th1/Th2 del huésped.

Se espera que la activación cualitativa y/o cuantitativa de uno o más TLR incite o influya en una estimulación relativa (equilibrada o desequilibrada) de una respuesta inmune Th1 y/o Th2, con o sin una respuesta de anticuerpo humoral simultánea.

Los ligandos que interactúan con TLR distintos de TLR2 y TLR4 también pueden usarse en las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria. Dichos componentes de la vacuna pueden usarse, solos o en combinación,

para influir en el desarrollo de la respuesta inmune de un huésped suficiente para tratar o proteger de enfermedad amiloigénica, como se muestra en la presente memoria. Dichos TLR y ligandos asociados incluyen, pero no están limitados a, los presentados en la Lista 1.

Lista 1

Familia TLR	Ligandos (ejemplo de posible fuente)
TLR1	Factores solubles (<i>Neisseria meningitides</i>) Lipopéptidos tri-acilo (bacterias, micobacterias)
TLR2	Lipoproteínas y lipopéptidos Porinas (<i>Neisseria</i>) LPS atípico (<i>Leptospira interrogans</i>) LPS atípico (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) Peptidoglicano (bacterias Gram-positivas) Ácido lipoteicoico (bacterias Gram positivas) HSP70 (huésped) Glicolípidos (<i>Treponema maltophilum</i>)
TLR3	ARN bicatenario (por ejemplo, viral)
TLR4	LPS (bacterias Gram-negativas) Taxol (planta) HSP60 (huésped) HSP70 (huésped) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) Fibrinógeno (huésped)
TLR5	Flagelina (bacterias)
TLR6	Lipopéptidos diacilo (micoplasma)
TLR7	Imidazoquinolina (compuestos sintéticos) Loxoribina (compuestos sintéticos) Bropirimina (compuestos sintéticos)
TLR8	Ligando todavía por identificar
TLR9	ADN CpG (bacterias)
TLR10	Ligando todavía por identificar

- 5 Uno cualquiera o combinación de los TLR identificados (Lista 1) puede activarse por uno cualquiera o combinación de los componentes de ligando de TLR de una formulación de vacuna contemplada en la presente memoria. Se aprecia además que la estimulación de uno cualquiera o multiplicidad de TLR puede conseguirse usando uno cualquiera o una multiplicidad de los ligandos de TLR a concentraciones adecuadas con la ruta de administración (por ejemplo, intranasal, inyección, etc.).
- 10 Por lo tanto, según la presente invención, se entiende que una formulación de vacuna puede incluir uno cualquiera o más ligandos de TLR, incluyendo ligandos recombinantes (proteínas de fusión o fragmentos de éstas) combinados con un componente de vacuna antigénico, u opcionalmente incluyendo receptor CD 14, con o sin la adición exógena de un componente de lipopolisacárido.
- 15 En un aspecto de la presente invención, puede aislarse sólo la parte de unión de TLR de uno cualquiera o más de los ligandos de TLR, por ejemplo, por tecnologías de ADN recombinante y formularse con o sin GA como un tratamiento terapéutico y/o prevención profiláctica de la Enfermedad de Alzheimer o enfermedad o trastorno similar. Dicho polipéptido también puede prepararse por uno u otro de los procedimientos sintéticos muy conocidos para los expertos en la técnica. Sin pretender la vinculación a teoría, un tal dominio de unión aislado puede aislarse a partir de una parte de la proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* referida como Porina B que se sospecha que se une a TLR2. También pueden usarse otros de dichos dominios de unión de ligando polipeptídico de TLR de una manera similar
- 20

solo o en una u otra combinación. Dicha formulación puede usarse con o sin la necesidad de administrar una formulación de Proteosoma-GA, o puede usarse posteriormente a la administración de una formulación de Proteosoma-GA. Además, se aprecia que puede usarse una variante (por ejemplo, sustitución de aminoácidos conservativa) de dicha parte de unión de TLR de un ligando de TLR para activar un TLR siempre que la variante mantenga la capacidad de unirse (y activar) el TLR. En un aspecto adicional más de la presente invención, dicha parte de unión a TLR de un ligando de TLR puede reiterarse una o más veces usando tecnologías de ADN recombinante para preparar un polipéptido que contiene múltiples copias de dicha parte de unión, o incluso polipéptidos multivalentes (es decir, híbridos) que comprenden múltiples dominios de unión del mismo ligando de TLR o de ligandos diferentes.

En determinadas composiciones basadas en proteosoma, una o más de las partes componentes de la formulación de vacuna no necesitan formar un complejo no covalente sino que pueden mezclarse con la composición de proteosoma (por ejemplo, IVX-908, Protolina). Las composiciones basadas en proteosoma denominadas Projuvant sólo contienen pequeñas cantidades de LPS endógeno (o lipooligosacárido (LOS)) mientras que las composiciones basadas en proteosoma IVX-908/protolina contienen LPS exógeno adicional que puede ser de la misma o diferente especie de bacteria gram negativa que los componentes OMP o puede ser una mezcla de LPS derivados de más de una bacteria gram negativa.

En una realización, el contenido final en peso de liposacárido como un porcentaje de la proteína de proteosoma total puede variar de aproximadamente 1% a aproximadamente 500%, más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 20% a aproximadamente 200% o en un intervalo de aproximadamente 30% a aproximadamente 150% o en un intervalo de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%. Una realización preferida de la presente invención es la composición inmunoestimuladora en la que el componente basado en proteosoma se prepara a partir de *Neisseria meningitidis* y el contenido final de liposacárido es entre 50% a 150% de la proteína total en peso del proteosoma. El contenido final de LPS puede representar la combinación de LPS endógeno (por ejemplo, LOS) más el LPS (o LOS) añadido exógenamente. En otra realización, las composiciones basadas en proteosoma (por ejemplo, Projuvant) se preparan con un contenido de lipooligosacárido (LOS) endógeno de *Neisseria* que varía de aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 5% de OMP total. Otra realización de la presente invención proporciona proteosomas con liposacárido endógeno en un intervalo de aproximadamente 12% a aproximadamente 25% y en una realización preferida entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20% de OMP total. La presente invención también proporciona una composición que contiene liposacárido derivado de cualquier especie de bacterias Gram-negativas, que puede ser de la misma especie de bacteria Gram-negativa que es la fuente de proteosomas o de una especie de bacteria diferente.

La patente U.S. 6.476.201 se refiere a la producción y fabricación de vacunas con proteosoma-determinante anfilíco diseñadas para la administración parenteral o mucosal para inducir respuestas de anticuerpo tanto sistémicas (suero) como mucosales (incluyendo respiratoria e intestinal). Se prefiere la administración mucosal, e incluye, pero no está limitada a, administración respiratoria (por ejemplo, incluyendo intranasal, intrafaríngea e intrapulmonar), gastrointestinal (por ejemplo, incluyendo oral o rectal) o tópica (por ejemplo, conjuntival u ótica). Un determinante anfilíco es una molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que, cuando se formulan apropiadamente con proteosomas, se alinean con los proteosomas para formar un complejo que incita una respuesta inmunológica en un sujeto. Los determinantes anfilícos típicos incluyen glicolípidos, liposacáridos (incluyendo lipopolisacáridos destoxificados), lipopéptidos, dominios transmembrana, proteínas de cubierta o de toxoide o proteínas o péptidos con anclajes de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos. Estos materiales determinantes pueden obtenerse de bacterias gram negativas incluyendo *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Hemophilus*, *Brucella*, *Shigella* y *Neisseria*. Más específicamente, las vacunas de proteosomas en las que preparaciones de proteosoma de proteína de la membrana externa *meningococcal* (preparada a partir de cualquier cepa de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoea* u otra especie de *Neisseria*) están formando un complejo no covalente con lipopolisacáridos o lipooligosacáridos nativos o destoxificados de *Shigella* o *Neisseria* para formar vacunas se diseñan para proteger frente a enfermedades causadas por organismos gram negativos que contienen cualquiera de las partes componentes del complejo incluyendo *Meningococci* o *Shigellae*. Más específicamente, las vacunas de proteosoma contienen LPS que inducen respuestas de anticuerpo que reconocen antígenos somáticos O de polisacárido específico de tipo de lipopolisacáridos de *Shigella* y de esta manera confieren protección homóloga frente a la shigelosis. Los lipopolisacáridos, cuando forman complejo con proteosomas, inducen respuestas inmunes protectoras anti-*shigella*. Las vacunas de proteosoma se preparan y purifican a partir de *Shigella sonnei* o *Plesiomonas shigelloides* para inmunidad frente a enfermedad por *Shigella sonnei*, a partir de *Shigella flexneri 2a* para inmunidad frente a la enfermedad por *Shigella flexneri 2a*, y así sucesivamente, usando LPS derivados de organismos homólogos o que reaccionan antigénicamente de manera cruzada para conferir inmunidad homóloga frente a la shigelosis causada por *S. flexneri 2a* (ó *3a*, etc.), *S. boydii*, *S. sonnei*, etc. Además, la Patente U.S. 6.476.201 describe la administración de vacunas proteosoma-*Shigella* que son multivalentes en que dos vacunas de proteosoma preparadas independientemente usando antígeno LPS de *shigella* derivados de *S. flexneri 2a* (para enfermedad por *S. flexneri 2a*) y de *P. shigelloides* o *S. sonnei* (para enfermedad por *S. sonnei*) se administran conjuntamente induciendo de esta manera anticuerpos que reconocen los dos organismos y que confieren de esta manera protección frente a los dos tipos de enfermedades. Además, una vacuna proteosoma-LPS de *Shigella*, en la que los proteosomas del grupo B

tipo 2b de *meningococci* forman un complejo con LPS de *P. shigelloides* usando tecnología de diafiltración en fibras huecas para producir una vacuna administrada por las rutas respiratoria mucosal y/o gastrointestinal y para inducir anticuerpos que reconocen el antígeno somático O de LPS de *S. sonnei*, se usan de esta manera para proteger frente a shigelosis.

- 5 Una composición basada en proteosoma ejemplar pero no limitante de la presente invención es adyuvante IVX-908 (Protolina) mucosal basado en proteosoma que es una formulación no covalente de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (proteosomas) y LPS añadido exógenamente preparado a partir de *Shigella flexneri*.

Formulación y administración

10 De aquí en adelante en la presente memoria, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y que no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado.

15 En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilén glicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

20 Las rutas adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, pero la ruta de administración preferida para proteosomas es intranasalmente.

25 Las formulaciones de GA que comprenden composiciones basadas en proteosoma, o en emulsiones submicrónicas o nanoemulsiones, pueden administrarse parenteralmente, oralmente, intranasalmente o tópicamente, o, como se indica en la presente memoria, en cualquier combinación de éstas. Aunque en determinadas realizaciones es preferible administrarlas parenteralmente o mucosalmente.

30 También están incluidas en la presente memoria las rutas de administración duales o múltiples. Las rutas de administración duales pueden incluir, por ejemplo, preparaciones basadas en proteosoma preparadas y administradas intranasalmente pero separadamente de GA que puede administrarse por inyección al mismo tiempo o a un tiempo diferente de la administración intranasal de proteosomas. Las composiciones de proteosomas (Projuvant) o proteosoma:LPS (es decir, IVX-908) (en ausencia de GA) también pueden administrarse por inyección simultáneamente con GA o en un tiempo diferente. Para la inyección, los ingredientes activos de la invención pueden formularse en un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transdérmica y posiblemente transmucosal, pueden usarse en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se quiere permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

40 Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular los compuestos de la invención como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones de sólidos, suspensiones y semejantes, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla en gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados son, en particular, materiales de relleno 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 de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal de éste tal como alginato de sodio.

50 Para la administración nasal, los ingredientes activos para uso según la presente invención pueden administrarse convenientemente en la forma, por ejemplo, de una presentación de pulverización en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, hechos de

gelatina, por ejemplo, para uso en un dispensador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

5 Las preparaciones descritas en la presente memoria pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades relacionadas con la producción de y/o depósitos de amiloide (por ejemplo, A β) en cualquier lugar del cuerpo de un sujeto, pero especialmente en el cerebro. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un mamífero que ya padece la enfermedad y necesita tratamiento. Las composiciones farmacéuticas se administrarán en una cantidad suficiente para inhibir o reducir una deposición adicional de A β en placas y/o aclarar placas ya formadas y/o para estimular la eliminación de agregados de A β ya existentes y/o para estimular una reducción en A β que puede no estar contenido en placas. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz".

20 Para las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a un sujeto mamífero susceptible a una enfermedad relacionada con amiloide (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer relacionada con A β) pero que no padece dicha enfermedad. Dichos sujetos mamíferos pueden identificarse por cribado genético y análisis clínico, como se describe en la bibliografía médica (por ejemplo, Goate (1991) Nature 349: 704-706). Las composiciones farmacéuticas serán capaces de inhibir, prevenir o reducir la deposición de A β en placas en un estadio sintomáticamente temprano, preferiblemente previniendo incluso los estadios iniciales de la enfermedad relacionada con β -amiloide. La cantidad del compuesto requerida para dicho tratamiento profiláctico, referida como una dosificación profilácticamente eficaz, puede, pero necesariamente, ser generalmente la misma que la descrita anteriormente para el tratamiento terapéutico.

25 Para los propósitos de esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, los términos "paciente", "sujeto" y "receptor" se usan indistintamente. Incluyen a los seres humanos y otros mamíferos (por ejemplo, vaca y otros bovinos) que son el objeto de tratamiento profiláctico, experimental o terapéutico.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye sustancialmente inhibir, retardar o revertir la progresión de una enfermedad, sustancialmente mejorar los síntomas clínicos de una enfermedad o sustancialmente prevenir la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad, de una manera estadísticamente significativa.

35 Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser una administración única o una pluralidad de administraciones en uno o una pluralidad de sitios o medios de administración, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se produzca la cura o se consiga una disminución estadísticamente significativa del estado patológico. La cantidad de un tratamiento que se va administrar, dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico responsable, etc. Los métodos para calcular la significancia estadística son conocidos en la técnica relevante.

40 El establecimiento del intervalo de dosificación eficaz así como la cantidad óptima está dentro de la experiencia en la técnica a la vista de la información proporcionada en esta sección. Por ejemplo, las dosificaciones para mamíferos, y las dosificaciones humanas en particular, se optimizan empezando con una dosis relativamente baja de GA (por ejemplo, 1 mg/día), incrementándola progresivamente (por ejemplo, logarítmicamente) y midiendo una reacción biológica al tratamiento; por ejemplo, (i) medir la inducción de células reguladoras (CD4⁺ y/o CD8⁺) (Chen, Y. et al., Science, 255: 1237 (1994)); (ii) medir la reducción en marcadores de superficie de clase II en células T circulantes; (iii) medir el número de células que expresan TGF- β o la cantidad relativa de TGF- β detectable; (iv) evaluar el número y activación de células T de ataque inmune en la sangre (por ejemplo, por análisis de dilución limitante y capacidad de proliferar); o, (v) puntuar la gravedad de la enfermedad, según métodos de puntuación muy conocidos (por ejemplo, medir el número de ataques, inflamación articular, fuerza de agarre, rigidez, agudeza visual, capacidad para reducir o discontinuar la medicación). Una dosificación eficaz es cualquier dosis que causa al menos una atenuación estadísticamente o clínicamente significativa en uno de estos marcadores.

50 Habiendo descrito ahora generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los ejemplos siguientes que se proporcionan como ilustración.

Ejemplos

Se inmunizaron ratones transgénicos para proteína precursora de amiloide (APP) con péptido de glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG) (aminoácidos 35-55) en adyuvante completo de Freund (CFA) con administración posterior (inyección) de toxina pertussis (PT) para determinar su susceptibilidad a Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE) comparado con los miembros de su camada no transgénicos. Como controles, se inmunizaron animales con albúmina de suero bovino (BSA) o péptido β -amiloide humano ($A\beta$ aminoácidos 1-40). EAE se desarrolló en un grado idéntico en animales transgénicos APP (Mucke et al., Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996)) y los miembros de su camada no transgénicos y no se observó EAE en animales inmunizados con $A\beta$ 1-40 o con BSA. Sin embargo, cuando los cerebros se examinaron neuropatológicamente, había menos tinción para $A\beta$ en animales que desarrollaron EAE. Mediante la cuantificación de la cantidad de tinción para fibrillas de $A\beta$ en el hipocampo usando tioflavina S, se encontró una reducción en los ratones inmunizados con MOG frente a los controles ($p=0,001$) y una reducción del 73% comparado con los ratones inmunizados con $A\beta$ 1-40 ($p=0,03$) (Véase la Tabla 1, Fig. 1). Mediante la cuantificación del contenido total de $A\beta$ por ELISA, se determinó una reducción del 94% en $A\beta$ en animales inmunizados con MOG comparado con los grupos control ($p<0,001$) y una reducción del 86% cuando se comparó con ratones inmunizados con $A\beta$ 1-40 ($p=0,03$) (véase la Tabla 1, Fig 1).

Con el fin de determinar si el efecto era único para EAE inducida por MOG, se indujo EAE con péptido de proteína proteolípídica (PLP) (aminoácidos 139-151) en CFA. Se encontró una reducción del 76% en la tinción para fibrillas de $A\beta$ y una reducción del 70% en los niveles de $A\beta$ en animales con EAE inducida por PLP ($p<0,02$) (Véase la Tabla 2, Fig 3A). Con el fin de inducir EAE con PLP, se utilizaron ratones Tg2576 como se describe por Hsiao, K. et al., Science 274 (5284): 99-102 (1996), que tienen un fondo B6/SJL. Se encontraron resultados similares con ratones Tg2576 y ratones inmunizados con J20 descrito por Mucke et al., Ann NY Acad Sci (777) 82-88 (1996) para inducir MOG-EAE (Véase la Tabla 1). Estos resultados demuestran que la observación no estaba relacionada con el antígeno usado para EAE inducida o el modelo animal de AD estudiado, ni el fondo genético del animal, ni el sexo (50% machos/hembras). No se observaron cambios en los animales inmunizados con BSA en CFA. Debe indicarse que no hubo diferencia en la carga total de $A\beta$ (amiloide) en ratones J20 mayores de 13 meses de edad cuando se compara con ratones Tg2576 mayores de 16 meses de edad.

En estudios previos de estrategias inmunes para el tratamiento del modelo de ratón de AD en el que los animales se inmunizaron con péptido $A\beta$ formulado en CFA, se ha mostrado que los anticuerpos anti-agregación β amiloide tienen un papel tanto *in vitro* por Solomon, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4109-12 (1997) como *in vivo* por Weiner, H.L. et al., Ann Neurol 48, 567-79 (2000) y Schenk, D. et al., Nature 400, 173-7 (1999), en la reducción de la carga amiloide y su actividad se ha ligado a un epítipo específico en la región N-terminal de $A\beta$ (Frenkel, D. et al., Neuroimmunol 88, 85-90 (1998) y Frenkel, D. et al., Proc Natl Acad Sci USA 97, 11455-9 (2000). Se midieron los niveles de anticuerpo frente a $A\beta$ en animales inmunizados con MOG o PLP para determinar si había reactividad cruzada con $A\beta$ y titulaciones de anticuerpo $A\beta$ comparado con los de animales inmunizados con $A\beta$. Como se muestra en las Tablas 1 y 2, no se detectaron anticuerpos anti- $A\beta$ en los animales inmunizados con MOG o PLP. Para establecer definitivamente que los anticuerpos no estaban cumpliendo ninguna función, se inmunizaron ratones J20 de 16 meses de edad criados para ratones μ MT deficientes en células B con MOG 35-55 en CFA seguido de la administración de toxina Pertussis. Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 1, los ratones μ MT deficientes en células B APP+, tenían una reducción del 90% en amiloide comparado con el control según se mide por tinción con ThS ($p<0,001$) o por ELISA para amiloide cerebral total ($p<0,001$). Estos resultados indican que la reducción de $A\beta$ después de la inmunización con MOG ocurrió por un mecanismo independiente de anticuerpo.

Los estudios previos han sugerido que las microglía activadas pueden jugar un papel importante en el aclaramiento de $A\beta$ *in vivo* (Schenk, D. et al., Nature 400, 173-7 (1999), Rogers, J. et al., Glia 40, 260-9 (2002), Mitrassinovic, O.M. et al., Neurobiol Aging 24, 807-15 (2003), Webster, S.D. et al., Exp Neurol 161, 127-38 (2000), Bacskai, B.J. et al., J Neurosci 22, 7873-8 (2002), Nicoll, J.A. et al., Nat Med 9, 448-52 (2003), Akiyama, H. y McGeer, P.L., Nat Med 10, 117-8; réplica del autor 118-9 (2004)). Las microglía activadas (o células semejantes a microglía) pueden distinguirse adicionalmente tomando como base que sean derivadas de cerebro o que se originen fuera del cerebro, es decir, periféricamente, tal como neutrófilos y macrófagos. Los procedimientos para distinguir microglía derivadas de cerebro de neutrófilos y macrófagos periféricos son conocidos en la técnica. Para investigar el papel potencial de la activación de microglía en el aclaramiento de $A\beta$, los cerebros de ratones tg APP inmunizados (por inyección en la almohadilla de la pata o intranasalmente) con MOG/CFA se tiñeron con CD11b, un marcador de microglía activada. Como se muestra en las Figuras 3A y 4 y en la Tabla 4 la inmunotinción del hipocampo de ratones tg APP inmunizados con MOG reveló números incrementados de microglía activadas ($349 \pm 34,3$ células/región de hipocampo) que se co-localizaron con placas amiloides (Tabla 4). Sólo se observó una tinción mínima en los animales control inmunizados con BSA/CFA (76 ± 17 células/región de hipocampo) (Tabla 4). Se observaron niveles intermedios de activación de microglía en animales inmunizados con $A\beta$ /CFA (106 ± 27 células/región de hipocampo). Además, también se observaron niveles incrementados de activación de microglía en ratones μ MT deficientes en células B ($p<0,001$) y en animales inmunizados con PLP ($p<0,001$) (Fig. 3A, Tabla 4).

Según la primera serie de experimentos descrita justo anteriormente, la administración de MOG/PLP más CFA (seguido de la administración de toxina pertussis) se asoció con una reducción de A β pero fue coincidente con EAE no deseada. En estos experimentos, la toxina pertussis se usa para abrir la barrera hemato-encefálica para la administración de compuestos formulados en CFA en el cerebro. Por lo tanto, con el fin de evaluar si la reducción en A β estaba relacionada directamente con la inducción de EAE y como MOG, PLP y GA se han estudiado respecto a EAE relacionada con MS, se evaluaron los efectos de la inmunización de ratones APP con acetato de glatiramer (GA), que es un copolímero de aminoácidos al azar de alanina, lisina, ácido glutámico y tirosina que es eficaz en la supresión de EAE y es un tratamiento aprobado y ampliamente usado para formas recidivantes de MS (Teitelbaum, D. et al., J. Neural. Transm. Suppl. 49, 85-91 (1997)).

5 Aunque como se realiza inicialmente, la administración de determinadas mezclas antígeno/adyuvante proporcionadas en la presente memoria está seguida de una administración (inyección) de toxina pertussis; se aprecia completamente que determinadas composiciones adicionales descritas en la presente memoria pueden administrarse sin la administración de toxina pertussis. Es más, las composiciones basadas en proteosoma tal como IVX-908 con o sin GA se administran sin la administración de toxina pertussis. De hecho, la toxina pertussis no se usó en ningún momento para la administración nasal de ninguna composición basada en proteosoma descrita en la presente memoria.

10 Los ratones se inmunizaron así (por inyección en la almohadilla de la pata) con 100 μ g GA en CFA e inmediatamente después de esto y a las 48 horas recibieron una inyección i.p. de 150 ng de toxina pertussis. Cincuenta días después de la inmunización, los ratones se sacrificaron. La inmunización con acetato de glatiramer dio lugar a una reducción del 92% en la fibrilla amiloide en la región del hipocampo frente a controles no tratados ($p < 0,01$) y una reducción del 70% de la carga amiloide total ($p < 0,01$) (Véase la Tabla 1, Fig 1). No hubo EAE clínica en los animales inmunizados con GA/CFA más toxina pertussis.

15 Como CFA no puede administrarse a sujetos humanos, se investigó el efecto de la vacunación nasal con acetato de glatiramer en un modelo de ratón de AD con adyuvantes distintos de CFA; los animales se trataron con acetato de glatiramer administrado nasalmente solo o junto con un adyuvante mucosal. Se preparó un adyuvante mucosal basado en proteosoma IVX-908 (Protolina) comprendido por una formulación no covalente de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (proteosomas) y LPS de *Shigella flexneri*, que se ha usado tanto en seres humanos (Fries, L.F., et al., Infect Immun 69: 4545-53 (2001)) como ratones (Plante, M. et al., Vaccine 20, 218-25 (2001)). Los ratones recibieron múltiples tratamientos del adyuvante de proteosoma la primera semana y después se reforzaron semanalmente durante las siguientes cinco semanas después de lo cual se realizó un análisis neuropatológico. Como controles, se trataron animales nasalmente con IVX-908+BSA, IVX-908 solo o GA solo. Inesperadamente, la administración nasal de GA formulado con IVX-908 resultó en una reducción del 84% de amiloide fibrilar positivo para tioflavina en el hipocampo ($p < 0,001$ frente al control) y reducción del 70% comparado con IVX-908 solo ($p < 0,01$) (Tabla 3). En términos de niveles totales de A β en el cerebro, se observó una reducción del 73% después de la administración nasal de acetato de glatiramer en IVX-908 ($p < 0,001$ frente al control) y una reducción del 45% usando IVX-908 solo ($p < 0,002$) (Tabla 3, Figura 2). Además, se detectaron microglía activadas alrededor de las placas amiloides en los animales tratados. La administración nasal de GA solo no afectó las fibrillas A β aunque hubo una reducción ligera de los niveles totales de A β en el cerebro ($p = 0,044$ frente al control). La administración nasal de BSA+IVX-908 o IVX-908 solo resultó en una reducción del 50% de la carga amiloide total ($p = 0,02$ frente al control) aunque no hubo efecto en la tinción de A β fibrilar. Al contrario que la inyección con CFA, la administración nasal de IVX-908 solo o como formulaciones con GA o BSA no indujo EAE en ningún animal en estos experimentos.

20 No se encontró activación de microglía en ratones no transgénicos APP en ninguno de los protocolos de inmunización: parenteralmente con CFA/PT más GA, nasalmente con IVX-908 más GA (Véase la Fig 3B) o nasalmente con IVX-908 solo. Estos resultados sugieren que la activación de microglía después de la administración (inmunización) con GA formulado con IVX-908 o IVX-908 solo puede ser dependiente de la presencia de deposición amiloide que puede servir para cebar la microglía endógena para activación.

25 Aunque no existe reactividad cruzada conocida entre GA y A β y no observamos anticuerpos anti-A β en los animales tratados con GA o EAE, es posible que la inmunización con GA+IVX-908 podría haber resultado en el cebado de células T reactivas para A β . Medimos las respuestas proliferativas de células T y la producción de citoquinas (IL-2, IFN- γ , IL-6) después de 7 semanas de tratamiento semanal con GA+IVX-908 (momento en el cual el experimento se terminó) estimulando células T esplénicas con A β (1-40). No encontramos cebado de células T reactivas para A β según se mide por proliferación: Las cuentas por minuto para A β para no tratados = 3.315 ± 1.682 cpm; para GA+IVX-908 = 4.516 ± 1.412 cpm (las cuentas de fondo fueron 100-300). El índice de estimulación (GA+IVX-908/no tratados) = 1,37; un índice de estimulación mínimo de más de 2,5 se considera positivo. Además, no encontramos secreción de IL-2, IFN- γ , IL-6 por encima del fondo en estos cultivos. Esta ausencia de respuesta de células T a A β es consistente con la ausencia de detección de anticuerpos anti-A β que encontramos ya que la ayuda de las células T se requiere para la producción de anticuerpos. De manera similar, no encontramos cebado para A β en los animales con EAE.

Para examinar el efecto del tratamiento con GA+IVX-908 en otros sitios del cerebro además del hipocampo, investigamos el bulbo olfativo y el cerebelo. Teñimos el bulbo olfativo para A β , CD11b y fibrinógeno y obtuvimos resultados similares a los observados en el hipocampo (Figura 8). Después de la administración nasal de GA+IVX-908, encontramos un número incrementado de microglía activadas comparado con el control. La activación también ocurrió en animales con EAE, pero estaba asociada con extravasación en la barrera hemato encefálica (BBB) según se mide por tinción para fibrinógeno.

Cuando examinamos el cerebelo, no encontramos una activación incrementada de tinción de microglía en los animales tratados con GA+IVX-908 lo que sugiere que la activación incrementada está restringida a áreas con deposición de A β . Además, no se observó activación de microglía en ningún lugar de los cerebros de los miembros de su camada no transgénicos después de GA+IVX-908 lo que demuestra adicionalmente que la activación incrementada está restringida a áreas con deposición de A β (véase la Figura 3b).

Para entender mejor el mecanismo del aclaramiento que observamos, teñimos para expresión de CD68, que está altamente expresado en macrófagos activados de la periferia a diferencia de microglía cerebrales. Como se muestra en la Figura 9, obtuvimos una tinción mayor para CD68 en animales con EAE comparado con los tratados con GA+IVX-908. Este patrón de tinción muestra la migración de macrófagos desde el plexo coroideo al parénquima cerebral circundante incluyendo el cerebelo y la corteza. En el tratamiento con GA+IVX-908, existe una expresión incrementada de CD68 principalmente en el espacio del plexo coroideo. Esto sugiere que las células CD11b+ responsables del aclaramiento de A β en animales con EAE migran al SNC desde la periferia y están asociadas con toxicidad neuronal mientras las células CD11b+ en animales tratados con GA+IVX-908 son principalmente células microgliales endógenas y están asociadas con el aclaramiento de A β sin evidencia de toxicidad directa. Como un apoyo adicional de esta interpretación, encontramos que existe una expresión incrementada de células CD68+ en el cerebelo de animales con EAE pero no en animales tratados con GA+IVX-908 o no tratados (no mostrado). Además, las células activadas CD11b+ después del tratamiento con GA+IVX-908 sólo se encontraron en regiones en las que había acumulación de amiloide.

Como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 4, la reducción de fibrillas de A β en el hipocampo estaba fuertemente correlacionada con números incrementados tanto de células microgliales activadas, como se muestra por tinción con CD11b ($r= 0,7$ CD11b frente a fibrillas de A β) como IFN- γ frente a fibrillas de A β). Hubo una fuerte correlación entre células CD11b y células IFN- γ observamos números incrementados de microglía inmunoreactivas para el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR) en animales tratados comparado con el control ($p<0,02$) (Tabla 4). Observamos una reducción en TGF- β y el porcentaje de fibrillas de A β en la región del hipocampo ($r= 0,91$). No se observaron cambios significativos en células inmunoreactivas para IL-10 entre los animales control y tratados con GA+IVX-908 aunque los animales con EAE tenían menos IL-10 que los controles.

Los experimentos siguientes se realizaron con el fin de evaluar si el tratamiento con GA más IVX-908 induce toxicidad en células neuronales u otros efectos negativos potenciales: i) determinar el nivel de GFAP, una medida de astrocitosis (toxicidad) consistente con daño en células neuronales; ii) medir el nivel de expresión de SMI32, un marcador para la fosforilación de neurofilamentos y que se sabe que se incrementa con el daño en células neuronales; iii) realizar un ensayo TUNEL como un medio de medir la muerte celular apoptótica; iv) y determinar el nivel de iNOS, una enzima que se ha mostrado que está regulada al alza en condiciones de estrés de células neuronales.

Los resultados del ensayo GFAP muestran que ocurrió astrocitosis en los animales control no tratados (área de astrocitos activados en el hipocampo según se mide por células GFAP+) (Figura 5). La astrocitosis se redujo en GA+IVX-908 proporcionado nasalmente (3,1%; $p= 0,039$ frente al control). Al contrario, no hubo reducción en astrocitosis en animales con EAE. Estos resultados indican que el aclaramiento de A β como consecuencia del tratamiento con GA+IVX-908 es menos tóxico (asociado con menos astrocitosis) que el observado en animales con EAE a pesar de que EAE también está asociada con una reducción en los depósitos de A β .

Los resultados de los experimentos que miden SMI32 (Figura 6) muestran que las células positivas para SMI32 que tienen una morfología ovoide anormal están asociadas con placas neuríticas en animales control no tratados. Los animales con EAE muestran un incremento en el número de células positivas para SMI32 con una morfología ovoide anormal a lo largo del cerebro (en asociación con inflamación) incluyendo el cerebelo (aunque no se observaron placas neuríticas). Por el contrario, los animales tratados con GA+IVX-908 muestran una reducción en el número de células positivas para SMI32 (con una morfología ovoide anormal) asociado con placas neuríticas. Estos experimentos sugieren que el tratamiento con GA+IVX-908 no está asociado con toxicidad según se mide por SMI32.

Los resultados de los experimentos que miden muerte celular apoptótica usando un ensayo TUNEL estándar (Figura 6) no muestran tinción TUNEL en los animales control y una tinción TUNEL incrementada en la corteza de los animales con EAE. No se observó tinción TUNEL en los animales tratados con GA+IVX-908. Además los ensayos que miden iNOS indican que iNOS está regulado al alza en los ratones con EAE pero no en los animales tratados con GA+IVX-908. No se detectó daño en las estructuras vasculares en los animales tratados con GA+IVX-908 ni en los animales con EAE.

Colectivamente, estos datos indican que aunque no hubo aclaramiento de A β en los animales con EAE así como en los animales tratados con GA+IVX-908, el último no estaba asociado con toxicidad en células neuronales (Tabla 4 y Figura 6).

5 Sin embargo, aunque la activación de microglía después de la inmunización con IVX-908 solo parece requerir la presencia de depósitos de A β , dicha inmunización no resultó en la eliminación de dichos depósitos de A β (por microglía activadas) sino que hubo una reducción preferente en la cantidad de carga amiloide total. Dichos resultados pueden sugerir la posibilidad de que hay dos poblaciones de microglía que pueden activarse, o, como una posibilidad alternativa, que la microglía puede activarse en diferentes grados, parcialmente o totalmente, en el que la microglía totalmente activada es capaz de eliminar placas de A β pre-existentes, y la microglía parcialmente activada participa en el secuestro
10 de péptido A β soluble. En consideración con la noción de que A β soluble se agrega en placas de A β insolubles, dicho tratamiento con IVX-908 solo puede retardar o prevenir la formación continuada de placas de A β , lo que es beneficioso para un sujeto que padece una enfermedad.

La Tabla 4 y la Figura 3B, demuestran que la reducción de fibrillas de A β en el hipocampo se correlacionaba con un número incrementado tanto de células microgliales activadas (como se muestra por tinción inmunohistoquímica CD11b+) como células secretoras de IFN- γ . Además, hubo números incrementados de microglía positiva para el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR). Se ha publicado que la expresión incrementada de M-CSFR en microglía de ratón y ser humano acelera la fagocitosis de amiloide agregado tanto a través de receptores secuestradores de macrófagos como por el incremento de la expresión microglial de receptores FcR gamma (Mitrasinovic, O.M. y Murphy, G.M., Jr., Neurobiol Aging 24, 807-15 (2003)). Sin embargo, el aclaramiento de amiloide en los ratones μ MT deficientes en células B también tuvo una tinción incrementada para M-CSFR, por lo tanto los efectos observados son a través de un mecanismo no mediado por Fc (Bacsikai, B.J. et al., J Neurosci 22, 7873-8 (2002)). En asociación con los incrementos en IFN- γ , se observó una reducción en la expresión de TGF- β , lo que sugiere que TGF- β modula de alguna forma la capacidad de A β soluble de agregarse en placas y se cree además que TGF- β está asociado con deposición incrementada de amiloide (Wyss-Coray, T. et al., Nature 389, 603-6 (1997)). La disminución de TGF- β también puede facilitar el aclaramiento amiloide. No se observaron cambios significativos en la expresión de IL-10. La activación microglial podría estar asociada con números incrementados de células T, que pueden haber jugado un papel en la estimulación de la activación microglial ya que había una correlación entre los números de células T y los números de células secretoras de IFN- γ .

30 Con el fin de confirmar que las células CD11b+ detectadas en estos experimentos eran macrófagos o microglía activadas y no neutrófilos, se incubaron muestras con un anticuerpo monoclonal que reconoce F4/80, una estructura de la superficie celular que puede detectarse en la superficie de macrófagos y microglía activados pero no en neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares). La expresión de F4/80 se incrementa con la maduración de macrófagos y microglía. Los resultados de estos experimentos indican que todas las células CD11b+ detectadas en estos experimentos también se tiñeron positivamente para F4/80 (no mostrado), indicando de esta manera que estas células CD11b+ eran macrófagos o
35 microglía activados, no neutrófilos. Además, las células CD11b+ que se co-localizan con placas A β por tinción con H y E (Figura 4) tienen una morfología mononuclear y no la morfología polimorfonuclear característica de los neutrófilos.

En otra serie más de experimentos, se mostró que la activación de células microglía después de la administración nasal de GA+IVX-908 se correlacionaba con un incremento en el número de células T, según se determina por tinción CD3. Estos resultados sugieren un posible papel para las células T en la estimulación de la activación de células microglía, ya que había una correlación entre el número de células T y el número de células secretoras de IFN- γ detectadas $r= 0,88$ (Tabla 4). Además, se ha publicado que TGF- β puede incrementar o reducir la formación de fibrillas de A β en el ratón tg APP Wyss-Coray, T. et al Nature 389, 603-6 (1997); Wyss-Coray et al. Nat. Med. 7: 612-8 (2001). En los experimentos reportados aquí, se observó una reducción en la expresión de TGF- β en ratones tratados con MOG ($p<0,001$) y GA+IVX-908 ($p<0,001$) comparado con el control (Tabla 4); hubo una fuerte correlación en la reducción TGF- β y el porcentaje de fibrillas de A β en la región del hipocampo ($r= 0,95$). No se observaron cambios significativos en las células inmunoreactivas para IL-10 (no mostrado).

Se encontró una disminución en el nivel de A β cerebral total cuando se proporcionó nasalmente IVX-908 solo (Tabla 3) ($p= 0,02$ frente a no tratados), pero a diferencia de IVX-908 formulado con GA, no hubo efecto de IVX-908 solo en el aclaramiento de fibrillas de A β positivas para tioflavina. IVX-908 es un adyuvante basado en proteosoma compuesto por proteínas de la membrana externa (OMP) de *Neisseria meningitides* y lipopolisacárido añadido exógenamente (LPS). Se sabe que OMP2 de *Neisseria meningitides* (porina B) y LPS/LOS interaccionan con los TLR expuestos en la superficie de determinados tipos celulares relacionados con el sistema inmune innato y/o adoptivo. Es posible que dichas interacciones se requieran, al menos en parte, para la actividad observada de IVX-908 y/o GA formulado con IVX-908, como se muestra en la presente memoria. El efecto observado con IVX-908 puede estar relacionado con publicaciones de que la inyección directa de LPS en el hipocampo puede causar una reducción en la carga de A β no fibrilar pero no de
55

depósitos de A β fibrilar (DiCarlo, G. et al., *Neurobiol Aging* 22, 1007-12 (2001)). Sin embargo, debe indicarse que la ruta de administración en estos experimentos, inyección directa en el cerebro, es dramáticamente distinta de la ruta nasal de administración para la administración de las formulaciones basadas en proteosoma descritas en la presente memoria. Al contrario, otras publicaciones indican que aunque LPS (inflamación) proporcionado intraperitonealmente puede estimular la activación de células microgliales, también se observó un incremento en el amiloide total, la neuroinflamación inducida por LPS incrementa la acumulación intracelular de proteína precursora de amiloide y péptido A β (Sheng et al., *Neurobiology of Disease* 14: 133-145 (2003) y referencias citadas en ésta). Además, se aprecia que se espera que la inyección directa de LPS sea tóxica.

En los experimentos discutidos anteriormente, se mostró que las células CD11b+ eran microglía o macrófagos activados pero no neutrófilos por la ausencia de señal F4/80. Sin embargo, con el fin de determinar si estas células CD11b+ podrían distinguirse adicionalmente como una microglía activada a diferencia de un macrófago activado, se evaluaron muestras para la presencia de CD68, un marcador celular que está altamente expresado en macrófagos activados de la periferia pero que no está altamente expresado en la superficie de células microglía que se originan en el cerebro. Como se muestra en las figuras 8 y 9, obtuvimos una tinción mayor para CD68 (los macrófagos son CD11b+ y CD68+) en animales con EAE comparado con muestras derivadas de animales tratados con GA+IVX-908; lo que indica que estas células CD11b+ CD68+ son macrófagos que han migrado al parénquima cerebral, incluyendo el cerebelo y la corteza, desde la periferia (espacio subaracnoideo). Al contrario, después del tratamiento con GA+IVX-908, hay un incremento en los macrófagos que expresan CD68, pero estas células permanecen localizadas principalmente en el espacio subaracnoideo. Los resultados de estos experimentos sugieren que las células CD11b+ implicadas en el aclaramiento de A β en animales con EAE migran al SNC desde la periferia y están asociadas con toxicidad neuronal; mientras, las células CD11b+ detectadas después del tratamiento con GA+IVX-908 son principalmente células microglía endógenas y están asociadas con el aclaramiento de A β sin evidencia de toxicidad directa. Para apoyar adicionalmente esta interpretación, encontramos que hay una expresión incrementada de células CD68+ en el cerebelo de los animales con EAE pero no en los animales tratados con GA+IVX-908 o no tratados (datos no mostrados). Además, las células CD11b+ activadas después del tratamiento con GA+IVX-908 sólo se encontraron en regiones en las que había una acumulación de amiloide.

También encontramos niveles incrementados de A β en el suero de los animales a los que se administró GA+IVX-908 comparado con los animales no tratados, lo que sugiere que GA+IVX-908 da lugar al aclaramiento de A β de las regiones del cerebro y que este A β puede encontrarse entonces en la periferia. Sin embargo, dicha redistribución de A β no se observó en animales que tienen EAE, lo que, como se ha descrito anteriormente, puede estar relacionado con la fuente de células CD11b+ activadas. Además, el número de macrófagos activados CD11b+ CD68+ que recubren los capilares cerebrales y el plexo coroideo estaba incrementado en los animales a los que se administró GA+IVX-908 comparado con los animales no tratados (Figura 9). Estos descubrimientos son consistentes con los niveles elevados de A β detectados en las muestras de suero obtenidas de animales tratados con GA+IVX-908 y una disminución concomitante en angiopatía amiloide en los animales tratados con GA+IVX-908 en asociación con células CD11b+ (Figura 8).

Inesperadamente, parece que la ruta común final para el aclaramiento de amiloide (por ejemplo, placa A β) puede ser a través de microglía activadas. En EAE, las células T reactivas de mielina de tipo IFN- γ Th1 están activadas aparentemente en la periferia por inmunización con MOG o PLP más CFA y estas células T migran al cerebro en el que liberan IFN- γ (una citoquina Th1) y activan microglía. Como consecuencia, se causa la encefalomiелitis y la parálisis de los animales por el daño a la mielina y axones subyacentes. La inmunización con BSA/CFA en la periferia no da lugar a aclaramiento de A β , ya que las células de tipo Th1 específicas de BSA no se acumulan en el cerebro. La inmunización periférica con acetato de glatiramer en CFA induce células T específicas de GA que se acumulan en el cerebro debido a la reactividad cruzada de GA con MBP. Las células son capaces de secretar IFN- γ y así activar microglía, pero son incapaces de causar EAE debido a la afinidad alterada para MBP y la secreción concomitante de citoquinas anti-inflamatorias.

Hemos demostrado el aclaramiento de A β en asociación con activación de microglía. Debe indicarse que la activación microglial puede tener efectos tanto positivos como negativos (Monsonogo, A., y Weiner, H.L., *Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease*, *Science* 302: 834-838 (2003)). Las microglía representan un mecanismo natural por el cual los agregados proteicos y restos pueden eliminarse del cerebro y hay publicaciones que muestran que la activación microglial después de inmunización con A β o ictus puede dar lugar a aclaramiento de A β (véase Nicoll, J.A., et al., *Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report*, *Nat Med.*, 9: 448-452 (2003); Akiyama, H., y McGeer, P.L., *Specificity of mechanisms for plaque removal after A beta immunotherapy for Alzheimer Disease*, *Nat Med.*, 10: 117-118; réplica del autor 118-119 (2004); y Wyss-Coray, T., et al., *Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice*, *Proc Natl Acad Sci.*, 99: 10837-10842 (2002)). En estudios con animales, Wyss-Coray y colegas demostraron que hay una neurodegeneración prominente y formación de placas incrementada en el modelo de ratón de AD con complemento inhibido, en el que las microglía estaban significativamente menos activadas que en los ratones AD de tipo salvaje a la

misma edad. Esto apoya el concepto de que microglía activadas tienen un papel beneficioso en la disminución de la carga amiloide sin neurotoxicidad importante en el modelo de ratón de AD.

La administración nasal de IVX-908 solo da lugar a la reducción de amiloide ya que es capaz de activar microglía, aunque no tan eficazmente como las composiciones de IVX-908 formuladas con GA que, además, puede activar células T. No se observó activación de microglía con GA proporcionado periféricamente con CFA o intranasalmente con IVX-908 en animales no transgénicos. Se ha publicado que la deposición de Aβ da lugar a una ligera activación de microglía que rodea la placa Aβ y parece que esta activación se requiere con el fin de que las microglía se activen adicionalmente por IVX-908 más GA. Es posible que la activación ligera de microglía esté asociada con la expresión de IFN-γ o receptores semejantes a toll que ceban a las microglía para activación adicional (Sasaki, A. et al., *Virchows Arch.*, 441(4): 358-67 (2002)).

Estos descubrimientos tienen relevancia para los mecanismos potenciales para la eliminación de placas observados en los seres humanos después de inmunización con Aβ1-42 en un adyuvante de tipo Th1 (QS21), Nicoll, J.A. et al., *Nat Med* 9, 448-52 (2003) publicaron descubrimientos en autopsia de un paciente con AD vacunado con Aβ1-42 proporcionado parenteralmente con adyuvante QS21 que resultó en meningoencefalitis muy extendida, infiltración del cerebro por macrófagos y una reducción de depósitos amiloides en la neocorteza. Akiyama y McGeer publicaron una reducción similar de placas seniles en un área cortical afectada por isquemia incompleta en un caso de AD y sugieren que sus descubrimientos y los publicados por Nicoll, et al pueden estar relacionados con fagocitosis de amiloide por microglía altamente reactivas de una manera dependiente de anticuerpo. Además, mediante el uso de tinción TUNEL (un marcador para células apoptóticas) o inmunotinción con NeuN (un marcador para viabilidad de neuronas) no se observó evidencia de toxicidad en la inmunización con GA más IVX-908 o IVX-908 solo comparado con los ratones no tratados.

En la presente memoria se proporciona una nueva estrategia terapéutica inmune para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que es independiente de anticuerpo y está mediada por microglía activadas. Combinando un fármaco usado para tratar esclerosis múltiple con un adyuvante nasal (IVX-908); las microglía parecen activarse para aclarar las placas de fibrillas de Aβ y reducir la carga amiloide total usando dos composiciones (GA y adyuvantes basados en proteosoma) que se han usado previamente en los seres humanos para otras indicaciones sin toxicidad. Dado que los estudios en animales han demostrado que la reducción de la placa de Aβ está asociada con mejora cognitiva, la vacunación nasal con IVX-908 formulado con GA es una terapia eficaz para pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Tabla 1. Efecto de la inmunización subcutánea en Aβ total y fibrilar en los cerebros de ratones transgénicos J20 APP.

	Ratones por grupo	Puntuación EAE	Anticuerpo Anti-Aβ*	Aβ cerebral total (ng/ml)	% Área de placas de Aβ positivas para tioflavina (hipocampo)
Control**	8	0	0	125,6 ± 15,9	2,6 ± 0,4
Aβ	8	0	0,75	60,8 ± 16 ^a	0,83 ± 0,3 ^a
MOG	10	2,5 ± 0,8	0	8,4 ± 2,1 ^b	0,22 ± 0,1 ^b
MOG deficientes en B	6	2,7 ± 0,4	0	11,4 ± 2,7 ^b	0,27 ± 0,04 ^b
GA	5	0	0	39,1 ± 12,8 ^c	0,26 ± 0,1 ^d

* Los resultados se presentan como nivel de DO a titulación de 1:500 IgG.
 ** El control combina animales no tratados (n= 5) y tratados con BSA/CFA (n= 3) ya que no hubo diferencia entre estos grupos. Para Aβ cerebral total: no tratados= 126,7 ± 19,5; BSA/CFA 123,7 ± 33,2. Para % de área de placas de Aβ positivas para tioflavina: no tratados: 2,8 ± 0,5; BSA/CFA= 2,2 ± 0,9.
^ap<0,05 frente a control.
^bp<0,001 frente a control; p<0,05 frente a Aβ.
^cp<0,01 frente a control.
^dp<0,01 frente a control; p= 0,05 frente a Aβ.

30

Tabla 2. Efecto de la inmunización con PLP en A β total y fibrilar en los cerebros de ratones transgénicos Tg2576 APP.

	Ratones por grupo	Puntuación EAE	Anticuerpo Anti-A β *	A β cerebral total (ng/ml)	% Área de placas de A β positivas para tioflavina (hipocampo)
Control	5	0	0	133,1 \pm 32,7	2,67 \pm 0,4
PLP	5	1,7 \pm 0,7	0	47,7 \pm 18,4 ^a	0,68 \pm 0,2 ^b

* Los resultados se presentan como nivel de DO 450 a titulación de 1:500 IgG.
^ap<0,02 frente a control (ratones no tratados).
^bp<0,002 frente a control.

Tabla 3. Efecto de la inmunización nasal en A β total y fibrilar en los cerebros de ratones transgénicos J20 APP.

	Ratones por grupo	Puntuación EAE	Anticuerpo Anti-A β *	A β cerebral total (ng/ml)	% Área de placas de A β positivas para tioflavina S (hipocampo)
Control*	8	0	0	125,6 \pm 15,9	2,6 \pm 0,4
GA	4	0	0	97,6 \pm 15,5	2,06 \pm 0,8
IVX-908	7	0	0	63,5 \pm 7,7 ^a	1,5 \pm 0,2
GA+IVX-908	8	0	0	38,7 \pm 6,8 ^b	0,48 \pm 0,09 ^c

Nota al pie
* Los resultados se presentan como nivel de DO 450 a titulación de 1:50 IgG.
^ap<0,02 frente a control, p<0,02 frente a GA.
^bp<0,001 frente a control y GA, p<0,04 frente a IVX-908.
^cp<0,001 frente a control, p<0,002 frente a GA, p<0,002 frente a IVX-908.

Tabla 4. Inmunohistoquímica de hipocampo en animales inmunizados*

	Número de células por región de hipocampo*				
	CD11b ^a	CD3 ^b	M-CSFR ^c	IFN- γ ^d	TGF- β ^e
Control	76 \pm 17	5 \pm 3	11 \pm 4	7 \pm 3	73 \pm 12
Subcutáneo (CFA/P.T.)					
Aβ	106 \pm 27	10 \pm 2	34 \pm 11	9 \pm 2	41 \pm 5
MOG	349 \pm 34,3 ^{iv}	142 \pm 19 ^{iv}	79 \pm 5 ⁱ	109 \pm 7 ^{iv}	20 \pm 5 ⁱⁱⁱ
MOG deficiente en B	462 \pm 23 ^{iv}	195 \pm 12 ^{iv}	77 \pm 6 ⁱ	119 \pm 18 ^{iv}	22 \pm 8 ⁱⁱ
GA	227 \pm 61 ⁱ	61 \pm 12 ⁱ	57 \pm 8	85 \pm 11 ^{iv}	31 \pm 7
NASAL					
GA	136 \pm 12	35 \pm 19	30 \pm 9	53 \pm 3 ⁱ	77 \pm 10
IVX-908	406 \pm 16 ^{iv}	55 \pm 9 ⁱ	81 \pm 16 ⁱ	92 \pm 4 ^{iv}	40 \pm 11
GA+	451 \pm 48 ^{iv}	67 \pm 9 ⁱⁱ	119 \pm 30 ^{iv}	81 \pm 10 ⁱⁱⁱ	14 \pm 2 ^{iv}
IVX-908^g					
Nota al pie Tabla 4:					
* Los datos representan la cuantificación de tres secciones para cada tratamiento y seis secciones para el control (3 no tratados + 3 tratados con BSA/CFA como en la tabla 1).					
^a r= -0,7 CD11b frente a % Área de fibrillas A β .					
^b r= -0,65 CD3 frente a % Área de fibrillas A β ; r= 0,74 CD3 frente a CD11b.					
^c r= -0,7 M-CSFR frente a % Área de fibrillas A β ; r= 0,92 M-CSFR frente a CD11b.					
^d r= -0,8 IFN- γ frente a % Área de fibrillas A β ; r= 0,9 IFN- γ frente a CD11b; r= 0,85 IFN- γ frente a CD3.					
^e r= 0,91 TGF- β frente a % Área de fibrillas A β ; r= -0,77 TGF- β frente a CD11b; r= -0,6 TGF- β frente a CD3.					
^f r= 0,67 IL-10 frente a % Área de fibrillas A β ; r= -0,4 IL-10 frente a CD11b.					
^g p= 0,0007 CD11b frente a GA; p<0,05 IFN- γ frente a GA; p= 0,0011 TGF- β frente a GA.					
ⁱ p<0,05 frente al control.					
ⁱⁱ p<0,02 frente al control.					
ⁱⁱⁱ p<0,001 frente al control.					
^{iv} p<0,001 frente al control.					

Materiales y métodos

Ratones. Ratones transgénicos APP (B6XD2)F1 (edad media 14 meses) o (B6XSJL)F1 APP+ (WT o μ MT) (media 16 meses) se establecieron y usaron en una instalación sin patógenos en el Brigham and Women's Hospital según todas las directrices aplicables.

Materiales. IVX-908 (Protolina) es una formulación no covalente de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (proteosomas) y LPS de *Shigella flexneri* que se ha ensayado con seguridad en seres humanos y se obtuvo de ID Biomedical, Montreal, Canadá. Acetato de glatiramer (Copaxone®) es un copolímero de aminoácidos al azar de alanina, lisina, ácido glutámico y tirosina que es un tratamiento aprobado y usado ampliamente para formas recidivantes de MS y se obtuvo de la farmacia del Brigham and Women's Hospital. MOG (35-55) y PLP (139-151) se sintetizaron en el Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital.

Inducción y evaluación clínica de EAE en ratones APP+. Se inmunizaron (B6D2)F1 o (B6XSJL)F1 APP+ (WT o deficientes en células B μ MT) y los miembros de su camada no tg en las almohadillas de las patas posteriores con 100

5 μg MOG(35-55), PLP 139-151 ó 100 μg de péptido β -amiloide (1-40) en CFA. Inmediatamente después y de nuevo 48 horas después los ratones recibieron una inyección i.p. que contenía 150 ng de toxina pertussis en 0,2 ml de PBS. Los animales se monitorizaron para síntomas de EAE empezando 7 días después de la inmunización y se puntuaron como sigue: 0, sin enfermedad; 1 parálisis de la cola; 2, debilidad de la extremidad posterior; 3, parálisis de la extremidad posterior; 4. parálisis de la extremidad posterior más extremidad anterior; y 5, moribundo.

10 **Vacunación nasal.** Acetato de glatiramer: se proporcionaron 25 μg en los días 1, 2, 4 y 5 la primera semana seguido de un refuerzo semanal durante seis semanas. IVX-908: se proporcionó 1 μg /ratón en los días 1 y 5 la primera semana seguido de un refuerzo semanal durante seis semanas. BSA+IVX-908: se proporcionaron 25 μg de BSA más 1 μg de IVX-908 en los días 1 y 5 la primera semana y se proporcionaron 25 μg de BSA solo en los días 2 y 4, seguido de seis refuerzos semanales de la combinación BSA+IVX-908. GA+IVX-908: se proporcionaron 25 μg de GA más 1 μg de IVX-908 en los días 1 y 5 la primera semana y se proporcionaron 25 μg de GA solo en los días 2 y 4, seguido de seis refuerzos semanales de la combinación GA+IVX-908.

15 **Cuantificación de amiloide.** Para cuantificar la carga amiloide, se extrajo el hemisferio derecho en 5,0 M cloruro de guanidinio (pH 8) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se usaron diluciones para medir los niveles de A β 40 y A β 42 insoluble (asociada a amiloide) por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) en sandwich. Para medir las fibrillas de A β , se fijó el hemisferio izquierdo en 4% Brain toda la noche seguido de 4,5% sacarosa durante 4 horas y 20% Sacarosa durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Los cerebros se congelaron en presencia de OCT paraformaldehído, se cortaron en secciones longitudinales de 14 μm usadas para tinción inmunohistológica y cuantificación de fibrillas amiloides. Se seleccionaron regiones de hipocampo bien definidas (Bregma - 1,34) para la cuantificación de la cantidad de fibrilla amiloide en placas usando tinción con tioflavina S. Las imágenes (aumento x20) de estas secciones se recogieron de una cámara de vídeo en color 3CCD y se analizaron con software apropiado (NIH; Imaging Research). La cantidad de fibrilla amiloide se expresó como un porcentaje por mm^2 de región de hipocampo según se mide por el software.

25 **Inmunohistología.** La tinción se realizó utilizando los marcadores siguientes: células T (CD3; BD Biosciences: 553057), microglía/macrófagos (CD11b; Serotec: MCA74G), (C-MFR; Cymbus Biotech: 21080096), IFN- γ (Pharmingen: 559065), IL-10 (Pharmingen: 559063) y TGF- β (RD: AB-20-PB). Los anticuerpos anti-amiloide (R1282) fueron un regalo de Dennis Seloke. Las secciones del cerebro se sometieron además a tinción con Hematoxilina. Las secciones se evaluaron en una manera ciega y los controles incluyeron el uso de mAbs con isotipo equivalente como se ha descrito previamente. Para cada tratamiento, la cuantificación se hizo de la región del hipocampo de tres secciones cerebrales diferentes (la misma región, Bregma - 1,34, que se usaron para tinción con ThS). Los resultados se expresan como la media de las células marcadas para cada marcador.

35 **Neuropatología.** Para examinar la neurotoxicidad, se fijó el hemisferio izquierdo en 4% paraformaldehído toda la noche seguido de 4,5% sacarosa durante 4 horas y 20% sacarosa toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Los cerebros se congelaron en presencia de OCT paraformaldehído, se cortaron en secciones longitudinales de 14 μm y se usaron para tinción inmunohistológica. Teñimos para cuatro marcadores usados para estrés neuronal e integridad de la barrera hemato encefálica: GFAP (Sigma; G9269), SMI32 (Serotec), TUNEL (Roche 1 684 817), iNOS (CHEMICON: AB5382) y Fibrinógeno (Dako: A0080). La astrocitosis se expresa como un porcentaje por mm^2 de la región de hipocampo cubierta por astrocitos. La tinción para iNOS, SMI32 y Fibrinógeno se hizo como se ha descrito previamente (29). La tinción para marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) se realizó según las recomendaciones del fabricante (Roche 1 684 817). La tinción con H y E se realizó para identificar la morfología de las células contadas. La tinción se realizó en dos secciones consecutivas por animal y cuatro animales por grupo de una forma ciega usando software Imaging Research del NIH en una estrategia estereológica no sesgada. La tinción por grupo de la corteza motora primaria (Bregma lateral 1,44 mm) se muestra en la Figura 6.

45 **Análisis de los datos.** Todos los datos continuos y ordinales se expresan como media \pm sem. Las comparaciones de los datos se realizaron usando el ensayo de la t de Student cuando se compararon dos grupos o un análisis ANOVA cuando se analizaron tres o más grupos. Los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos; los valores de r se calcularon usando un programa estadístico Excel.

REIVINDICACIONES

1. Una composición basada en proteosoma para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico que es una enfermedad beta-amiloide en un mamífero, en el que la composición basada en proteosoma se selecciona de (a) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido endógeno o (b) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido exógeno.
2. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1 que comprende además acetato de glatiramer para uso en el tratamiento de la enfermedad beta-amiloide en un mamífero, en el que el acetato de glatiramer está bien en la misma formulación con dicha composición basada en proteosoma o en una formulación separada.
3. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 o reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha enfermedad beta-amiloide comprende agregación perjudicial de proteínas.
4. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad beta-amiloide se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y enfermedad de Alzheimer pre-sintomática.
5. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento de dicha enfermedad beta-amiloide resulta en una reducción de péptido beta amiloide soluble o insoluble, y en el que dicho péptido beta amiloide insoluble comprende péptido beta amiloide fibrilar.
6. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 5 para el uso según la reivindicación 5, en el que dicho péptido beta amiloide es insoluble.
7. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 o reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha enfermedad beta-amiloide es la enfermedad de Alzheimer.
8. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 7, en el que el tratamiento de la enfermedad beta-amiloide comprende prevenir una carga incrementada de beta-amiloide, mantener la carga actual de beta-amiloide o disminuir la carga de beta-amiloide en el cerebro.
9. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 8 para el uso según la reivindicación 8, en el que dicha carga beta-amiloide comprende carga de péptido beta amiloide total y en el que la carga de péptido beta amiloide total comprende carga de amiloide fibrilar.
10. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho proteosoma y dicho lipopolisacárido exógeno se obtienen de (a) el mismo género de bacterias; o (b) diferentes géneros de bacterias.
11. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho proteosoma es de *Neisseria meningitidis* y dicho lipopolisacárido es de *Shigella flexneri*.
12. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 o reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende además un diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición basada en proteosoma de la reivindicación 1 o reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la composición incita una respuesta independiente de anticuerpo en el mamífero.
14. Uso de una composición basada en proteosoma para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno neurológico que es una enfermedad beta-amiloide en un mamífero, en el que la composición basada en proteosoma se selecciona de (a) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido endógeno o (b) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido exógeno.
15. Uso de una composición basada en proteosoma y una composición de acetato de glatiramer para preparar una preparación combinada para tratar una enfermedad o trastorno neurológico que es una enfermedad beta-amiloide en un mamífero, en el que la composición basada en proteosoma se selecciona de (a) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido endógeno o (b) un adyuvante basado en proteosoma que comprende (i) proteosomas de *Neisseria sp.* y (ii) un lipopolisacárido exógeno.

16. Uso según la reivindicación 14 o reivindicación 15, en el que la enfermedad beta-amiloidal comprende agregación perjudicial de proteínas.
- 5 17. Uso según la reivindicación 16, en el que la enfermedad beta-amiloidal que comprende agregación perjudicial de proteínas se selecciona de enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y enfermedad de Alzheimer presintomática.
18. Uso según la reivindicación 16, en el que el tratamiento de la enfermedad beta-amiloidal resulta en una reducción del péptido beta amiloide soluble o insoluble y en el que el péptido beta amiloide insoluble comprende péptido beta amiloide fibrilar.
19. Uso según la reivindicación 18, en el que el péptido beta amiloide es insoluble.
- 10 20. Uso según la reivindicación 16, en el que la enfermedad beta-amiloidal en la enfermedad de Alzheimer.
21. Uso según la reivindicación 16, en el que el tratamiento de la enfermedad beta-amiloidal comprende prevenir una carga incrementada de beta-amiloide, mantener la carga actual de beta-amiloide o disminuir la carga de beta-amiloide en el cerebro.
- 15 22. Uso según la reivindicación 21, en el que la carga beta-amiloide comprende carga de péptido beta amiloide total y en el que la carga de péptido beta amiloide total comprende carga de amiloide fibrilar.
23. Uso según la reivindicación 22, en el que el proteosoma y el lipopolisacárido exógeno se obtienen de (a) el mismo género de bacterias; o (b) diferentes géneros de bacterias.
24. Uso según la reivindicación 23, en el que el proteosoma es de *Neisseria meningitidis* y el lipopolisacárido es de *Shigella flexneri*.
- 20 25. Uso según la reivindicación 14 o reivindicación 15, en el que la composición basada en proteosoma comprende además un diluyente, excipiente, estabilizador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
26. Uso según la reivindicación 14 o reivindicación 15, en el que el tratamiento de la enfermedad o trastorno neurológico comprende incitar una respuesta independiente de anticuerpo en el mamífero.

Figura 1

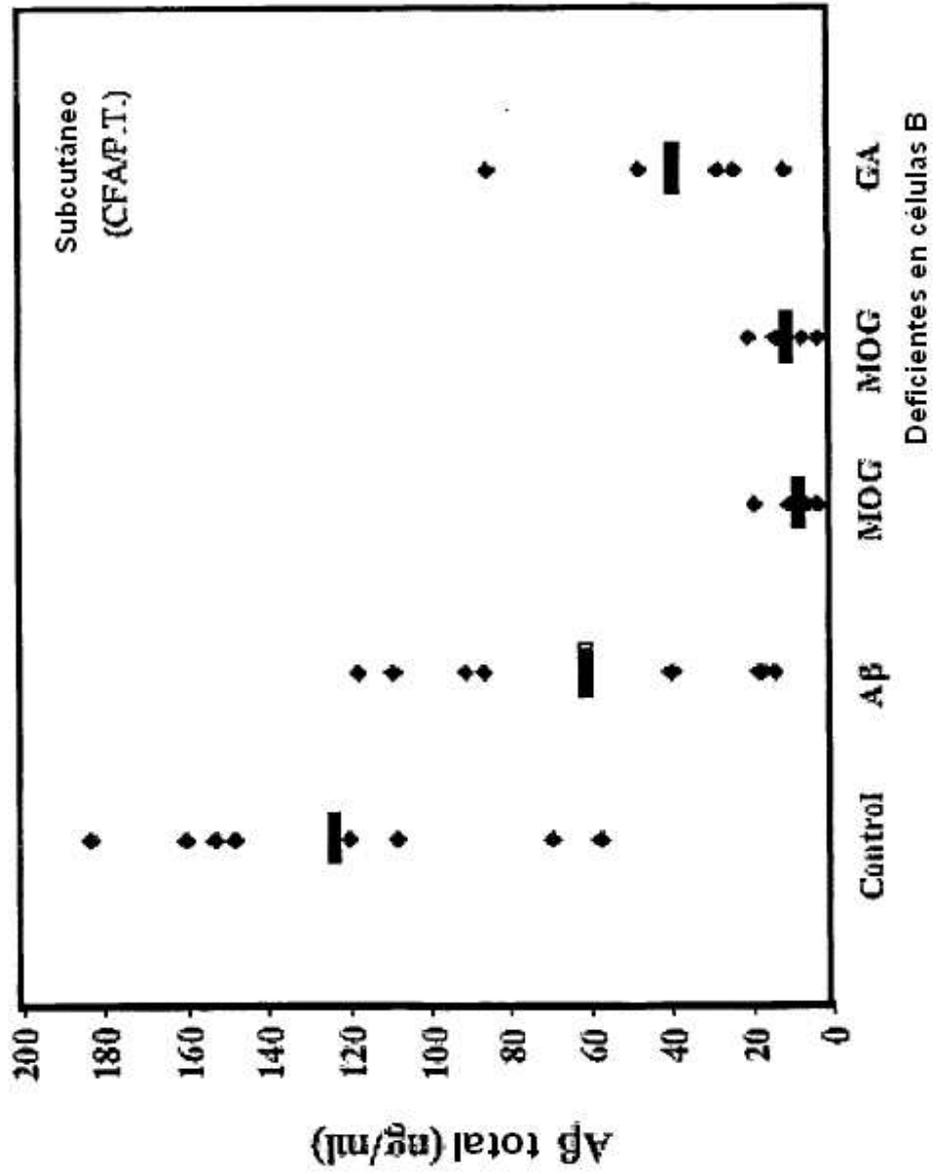


Figura 2

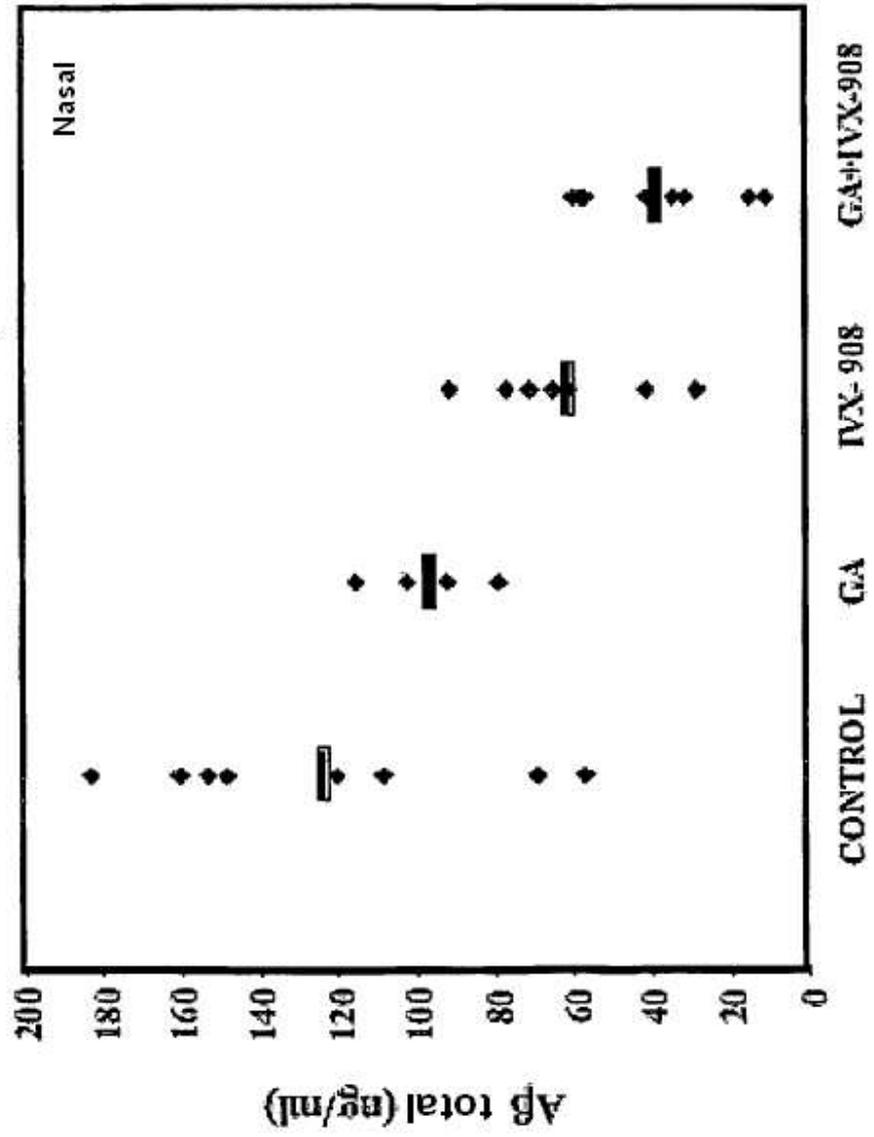
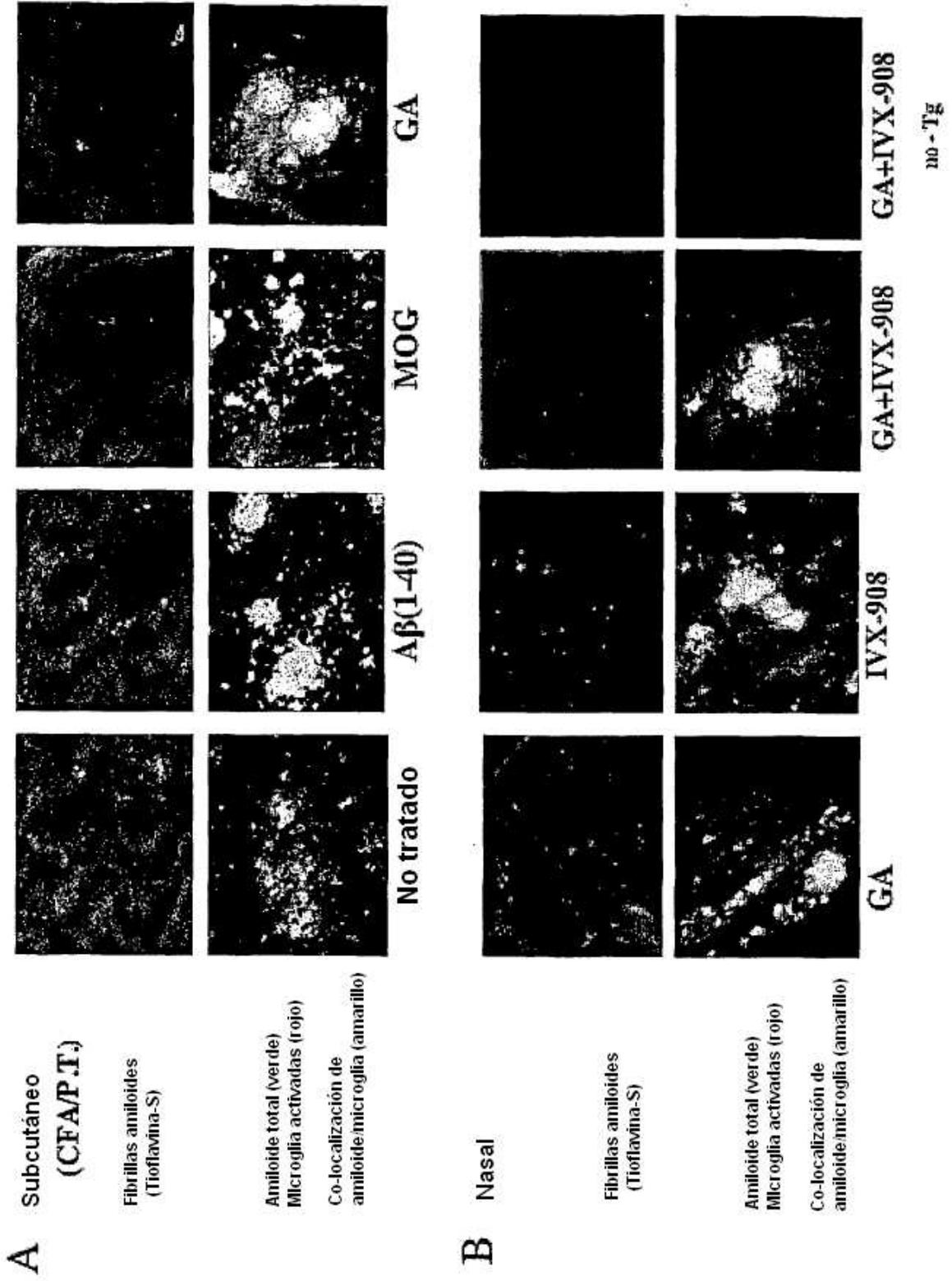


Figura 3



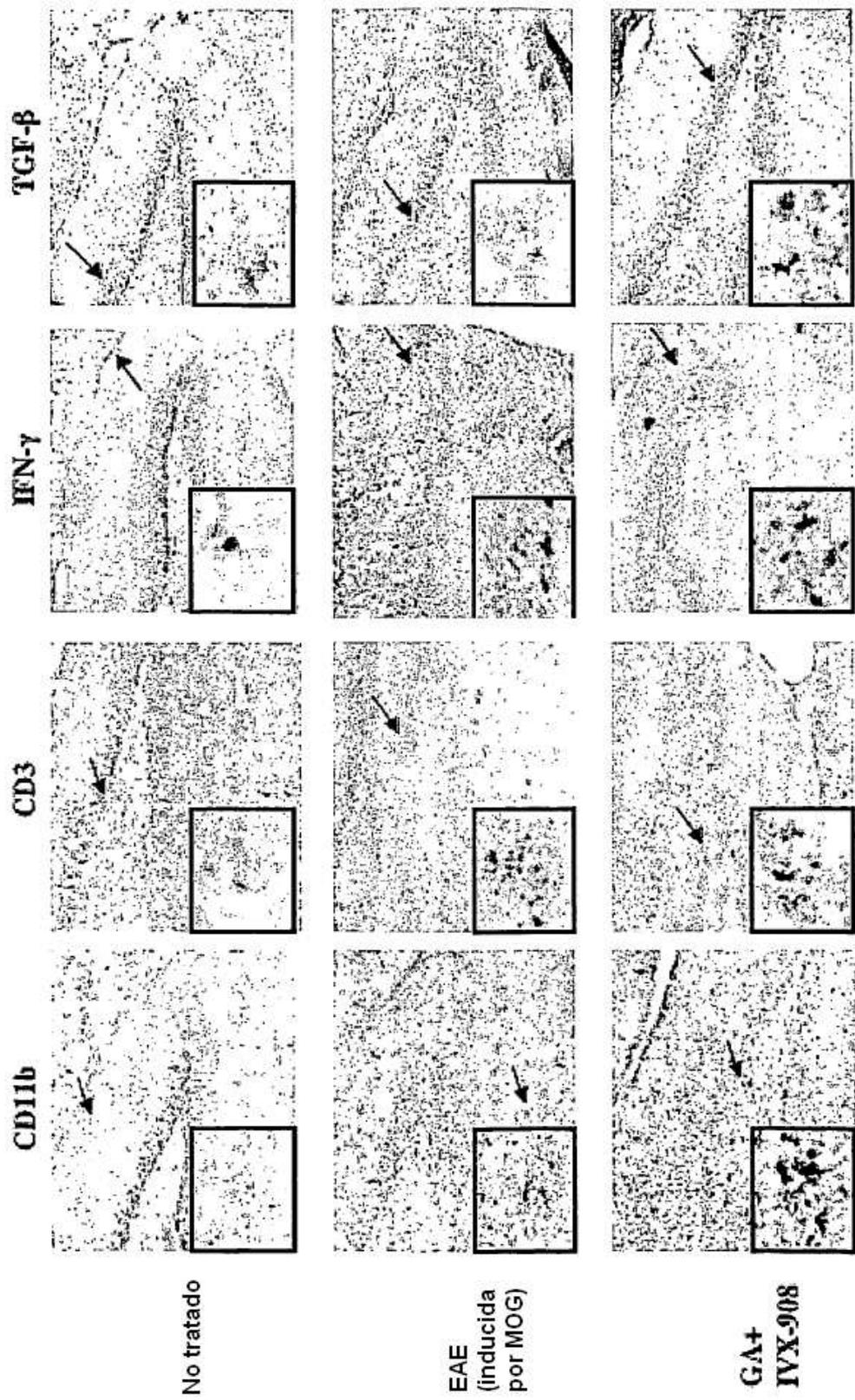
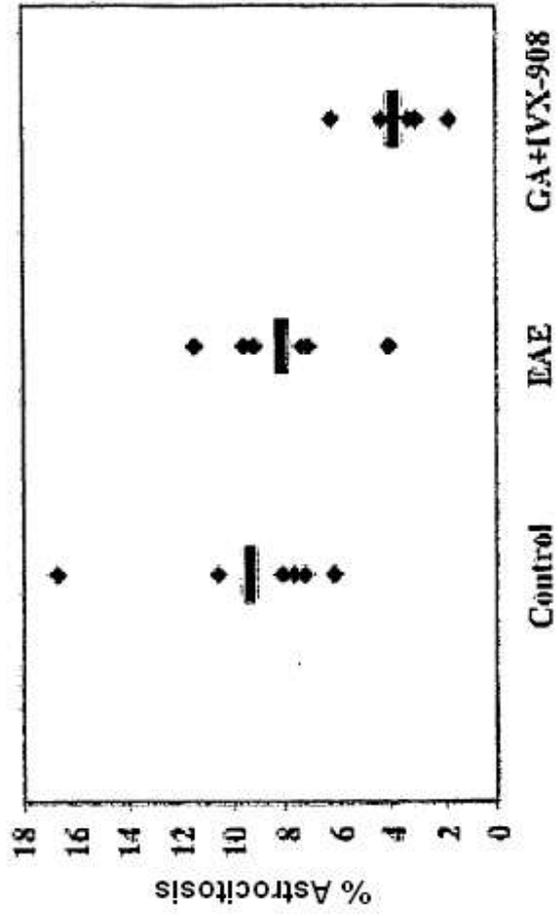


Figura 4

Figura 5



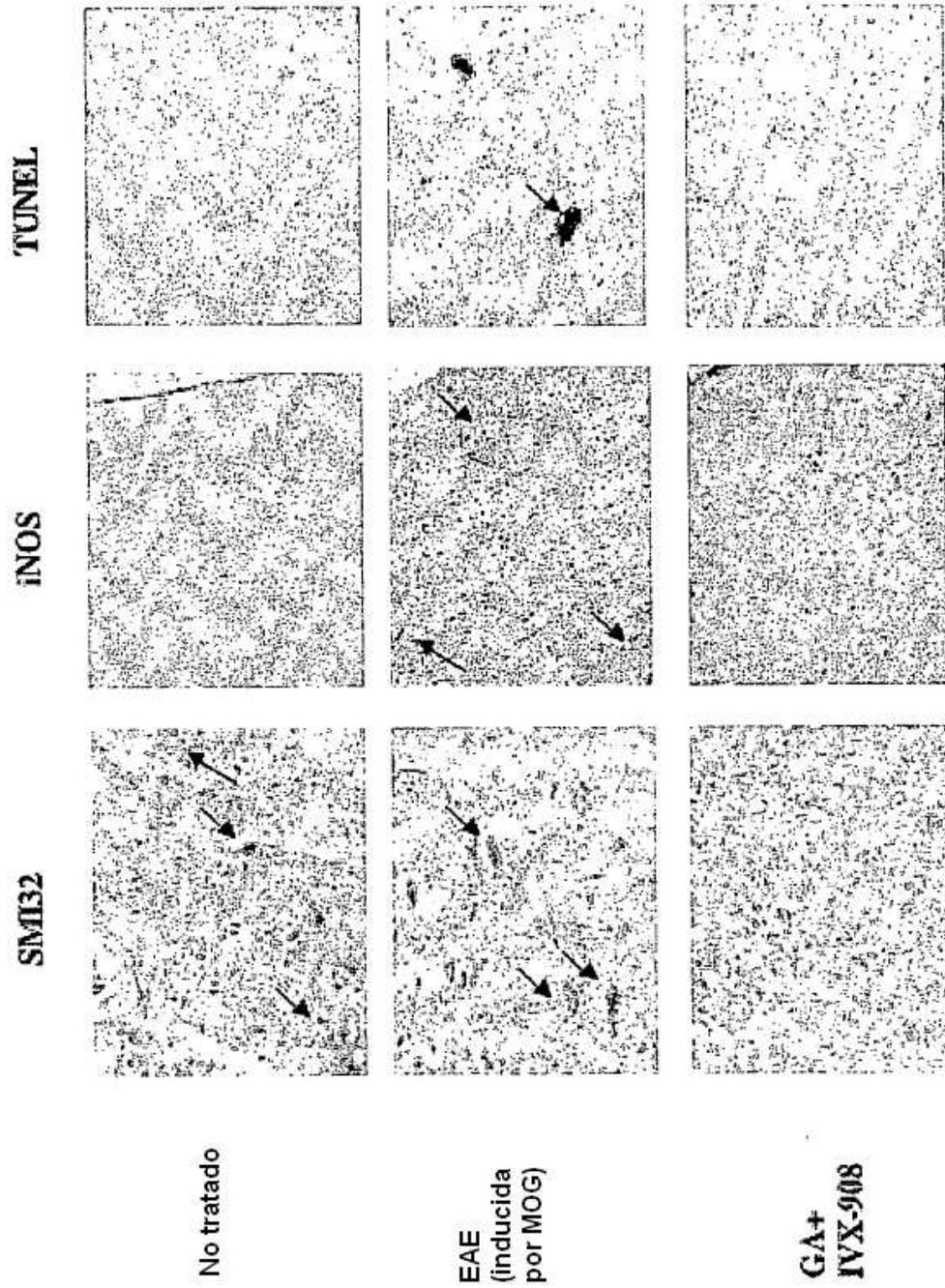


Figura 6

GA+IVX-908



EAE



No tratado



Figura 7

Figura 8

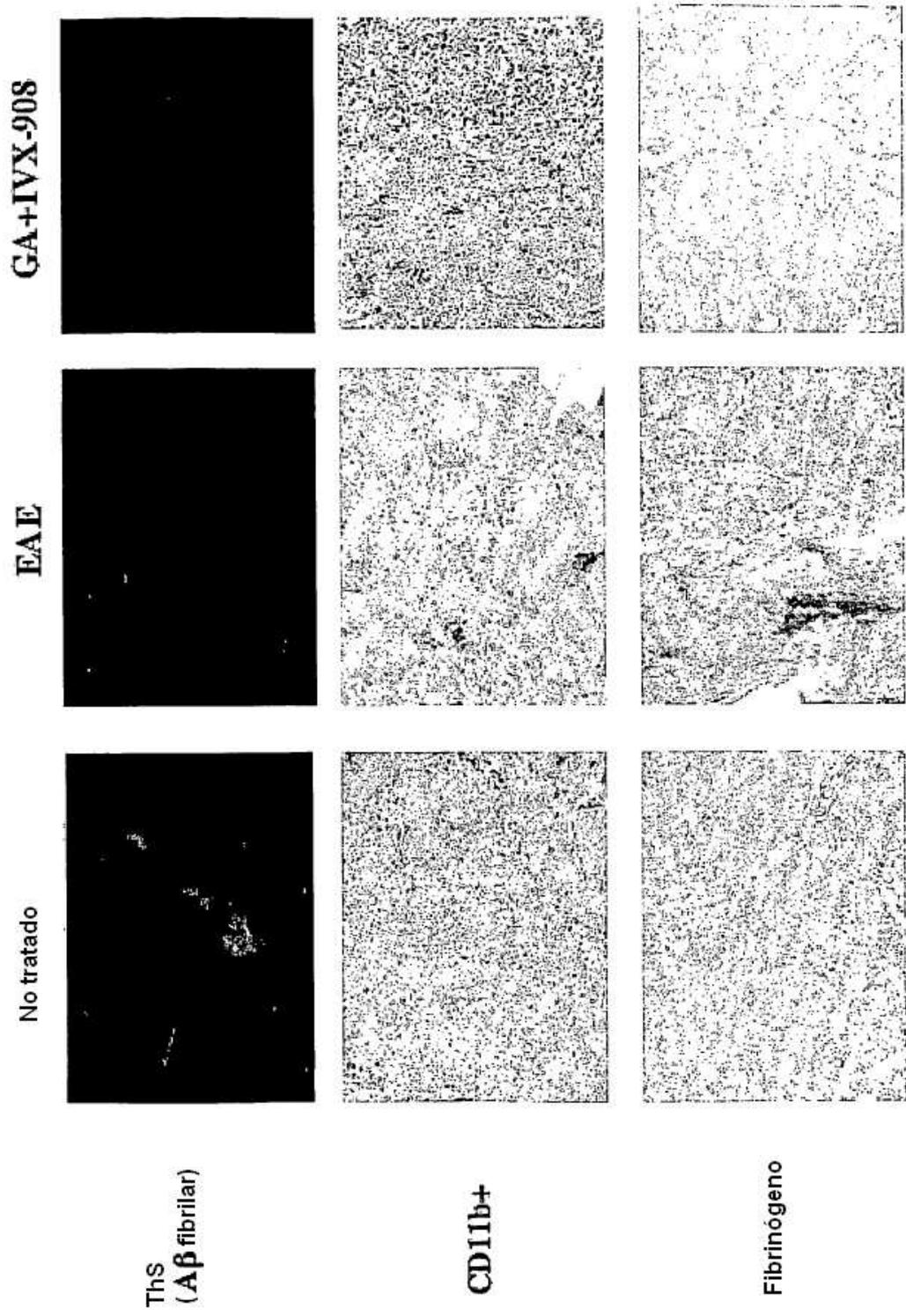


Figura 9

