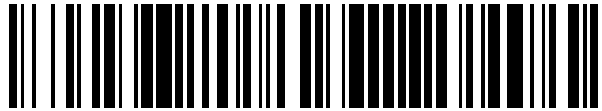


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 577**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2010 E 10754572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2464378**

54 Título: **Uso de Mycobacterium bovis BCG eliminada mediante Liofilización Prolongada (LP) para prevenir o tratar la aterosclerosis**

30 Prioridad:

13.08.2009 EP 09290627

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

15.03.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (50.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR y
INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARCHAL, GILLES;
LAGRANDERIE, MICHELINE y
SCHWARTZ-CORNIL, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 563 577 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

Uso de *Mycobacterium bovis* BCG eliminada mediante Liofilización Prolongada (LP) para prevenir o tratar la aterosclerosis

5 La invención se refiere al uso de *Mycobacterium bovis* BCG eliminada mediante Liofilización Prolongada (LP) para prevenir o tratar la aterosclerosis.

10 La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico complejo que progresa durante décadas. Se caracteriza por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LBD) oxidadas, mayor muerte celular y degeneración hipertrófica de la pared arterial, lo que causa un estrechamiento del canal y perjudica el flujo sanguíneo. Puede pasar en cualquier área del cuerpo, pero es más importante cuando ocurre en el corazón, en el cerebro o en los vasos sanguíneos que conducen al cerebro. El estrechamiento es debido a la formación de placas (porciones protuberantes) en el recubrimiento interior de las arterias. Estas placas consisten en lipoproteínas de baja densidad, células musculares deterioradas, tejido fibroso, aglutinación de plaquetas sanguíneas, colesterol, macrófagos, linfocitos T y, algunas veces, calcio. Tienden a formarse en regiones de flujo sanguíneo turbulento y se encuentran lo más frecuentemente en personas con altas concentraciones de colesterol en el flujo sanguíneo. El número y espesor de las placas aumenta con la edad, lo que causa la pérdida del recubrimiento blando de los vasos sanguíneos y promueve la formación de trombos (coágulos sanguíneos). Algunas veces, los fragmentos de los trombos se rompen y forman embolias, que viajan a través del flujo sanguíneo y bloquean los vasos menores.

20 La aterosclerosis y sus manifestaciones clínicas son la principal causa de morbilidad y mortalidad tanto entre hombres como en mujeres. La enfermedad cardíaca aterosclerótica, que implica a las arterias coronarias (enfermedad cardíaca coronaria), es la causa más común de muerte, representando una de cada tres de todas las muertes. La interferencia aterosclerótica con el suministro de sangre al cerebro (derrame cerebral) es la tercera causa de muerte más común después del cáncer. La insuficiencia vascular es otra manifestación clínica de la aterosclerosis que causa una gran parte de la enfermedad reduciendo el flujo de sangre en otras arterias mayores, tales como las de los riñones, las piernas y los intestinos.

25 Desafortunadamente, la aterosclerosis no produce síntomas hasta que el daño a las arterias es lo suficientemente severo para restringir el flujo sanguíneo. La restricción del flujo sanguíneo al músculo cardíaco por la aterosclerosis puede causar angina pectoris o infarto de miocardio (un ataque al corazón). La restricción del flujo sanguíneo a los músculos de las piernas causa la claudicación intermitente (dolores en las piernas provocado por andar y que se alivia con el descanso). El estrechamiento de las arterias que suministran sangre al cerebro puede causar ataques isquémicos transitorios (síntomas y signos de un derrame cerebral que dura menos de 24 horas) y episodios de mareos, o en último lugar, en el propio derrame cerebral.

30 El actual tratamiento médico de la aterosclerosis incluye el uso de varios fármacos tales como estatinas (rosuvastatina) y fibratos. Además de los fármacos anticoagulantes usados para tratar de minimizar coagulación secundaria y la formación de émbolos, los fármacos vasodilatadores proporcionan el alivio de los síntomas aunque no tienen valor curativo. El tratamiento quirúrgico está disponible para aquellos pacientes no receptivos al tratamiento médico o, en ciertas situaciones, de alto riesgo. La angioplastia con balón puede abrir los vasos estrechados y promover un mejor suministro de sangre. El suministro de sangre al corazón también puede restaurarse mediante cirugía de derivación de la arteria coronaria. La obstrucción ateromatosa y arterial calcificada puede ser eliminada mediante endoarteriectomía y pueden reemplazarse segmentos enteros de vasos periféricos dañados mediante injertos de tubos de plástico tejidos.

La patogénesis de la aterosclerosis implica una compleja interrelación entre inflamación, autoinmunidad y degeneración específica de tejido.

45 Los múltiples factores de riesgo para la aterosclerosis incluyen la hipertensión (alta presión sanguínea), el tabaco, la diabetes mellitus, la dislipidemia (hipercolesterolemia), el síndrome metabólico, la obesidad, la isquemia, ser del sexo varón, la edad, la historia familiar de la enfermedad cardíaca y un estilo de vida sedentario.

50 Cualesquiera que sean los factores, la inflamación crónica resultante de la íntima arterial es la principal fuerza generadora detrás del desarrollo de la aterosclerosis. Los procesos celulares principales implicados en la aterosclerosis incluyen células endoteliales activadas que liberan las quimioquinas. Las lipoproteínas de baja densidad (LBD) oxidadas inducen células endoteliales activadas que expresan moléculas de adhesión de glicoproteínas (molécula de adhesión celular vascular- 1 (MACV-1), molécula de adhesión intracelular-1 (MAIC-1) y E-selectina) que ayudan en el reclutamiento y la infiltración de células inflamatorias. Después de unirse al endotelio, los leucocitos se infiltran en la íntima. Allí, los monocitos se diferencian en macrófagos, que secuestran el colesterol de las LBD oxidadas y mediante ello se vuelven células de espuma. La acumulación resultante de estrías grasas bajo la pared arterial es seguida por la formación de lesiones ateroscleróticas avanzadas. Las células musculares lisas vasculares proliferan y migran hacia la lesión. Durante su reclutamiento, las células musculares lisas vasculares secretan la matriz extracelular que forma una placa fibrosa sobre el ateroma lipídico. Por último, las placas inestables pueden romperse, como resultado de la continuación de la inflamación crónica. Los trombos resultantes son responsables de acontecimientos coronarios agudos tales como infarto de miocardio y derrame cerebral.

El NF- κ B es un marcador importante asociado a la activación de respuestas inflamatorias en lesiones ateroscleróticas (Bank et al., J. Clin. Invest., 1996, 97, 1715-1722), mientras que la señalización de PPAR- γ inhibe la producción de citoquinas inflamatorias (Jiang et al., Nature, 1998, 391, 82-86). La fosforilación de I- κ B activa a NF- κ B desempeñando una función en este proceso de enfermedad. Sin embargo, no hay pruebas directas de que la activación de NF- κ B sea necesaria para la aterosclerosis (T. Collins y M.I Cybulsky, J. Clinical Investigation, 2001, 107, 255-262). La ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) fosforila al receptor α retinoide X (RXR α) mientras que el RXR α no fosforilado forma un heterodímero con PPAR γ que reduce la inflamación sinérgicamente (Yamazaki et al., Gut, 2007, 56, 1557-1563).

El tratamiento de la inflamación representa un enfoque para el desarrollo de tratamientos para la aterosclerosis. Algunos fármacos anti-inflamatorios se mostraron que ejercían efectos cardioprotectores en etapas claves de la aterogénesis. Las tiazolinadionas son agonistas del receptor proliferador-activado de peroxisoma (PPAR) γ que están dentro del uso clínico para el tratamiento de la diabetes tipo 2. El PPAR γ regula numerosos procesos celulares que contribuyen a la aterosclerosis. Los estudios en modelos animales in vitro y clínicos indican que las tiazolinadionas corrigen la disfunción endotelial, suprimen los procesos inflamatorios crónicos, reducen la formación de estrías de grasa, retrasan la evolución de la placa y el espesor de la pared del vaso y potencian la estabilización de la placa. Así, las tiazolinadionas muestran potencial como agentes anti-inflamatorios, antitrombóticos que podrían tanto mejorar los niveles de glucosa y el riesgo cardiovascular a largo plazo relacionado con la aterosclerosis en pacientes con diabetes tipo 2 (B. Staels, Current Medical Research and Opinion, 2005, 21, supl. 1, S13-S20). Sin embargo, la combinación de agonistas de PPAR- γ (usados como sensibilizadores de insulina en pacientes diabéticos que tienen alto riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular) y de agonistas de PPAR- α (usados para tratar la dislipidemia) potenciaban la aterosclerosis en ApoE $^{-/-}$ (Calkin et al., Atherosclerosis, 2007, 195, 17-22) e indujeron acontecimientos cardiovasculares mayores adversos en seres humanos (Nissen et al., JAMA, 2005, 294, 2581-2586).

La inducción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 se considera beneficiosa en el tratamiento de la aterosclerosis (documento WO 00/74715). Sin embargo, IL-10 tiene tanto actividades anti-inflamatorias como inmunodepresoras (Mendez-Samperio et al., Cellular Immunology, 2008, 251, 37-42). El documento WO 00/74715 describe el uso de una fracción deslipidada y desglícolipidada de *Mycobacterium vaccae* (DD-M *vaccae*) inactivada por calor (es decir, eliminada y desnaturalizada) y liofilizada que induce la expresión de IL-10 para el tratamiento de la aterosclerosis. La *Mycobacterium bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) viva es capaz de inducir la producción de IL-10 en un cultivo de células epiteliales pulmonares humanas (Mendez-Samperio et al., Cellular Immunology, 2008, 251, 37-42). Sin embargo, *M. vaccae* es única en que las preparaciones inactivadas por calor retienen las actividades de vacuna e inmunoterapéuticas mientras que las de BCG son perdidas por el calor (documento WO 00/74715).

Más recientemente, un creciente cuerpo de evidencias sugieren que el sistema inmune es el factor principal que modula el proceso aterogénico (para una revisión, véase Nilsson, J. y G.K. Hanson, Journal of Internal Medicine, 2008, 263, 464-478). Aunque la mayor parte de células inflamatorias en lesiones ateroscleróticas son macrófagos, hasta el 20% de las células son linfocitos T (Hansson, G.K., N. Engl. J. Med., 2005, 352, 1685-1695). El proceso de enfermedad está asociado con la formación local de antígenos propios modificados (LBD oxidadas, HSP, fragmentos apoptóticos) que son provocados tanto por respuestas inmunes innatas como adaptativas. Es probable que estas respuestas autoinmunes tengan un efecto beneficioso que facilite la eliminación de productos de desecho potencialmente peligrosos de LBD oxidadas y células que mueren. Sin embargo, si el balance entre autoinmunidad protectora y promotora de enfermedad se pierde, el sistema autoinmune puede acelerarse en un pro-proceso inflamatorio destructivo lo que causa el crecimiento de placas y la desestabilización. Estas observaciones apuntan a la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos para la aterosclerosis basados en la modulación de respuestas inmunes frente a los antígenos de placa.

Los estudios preliminares con animales han proporcionado pruebas de que es posible inhibir el desarrollo de la aterosclerosis modulando las respuestas inmunes contra los antígenos de placa mediante vacunas basadas en antígenos presentes en las LBD oxidadas. Sin embargo, como las LBD oxidadas son un complejo de partículas con una composición antigénica que es difícil de estandarizar y como pueden potencialmente contener también antígenos peligrosos no son por sí mismas un componente de vacuna ideal. Durante los últimos años se ha puesto un considerable esfuerzo en caracterizar los antígenos exactos en las LBD oxidadas que inducen inmunidad atero-protectora. Se identificaron dos antígenos en LBD oxidadas: fosfolípidos oxidados (fosforilcolina) y péptidos apo B-100 (Klingenberg et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol., 2010, 30, 946-952). Una limitación con ambas vacunas basadas en fosforilcolina y apo B péptido es que el mecanismo de acción no se entiende muy bien. Los fosfolípidos oxidados se reconocen por una subclase de IgM denominadas anticuerpos naturales, cuya regulación de la expresión no se entiende bien y que presentan reactividad cruzada con antígenos propios asociados con células senescentes y restos celulares. La alta especificidad y la posibilidad de producir preparaciones de vacuna estandarizadas son algunas de las ventajas de las vacunas basadas en apo B péptidos y sus vacunas humanas están en este momento en desarrollo preclínico. Las desventajas con este enfoque incluyen la necesidad de realizar el genotipo del antígeno del leucocito humano (HLA) del paciente antes del tratamiento y el riesgo de que las vacunas tengan que ser individualizadas dependiendo del tipo HLA.

Sin embargo, además de las vacunas basadas en los apo B péptidos, no han sido desarrollados otros enfoques terapéuticos que traten el sistema inmune para el tratamiento de la aterosclerosis, hasta el momento.

Hay varios modos para que el cuerpo controle la actividad de las respuestas autoinmunes, uno importante son las células T reguladoras (Tregs). Varios subtipos de Tregs han sido identificados. Las Tregs CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ naturales se desarrollan en el timo y entonces entran en los tejidos periféricos donde constituyen el 5-10 % de todas las células T. En contraste con las Tregs naturales, las células T reguladoras 1 (Tr1) productoras de IL-10 y T auxiliares 3 (Th3) productoras de TGF- β se generan a partir de células T naive en la periferia después de la aparición del antígeno y la activación por las células dendríticas (CD). Varias líneas experimentales han implicado la desregulación de la función Treg en la aterosclerosis. Hay también pruebas funcionales acumulativas de una función protectora de las Tregs en la aterosclerosis. La depleción de las Tregs naturales a través de la delección de CD80/86, CD28 o ICOS, así como el tratamiento con anticuerpos anti-CD25, aumenta significativamente la formación de placas (Ait-Oufella et al, Nat. Med., 2006, 12, 178-180; Gotsman et al, Circulation, 2006, 114, 2047-2055). Similarmente, la inhibición de células Th3 a través de la delección del receptor de células T para TGF- β potencia sustancialmente la progresión de la enfermedad (Roberson et al, J. Clin. Invest, 2003, 112, 1342-1350) mientras que la administración de un clon de células Tr1 específicas de ovoalbumina junto con su antígeno cognado inhibía el desarrollo de las placas en ratones (ApoE^{-/-}) deficientes de apolipoproteína E (Mallat et al., Circulation, 2003, 108, 1232-1237). Sin embargo, la comprensión del papel de las células T reguladoras en la aterosclerosis todavía es muy incompleta.

Estos hallazgos han aumentado la posibilidad de que puedan activarse rutas reguladoras inmunes para reducir la inflamación y tratar o prevenir la aterosclerosis. De modo destacable, la vacunación con *Mycobacterium bovis* BCG (Bacille Calmette-Guerin) mostró que protegía contra el desarrollo de atopía en niños, sugiriendo que BCG puede prevenir la desregulación de las respuestas inmunes (Shirakawa et al., Science, 1997, 275, 77-79)). Para sortear la liberación impracticable de BCG vivas como tratamiento antiinflamatorio, la BCG se ha eliminado mediante Liofilización Prolongada (BCG LP o LP) que se ha mostrado que es un potente agente anti-inflamatorio en varios modelos animales de alergia (asma; Solicitud PCT Internacional WO 03/049752; Lagranderie et al., J. Allergy Clin. Immunol, 2008, 121, 471-478; Lagranderie et al., The Journal of Immunology, 2010, 184, 1062-1070) y la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad inflamatoria del intestino; Solicitud PCT Internacional WO 2007/072230). La LP no causa los efectos secundarios tóxicos asociados a las BCG vivas o inactivadas por calor y no interfiere con la diagnosis de la tuberculosis en el examen cutáneo de DTH. La LP tiene la propiedad original de actuar no solo en la ruta de señalización de Th1 a la que están asociados TNF- α , IL- 12, IFN- γ y T-bet, sino también en la ruta de señalización de Th2 a la que están asociados IL-4, IL- 13 y GATA- 3 y en una nueva ruta de señalización con la que IL- 17 y PPAR- γ parecen estar asociados (Solicitud PCT Internacional WO 2007/072230). El efecto protector/curativo de la LP frente a los síntomas de la alergia y la enfermedad inflamatoria intestinal está asociado con la estimulación de células CD4⁺ CD25⁺ reguladoras productoras de IL-10 (Solicitudes PCT Internacionales WO 03/049752 y WO 2007/072230).

Sin embargo, hay efectos secundarios principales que pueden estar asociados al uso de células T reguladoras que estimulan agentes para tratar enfermedades autoinmunes como la aterosclerosis (Nilsson, J. y G. K. Hanson, Journal of Internal Medicine, 2008, 263, 464-478). Si las células T reguladoras son demasiado depresoras y la inmunodepresión no se restringe al tejido afectado, hay riesgo de que las defensas frente a las infecciones y la supervivencia de células tumorales dependiente de células T CD8 sean bloqueadas. Por ejemplo, una nucleoproteína viral derivada del virus del sarampión se ha mostrado que reduce la aterosclerosis en ratones cuando se inyecta semanalmente (Ait-Oufella et al., Circulation, 2007, 116, 1707-1713). Sin embargo, esta nucleoproteína activó el desarrollo de Tregs depresoras que secretaban IL-10 bajo la estimulación in vitro y su administración en ratones redujo la producción de IL-4 y IFN- γ por células T, sugiriendo que el tratamiento de nucleoproteína del sarampión podría ser la inmunodepresión.

Los inventores han demostrado que LP BCG reduce la aterosclerosis en tres modelos de ratón distintos: 1) ratones deficientes de apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) que desarrollan espontáneamente lesiones ateroscleróticas avanzadas en 30 semanas; 2) ratones deficientes del receptor de lipoproteína de baja densidad (Ldlr^{-/-}) que desarrollan la aterosclerosis con dieta hiperlipidémica, y 3) ratones ApoE^{-/-} x CD4dnT β RII, que carecen de receptores TGF- β funcionales en células T, y espontáneamente desarrollan lesiones ateroscleróticas a las 12 semanas.

La LP BCG redujo significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en los tres modelos de ratón de tendencia aterosclerótica independientemente del gen activado y de la señalización de TGF- β .

La LP BCG provocó simultáneamente: 1) un efecto inmunoregulador a través de la producción de IL-10 y una expansión de Treg, 2) una inhibición de la activación de NF- κ B, y 3) un incremento en PPAR- γ sin alterar los niveles de PPAR- α .

Que la LP BCG sea un inductor selectivo de PPAR- γ y no induzca la activación de PPAR- α es una ventaja, lo que apoya su potencial para su uso clínico.

Inesperadamente, a pesar de su actividad inmunoreguladora, la LP BCG no atenuó la protección conferida por las vacunas que generan respuestas inmunes Th1 y Th2 (*Neisseria meningitides*, BCG), ni exacerbaron el curso de una infección por patógenos (virus (virus de la gripe), bacterias (*M. tuberculosis*) o parásitos (*Leishmania major*)). El mantenimiento de una inmunocompetencia eficiente del huésped sugiere que la LP BCG es un agente terapéutico tolerable en seres humanos.

Un perfil inmunoregulador, sin signos de inmunodepresión, se induce en respuesta a la LP BCG. El perfil inflamatorio modulado sistémico en los ratones tratados con LP BCG también estaba asociado a una menor acumulación local de macrófagos MOMA+ en las placas, que también pueden prevenir la ruptura de placas, el mayor peligro en la enfermedad aterosclerótica.

5 Además, las LP BCG no tuvieron efectos secundarios mensurables en este estudio. Estos resultados indican que la LP es un nuevo enfoque terapéutico para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis. Se espera que la LP tenga una duración de actividad prolongada (de al menos 2 meses). Por lo tanto, la LP debería tener la ventaja de un número de administración muy limitado comparado con los fármacos actualmente usados que requieren una administración diaria repetitiva. Además, el tratamiento con LP es seguro ya que no induce la inmunodepresión.

10 La invención se refiere al uso de la bacteria *Mycobacterium bovis* BCG eliminada mediante liofilización prolongada (LP) para prevenir o tratar la aterosclerosis.

15 La expresión "LP", "LP BCG" o "*Mycobacterium bovis* BCG liofilizada prolongadamente", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere en otras palabras a bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas y no desnaturalizadas. En el contexto de la presente invención, no desnaturalizadas significa que la estructura de las moléculas de bacterias de *Mycobacterium bovis* BCG y, en particular, la estructura primaria de las macromoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos) se preserva. Preferiblemente, la estructura primaria de las proteínas se preserva. Un ejemplo de una proteína preservada en LP es Apa, que tiene las mismas características migratorias en un gel SDS-PAGE como la proteína extraída de BCG viva (Laqueyrie et al, Infect. Immun., 1995, 63, 4003-4010). La LP puede prepararse mediante liofilización prolongada o por cualquier otro procedimiento que mate las bacterias mientras se preserve la estructura de sus componentes macromoleculares. Preferiblemente, dicho procedimiento preserva la estructura primaria de las macromoléculas de las células bacterianas. Estos procedimientos que pueden usarse para preparar LP son conocidos por los expertos ordinarios en la técnica e incluyen el uso de medios físicos, tales como, por ejemplo, liofilización prolongada, triturado en presencia de sílice o perlas de circonio, el uso de la denominada "prensa francesa" y la sonicación.

25 Una fracción de las LP, como se describe anteriormente, está cubierta por la expresión "LP" de la invención. Esta fracción se selecciona del grupo que consiste en: un resto del tratamiento de LP con una glicosidasa (resto desglicosilado), un resto de la digestión de LP por una DNasa y/o a RNasa, un resto del tratamiento de LP con una proteasa, un resto del tratamiento de LP con, sucesivamente, una glicosidasa, una DNasa y/o una RNasa y finalmente una proteasa y un resto del tratamiento de dicha LP con una proteasa (como subestilisina, por ejemplo) y una DNasa.

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la LP consiste en bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas y no desnaturalizadas que contienen menos de 1,5 % de agua, preferiblemente menos de 1 % de agua, más preferiblemente, menos de 0,5 % de agua.

35 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la LP se prepara de acuerdo con el método que se describe en la solicitud PCT Internacional WO 03/049752, incorporada en este documento como referencia, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) recolectar un cultivo de células bacterianas vivas, (ii) congelar las células bacterianas en agua o en una solución acuosa de una sal, (iii) eliminar las células bacterianas congeladas mediante el secado de éstas en un liofilizador, durante un tiempo suficiente para eliminar al menos el 98,5% del agua, preferiblemente al menos el 99 % del agua, más preferiblemente al menos el 99,5 % del agua, y (iv) recoger las células bacterianas eliminadas por liofilización prolongada. Opcionalmente, una etapa de lavado de las células bacterianas en agua o en una solución acuosa de una sal puede introducirse entre las etapas (i) y (ii).

40 Todas las fracciones de LP son obtenidas resuspendiendo las bacteria liofilizada de forma prolongada en agua o cualquier disolvente hidrófilo y aplicando el tratamiento. Una liofilización clásica podría aplicarse a fracciones después, para su almacenaje en instalaciones.

45 De acuerdo con otra realización ventajosa de la invención, dicha LP se incluye en una composición farmacéutica para prevenir o tratar la aterosclerosis que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo y/o un inmunestimulante y/o un adyuvante.

50 Cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos ordinarios en la técnica puede emplearse en la composición farmacéutica de la presente invención, variando el tipo de vehículo dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, tal como la inyección subcutánea, el vehículo preferiblemente comprende agua, tampón salino, lactosa, manitol, glutamato, una grasa o una cera y la composición farmacéutica inyectable es preferiblemente una solución isotónica (alrededor de 300-320 miliosmoles). Para la administración oral, puede emplearse cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También pueden emplearse como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica). Se describen microesferas adecuadas biodegradables, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.897.268 y 5.075.109. El aditivo puede elegirse entre agentes antiagregantes, antioxidantes, tintes, potenciadores del sabor o suavizantes, agentes ensamblantes o aislantes y, en general, entre cualquier

excipiente convencionalmente usado en la industria farmacéutica. Cualquiera de una variedad de adyuvantes/inmuno estimulantes puede emplearse en las composiciones de la presente invención para potenciar la respuesta inmune. La mayor parte de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del rápido catabolismo o para crear reacciones inflamatorias controladas, tales como hidróxido de aluminio y un estimulador de la respuesta inmune no específico. Los adyuvantes adecuados para administración humana están comercialmente disponibles; como, por ejemplo, hidróxido de aluminio, microesferas biodegradables, monofosforil A y Quil A.

La composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para la administración oral. Por ejemplo, la composición está en la forma de comprimidos, cápsulas ordinarias, cápsulas de gelatina o jarabe para administración oral. Estas formas de cápsulas de gelatina, cápsulas ordinarias y comprimidos pueden contener excipientes convencionalmente usados en la formulación farmacéutica, tales como adyuvantes o aglomerantes tales como almidones, gomas y gelatina, adyuvantes tales como fosfato de calcio, agentes desintegrantes tales como el almidón de maíz o los ácidos algénicos, un lubricante tales como estearato de magnesio, endulzantes o aromatizantes. Las soluciones o suspensiones pueden prepararse en medio acuoso o no acuoso mediante la adición de disolventes farmacológicamente compatibles. Estos incluyen glicoles, poliglicoles, propilenglicoles, éter de poliglicol, DMSO y etanol.

En general, la composición puede administrarse mediante inyección parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasal (por ejemplo, por aspiración o nebulización), oralmente, sublingualmente, o tópicamente, a través de la piel o a través del epitelio del recto.

La cantidad de LP presente en la composición de la presente invención es una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de LP es aquella cantidad necesaria de modo que la LP realiza su función de reducir las señales de la aterosclerosis sin causar efectos demasiado negativos en el sujeto al que la composición se administra. La cantidad exacta de LP que se usa y la composición que se administra variará de acuerdo con factores tales como las especies (humana, animal) que se traten, el tipo de sujeto (sujeto en riesgo de aterosclerosis tales como sujetos con dislipidemia, síndrome metabólico, diabetes tipo 2), el modo de administración, la frecuencia de administración así como de los otros ingredientes en la composición.

Preferiblemente, la composición comprende de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg y más preferiblemente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, de LP. Por "aproximadamente", se entiende que puede usarse una cantidad ligeramente inferior o superior de LP.

Por ejemplo, para la administración parenteral, tal como la inyección subcutánea, el individuo que se trate podría someterse a un programa de una dosis de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg y más preferiblemente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, por ejemplo 100 µg de LP, cada semana, cada mes o de cada 3 a 6 meses.

La composición puede usarse tanto para prevenir la aterosclerosis en pacientes previamente diagnosticados de aterosclerosis, pacientes con alto riesgo de padecer aterosclerosis o pacientes que presenten xantoma y en particular pacientes que presenten xantelasma o para curar la aterosclerosis en pacientes al principio de un episodio de aterosclerosis.

La invención también se refiere a productos que contienen LP como se define en la invención o sus fracciones y un segundo producto que sea diferente del primero, siendo dicho segundo producto seleccionado del grupo que consiste en fármacos anti-inflamatorios e inmunomoduladores (ácido acetilsalicílico o tiazolidinonas (glitazona), por ejemplo), como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención y/o el tratamiento de la aterosclerosis.

La invención se refiere también al uso de bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas mediante liofilización prolongada (LP) para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la aterosclerosis, como se define anteriormente.

La aplicación describe también un método para prevenir o tratar la aterosclerosis, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición que comprende LP a un paciente que padece o es susceptible de padecer aterosclerosis, como se define anteriormente.

La presente invención será además ilustrada mediante la descripción adicional y los dibujos que siguen, que se refieren a los ejemplos que ilustran la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis por el tratamiento con LP en tres modelos experimentales de la aterosclerosis en ratones.

- figura 1: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones ApoE^{-/-}. Las citoquinas incrementaron en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} bimensualmente tratados 3 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (SC; barras rayadas) como se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: ***: P < 0,001.

- 5 - figura 2: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones ApoE^{-/-}. Las citoquinas y quimioquinas reducidas en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} bimensualmente tratados 3 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (SC; barras rayadas) como se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$.
- figura 3: Las citoquinas y quimioquinas que permanecen invariables en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} bimensualmente tratados 3 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (SC; barras rayadas) cuando se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo).
- 10 - figura 4: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación en ratones ApoE^{-/-}. La unión de NF-κB (barras abiertas) y PPAR-γ (barras rayadas) a motivos específicos de ADN en extractos nucleares de células de bazo de ratones ApoE^{-/-} bimensualmente tratados 3 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (SC) cuando se compara con ratones tratados con PBS. n= 6 ratones por grupo. Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$. La LP BCG tiene efectos antiinflamatorios, como se pone de manifiesto mediante la menor translocación de NFκB y la mayor expresión de PPARγ después del tratamiento con LP BCG, comparado con PBS.
- 15 - figura 5: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones ApoE^{-/-}. Las citoquinas y quimioquinas incrementadas en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: ***: $P < 0,001$.
- 20 - figura 6: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones ApoE^{-/-}. Las citoquinas y quimioquinas reducidas en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$.
- 25 - La figura 7 ilustra citoquinas que permanecen invariables en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo).
- 30 - figura 8: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación y la inmunoregulación en ratones ApoE^{-/-}. Tres grupos de 2 extractos de esplenocitos de ratones tratados 6 veces mensualmente con PBS o LP BCG (n=6 ratones por grupo), analizados mediante transferencia Western para RORγt, T-bet, GATA3, y Foxp3. Se usó β-actina como control interno. La LP BCG inicia respuestas inmunoregulatoras incrementando T-bet (Firma Th1) y FOXP3 (Firma Treg) y decreciendo RORγt y GATA-3, respectivamente, firmas Th17 y Th2.
- 35 - figura 9: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación en ratones ApoE^{-/-}. La unión de NF-κB (barras abiertas) y PPAR-γ (barras rayadas) a motivos específicos de ADN en extractos nucleares de células de bazo de ratones ApoE^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente cuando se compara con ratones tratados con PBS (n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: ***: $P < 0,001$. La LP BCG tiene efectos antiinflamatorios, como se pone de manifiesto mediante la menor translocación de NFκB después del tratamiento con LP BCG, comparado con PBS.
- 40 - figura 10: El tratamiento con LP BCG a largo plazo indujo un perfil inmunoregulator en ratones ApoE^{-/-}. A los ratones les fueron inyectados subcutáneamente a la edad de 6, 10, 14, 18, 22, y 26 semanas 100 µg LP (n=6) o 100 µl PBS (n=6). Fueron sacrificados a la edad de 30 semanas. (A) Número absoluto de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺ (analizados por citometría de flujo) en los bazos de ratones tratados con PBS (n=6) o LP BCG (n=6) en la semana 30. (B) La unión de SP-1 en extractos nucleares esplénicos de ratones individuales tratados con PBS (n=6) o LP (n=6). Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$. La mayor expresión del factor de transcripción de SP-1 se correlaciona con la mayor producción del IL-10 encontrado en los sueros de ratones tratados con LP (Figura 5). Estos datos indican que la LP BCG inicia respuestas inmunoregulatoras activando SP-1, un importante componente de la inmunoregulación mediada por IL-10. Los ratones tratados con LP tuvieron un número significativamente mayor de células T CD4⁺FOXP3⁺ (células Treg) que los ratones tratados con PBS.
- 45 - figura 11: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones ApoE^{-/-}. El TGF-β se incrementó en muestras en sueros individuales de ratones ApoE^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP BCG inyectada subcutáneamente (barra gris) cuando se compara con los ratones tratados con PBS (barra negra; n= 6 ratones por grupo). ***: $P < 0,001$.
- 50 - figura 12: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones Ldlr^{-/-}. Las citoquinas se incrementaron en muestras en sueros individuales de ratones
- 55

Ldlr^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con los ratones tratados con PBS: **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$.

- 5 - figura 13: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina inflamatoria y quimioquina en suero en ratones Ldlr^{-/-}. Las citoquinas y quimioquinas se reducen en muestras en sueros individuales de ratones Ldlr^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con los ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo). Se indica la diferencia estadística con los ratones tratados con PBS: *: $P < 0,05$ **: $P < 0,01$ ***: $P < 0,001$.
- 10 - La figura 14 ilustra las citoquinas y quimioquinas que permanecen invariables en muestras en sueros individuales de ratones Ldlr^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP inyectada subcutáneamente (barras rayadas) cuando se compara con los ratones tratados con PBS (barras abiertas; n= 6 ratones por grupo).
- 15 - figura 15: El tratamiento con LP BCG a largo plazo modifica los niveles de citoquina en suero e induce un perfil inmunomodulador en ratones Ldlr^{-/-}. Los niveles de TGF- β se incrementaron semanalmente en muestras en sueros individuales de ratones Ldlr^{-/-} tratados mensualmente 6 veces con 100 µg de LP BCG inyectados subcutáneamente (barra gris) cuando se compara con los ratones tratados con PBS (barra negras; n= 6 ratones por grupo).
- 20 - figura 16: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación en ratones Ldlr^{-/-}. La unión de NF-κB y PPAR-γ a motivos específicos de ADN en extractos nucleares de tejidos vasculares de 2 grupos de 3 ratones (A) y de bazo individuales (B) de ratones tratados 6 veces mensualmente con PBS (barras abiertas) o LP BCG (barras rayadas; n=6 ratones por grupo). La LP BCG tiene efectos antiinflamatorios, como se pone de manifiesto mediante la menor translocación de NFκB y la mayor expresión de PPARγ en ambos órganos después del tratamiento con LP BCG, comparado con PBS. La diferencia estadística con ratones tratados con PBS se indica en (B): *: $P < 0,05$ **: $P < 0,01$. Como 2 grupos de 3 muestras fueron mostrados en (A), no se realizó análisis estadístico.
- 25 - figura 17: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación y la inmunoregulación en ratones Ldlr^{-/-}. Dos grupos de 3 extractos de esplenocitos de ratones tratados 6 veces mensualmente con PBS o LP BCG (n=6 ratones por grupo), analizados mediante transferencia Western para STAT-1, STAT-4, STAT-5b y STAT-6 no fosforilados y fosforilados. Se usó β-actina como control interno. La fosforilación de las STAT reflejó su activación. La LP BCG tiene efectos antiinflamatorios, como se pone de manifiesto por una menor fosforilación de STAT-1, STAT-4, y STAT-6. La LP BCG inicia respuestas inmunoreguladoras como se pone
- 30 de manifiesto mediante la activación de p-STAT-5b.
- 35 - figura 18: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inflamación y la inmunoregulación en ratones Ldlr^{-/-}. Dos grupos de 3 extractos de esplenocitos de ratones tratados 6 veces mensualmente con PBS o LP BCG (n=6 ratones por grupo), analizados mediante transferencia Western para RXR-α; RORγt, T-bet, GAT A3, y Foxp3 no fosforilados y fosforilados. Se usó β-actina como control interno. La LP BCG inicia respuestas inmunoreguladoras incrementando T-bet (firma Th1) y FOXP3 (firma Treg) y decreciendo RORγt y GATA-3, respectivamente las firmas Th17 y Th2. La LP BCG tiene también efectos antiinflamatorios, como se pone de manifiesto por una menor fosforilación de RXR-α.
- 40 - figura 19: La LP BCG afecta a la activación de los factores de transcripción asociados con la inmunoregulación en ratones Ldlr^{-/-}. Unión de SP-1 a su motivo de ADN específico en extractos nucleares esplénicos individuales de ratones tratados 6 veces mensualmente con PBS (barras abiertas) o LP BCG (barras rayadas; n=6 ratones por grupo). El SP-1, un importante componente de la inmunoregulación mediada por IL-10 está muy significativamente potenciado después del tratamiento con LP. Estos datos indican que LP BCG inicia respuestas inmunoreguladoras activando SP-1. Se indica la diferencia estadística con ratones tratados con PBS: ***: $P < 0,001$.
- 45 - figura 20: El tratamiento con LP indujo el reclutamiento de células dendríticas plasmocitoides (pDC). Análisis citométrico de flujo de células reclutadas a los nodos linfáticos de drenaje inguinal (DLN) de ratones Ldlr^{-/-} 4 días después de la primera inyección de PBS o LP BCG (100 µg); dentro de la población CD11c⁺, CD11c^{hi}B220^{neg} cDC (subdivisión inferior derecha) y CD11c^{low}B220^{hi} pDC (subdivisión superior izquierda). Cuatro días después de la primera inyección subcutánea de LP, fueron detectados más pDC (CD11c^{low}B220^{hi}) en ratones LP BCG comparado con ratones inyectados con PBS (15% versus 0,3% de células CD11c⁺ controladas). Por el contrario, unos pocos DC convencionales (CD11c^{hi}B220^{neg}) fueron observados en los DLN después de la inyección de LP BCG comparado con PBS (32% versus 83% de células CD11c⁺ controladas).
- 50 - figura 21: Células dendríticas plasmocitoides (pDC) promovieron células T reguladoras (Tregs). El análisis citométrico de flujo de células reclutadas a los nodos linfáticos de drenaje inguinal (DLN) de ratones Ldlr^{-/-} 4 días después de la primera inyección de PBS o LP BCG (100 µg); dentro de la población CD4⁺, CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. Cuatro días después de la primera inyección subcutánea de LP, el porcentaje de CD4⁺Foxp3⁺ Tregs en los DLN de ratones tratados con LP BCG aumentaron comparado con los ratones control (13,2% versus 5,5% de células CD4⁺ controladas).
- 55

- figura 22: El tratamiento con LP BCG a largo plazo indujo un perfil inmunoregulatorio en ratones *Ldlr*^{-/-}. Análisis citométrico de flujo de células reclutadas a las DLN inguinal 4 días después de la primera inyección de PBS o LP BCG. (A) número de pDC que expresan ICOS-L en ambos DLN inguinales. (B) número de CD4⁺CD25⁺ Tregs que expresan ICOS en ambos DLN inguinales. * *P*<0,05, ** *P*<0,01, *** *P*<0,001.
- 5 - figura 23: El tratamiento con LP BCG a largo plazo reduce el tamaño de la lesión y la inflamación en ratones *ApoE*^{-/-}. A los ratones les fueron inyectados subcutáneamente a la edad de 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas 100 µg LP (n=6) o 100 µl PBS (n=6) y fueron sacrificados a la edad de 30 semanas. (A), área transversal promedio de lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica (µm² x 1000). (B), fotomicrografías representativas de teñidos de macrófagos (células MOMA-2⁺) en los senos aórticos de ratones tratados con PBS y LP BCG. Después del tratamiento con LP BCG, el área transversal promedio de las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica fue significativamente menor comparado con el control, como fue la acumulación de macrófagos.
- 10 - La figura 24 representa el arco aórtico de ratones tratados con LP y ratones tratados con PBS y los sitios diferentes (a, b, c) donde el área de las placas de aterosclerosis fue semi-cuantificada en láminas de hematoxilina-eosina.
- figura 25: El tratamiento con LP BCG a largo plazo reduce las lesiones ateroscleróticas en ratones *Ldlr*^{-/-}. Los ratones *Ldlr*^{-/-} alimentados con dieta aterosclerótica recibieron (subcutáneamente) 100 µl de PBS o 100 µg de LP a las 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas del nacimiento. Los ratones fueron sacrificados a las 30 semanas y el espesor de la lesión promedio y el espesor aórtico fueron calculados a partir de ocho a dieciséis secciones de arco de la aorta de cada ratón. El espesor de la lesión fue analizado usando un software de análisis de imagen Leica QWin. Los resultados se expresan como la relación del espesor de la lesión/espesor de la aorta.
- 15 - figura 26: El tratamiento con LP BCG a largo plazo reduce las lesiones ateroscleróticas en ratones *Ldlr*^{-/-}. Los ratones *Ldlr*^{-/-} alimentados con dieta aterosclerótica recibieron (subcutáneamente) 100 µl de PBS o 100 µg de LP a las 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas del nacimiento. Los ratones fueron sacrificados a las 30 semanas y el promedio del área de lesión y del área aórtica total fueron calculados a partir de ocho a dieciséis secciones de arco de la aorta de cada ratón. El área de lesión fue analizada usando un software de análisis de imagen Leica QWin. Los resultados se expresan como la relación del área de lesión/área de la aorta.
- 20 - figura 27: El tratamiento con LP BCG a largo plazo reduce las lesiones ateroscleróticas en ratones *Ldlr*^{-/-}. Los ratones *Ldlr*^{-/-} alimentados con dieta aterosclerótica fueron inyectados subcutáneamente a la edad de 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas con 100 µg de LP BCG (n=6) o 100 µl de PBS (n=6) y fueron sacrificados a la edad de 30 semanas. (A), área transversal promedio de las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica (µm x 1000). (B), fotomicrografía representativa de aortas teñidas con Sudan IV. (C), tinción de macrófagos (células MOMA-2⁺), expresada como un porcentaje de área teñida respecto del área transversal lesional. (D), micrografías representativas de células MOMA-2⁺ aórticas en lesiones aórticas después del tratamiento con PBS o LP BCG. Amplificación original x 400. ** *P*<0,01.
- 25 - figura 28: El tratamiento con LP BCG reduce el tamaño de la lesión e induce una respuesta inmunoregulatoria en ratones *ApoE*^{-/-} x CD4^{dnt}βRII. A los ratones les fueron inyectados subcutáneamente a la edad de 6 y 9 semanas 100 µg de LP BCG (n=9) o 100 µl de PBS (n=8), y aortas, bazos y suero fueron recogidos a las 12 semanas. (A), área transversal promedio de lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica (µm² x 1000). (B), fotomicrografía representativa de senos aórticos después de tinción con aceite O de rojo. (C), medidas de IL-10 y TNF-α en suero individual Bio-Plex. (D), detección de Foxp3 mediante transferencia Western en extractos de esplenocitos. Cada banda representa extractos reunidos de esplenocitos a partir de 3 ratones. * *P*<0,05, *** *P*<0,001.
- 30 - figura 29: Las dosis crecientes de LP BCG no inducen efectos secundarios en ratones suizos destetados de OFI. Varias dosis de LP (0,01, 0,1, y 1 mg) y 100 µl de PBS fueron administrados a ratones OFI subcutáneamente diariamente durante 14 días (n=6 por grupo). (A), la temperatura rectal fue monitorizada 24 horas después de cada inyección. (B), el peso de los ratones cada día. (C), la unión de PPAR-γ y PPAR-α a sus motivos específicos de ADN en extractos nucleares esplénicos al final del experimento (Día 15), * *P*<0,05, ** *P*<0,01, *** *P*<0,001.
- 35 - figura 30: El tratamiento con LP no interfiere con la infección por *M. tuberculosis* o la vacunación con BCG. Fueron tratados conejos de indias con LP antes o después de la inyección con BCG o sin la inyección con BCG. Después, los conejos de indias fueron infectados con *M. tuberculosis* y fueron contadas las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de bacterias virulentas en los bazos. n=6 conejos de india por grupo.
- 40 - figura 31: El tratamiento con LP no interfiere con la vacunación de *Neisseria meningitidis*. Los ratones BALB/C fueron tratados con LP o PBS antes de la vacunación con *Neisseria meningitidis*. Dos semanas después de la última inyección de vacuna, los ratones vacunados y no vacunados fueron expuestos con 10⁷ UFC de *Neisseria meningitidis* virulenta (ip) y la bacteriemia fue medida 2, 6 y 24 horas después de la exposición. n=6 ratones por grupo. (♦) LP de 100 µg s.c. (d -21) + vacunación con *Neisseria* inactivada (d1, d8, d15). (•) PBS 100 µl s.c. (d -21) + vacunación con *Neisseria* inactivada (d1, d8, d15). (H) PBS 100 µl s.c. (d-21) sin vacunación con *Neisseria*.
- 45 - figura 32: El tratamiento con LP no modifica el curso de la infección por el virus influenza. (♦) Los ratones BALB/C fueron tratados con LP (100 µg en 100 µl) subcutáneamente (s.c.) (d -21). (©) Los ratones BALB/C fueron tratados con PBS (100 µl) subcutáneamente (s.c.) (d -21). Veintiún días más tarde, ambos grupos fueron infectados
- 50
- 55

intranasalmente con la cepa Scotland A del virus de influenza (5000 pfu), los síntomas clínicos de los ratones y el número de ratones supervivientes fueron registrados diariamente hasta el día 14.

5 - figura 33: Análisis lipídico. Los niveles de colesterol total y de triglicéridos fueron medidos en suero de ratones tratados con PBS o LP BCG. (A) ratones *Ldlr*^{-/-}; (B) ratones *ApoE*^{-/-}; y (C) ratones *ApoE*^{-/-} x *CD4dnTβRII*. Los valores se expresan como promedio ± SD (n = 4 ratones por grupo), n.s. = no significativo.

10 - figura 34: Perfiles de lipoproteína de colesterol. Análisis del tamaño de perfiles de lipoproteína a partir de suero de ratones tratados con PBS o LP BCG. Brevemente, las muestras de plasma (50 µl) de ratones fueron fraccionados en una columna HRI 0/30 Superose 6 (GE HEALTHCARE) y un Discovery BIO GFC-500 como precolumna (5 cm x 7,8 Ld.; Supelco®; SIGMA-ALDRICH), que fueron acoplados a un sistema UFLC de Prominence (SHIMADZU) y equilibrado con solución salina de Tris tamponada, pH 7,4. Fueron recogidas fracciones de 200 µl en un Foxy Jr® (TELED YNE ISCO INC.), y el colesterol total fue medido en cada fracción usando un kit colorimétrico enzimático (RANDOX LAB.). La concentración de colesterol en cada fracción (eje y) se representa frente al número de fracción de retención (eje x). (A) ratones *Ldlr*^{-/-}; (B) ratones *ApoE*^{-/-}; y (C) ratones *ApoE*^{-/-} x *CD4dnTβRII*. Las curvas muestran el promedio ± SD para ratones inmunizados con LP BCG (líneas grises oscuras) e inmunizados con PBS (líneas grises claras), n = 4 ratones por grupo. CR, remanentes de quilomicrón.

20 - figura 35: Títulos del anticuerpo frente a oxLBD después del tratamiento con LP BCG. Los anticuerpos frente a oxLBD en suero de ratones tratados con LP BCG y PBS fueron medidos mediante ELISA. (A) ratones *Ldlr*^{-/-}; (B) ratones *ApoE*^{-/-}; y (C) ratones *ApoE*^{-/-} x *CD4dnTβRII*. Las curvas muestran el promedio ± SD para ratones LP BCG inmunizados (líneas grises oscuras) y PBS inmunizados (líneas grises claras), n = 6 ratones por grupo. Brevemente, 50 µL de los antígenos (10 µg/ml en PBS pH 7,4) se añadieron a placas ELISA de 96 pocillos y se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas revestidas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con 1% gelatina (GIBCO INVITROGEN) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron lavadas e incubadas durante 2 horas adicionales con plasma de ratón y se diluyeron en solución salina tamponada con Tris (TBS)/gelatina 0,1%. Después de las etapas de lavado, los niveles de IgG total fueron medidos usando anticuerpos anti-ratón conjugados con enzima (BD BIOSCIENCES). Las placas fueron lavadas y las reacciones colorimétricas fueron desarrolladas con TMB (BD BIOSCIENCES). La absorbancia fue medida en un lector de microplacas (VersaMax, MOLECULAR DEVICES).

Ejemplo 1: Preparación de LP

30 La cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG (1173P2) eliminada mediante liofilización prolongada (LP) fue preparada como se describe previamente en la solicitud PCT internacional WO 03/049752. La preparación de LP contenía menos del 1,5 % de agua al final del procedimiento, como se determina con un colorímetro usando el método Karl-Fischer (METROHM). Veinte miligramos de LP se cultivaron en placas agar Middlebrook 7H10 (DIFCO) para confirmar la ausencia de bacterias vivas.

35 La LP fue resuspendida en manitol (5 %) a una concentración final de 1 mg/mL, fue secada por pulverización durante 72 horas bajo 0,040 mBar de presión (en esta etapa el objetivo de la liofilización es solo obtener una composición seca y finalmente resuspendida en agua destilada (concentración final de 1 mg/ml) antes de ser inyectada a los ratones.

Ejemplo 2: Evaluación del tratamiento con LP en el desarrollo de la aterosclerosis en modelos de ratones *ApoE*^{-/-} y *Ldlr*^{-/-} C57B1/6

40 1) Material y métodos

a) Modelos experimentales de inducción/prevención de la aterosclerosis

45 Se usaron ratones *ApoE*^{-/-} y *Ldlr*^{-/-} como dos modelos de tratamiento a largo plazo. Ratones machos C57B1/6 deficientes de apolipoproteína E (*ApoE*^{-/-}) y deficientes del receptor de lipoproteína de baja densidad (*Ldlr*^{-/-}) fueron alimentados en las instalaciones de cuidado de animales del campus de INRA en Jouy en Josas. Fueron distribuidos grupos de 6-7 ratones (5-6 semanas) al comienzo del experimento:

1) ratones *ApoE*^{-/-} del grupo 1 recibieron tres veces 100 µl de PBS subcutáneamente cada 10 semanas (bimensualmente) y fueron sacrificados 2 meses después de la última inyección (34 semanas de edad).

2) ratones *ApoE*^{-/-} del grupo 2 recibieron 100 µg de LP BCG (LP) subcutáneamente en los mismos intervalos que el grupo 1 y fueron sacrificados 2 meses después de la tercera inyección de LP (34 semanas de edad).

50 3) ratones *ApoE*^{-/-} del grupo 3 recibieron 100 µl de PBS subcutáneamente cada 4 semanas (6 inyecciones a la edad de 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas) y fueron sacrificados 1 mes después de la última inyección (30 semanas de edad).

4) ratones *ApoE*^{-/-} del grupo 4 recibieron 100 µg de LP BCG (LP) subcutáneamente en el mismo intervalo que el grupo 3 y fueron sacrificados 1 mes después de la sexta inyección.

5) ratones *Ldlr*^{-/-} del grupo 5 recibieron 100 µl de PBS subcutáneamente cada 4 semanas (6 inyecciones a la edad de 6, 10, 14, 18, 22 y 26 semanas) y fueron sacrificados 1 mes después de la última inyección (30 semanas de edad).

6) ratones *Ldlr*^{-/-} del grupo 6 recibieron 100 µg de LP BCG (LP) subcutáneamente en el mismo intervalo que el grupo 5 y fueron sacrificados 1 mes después de la sexta inyección (30 semanas de edad).

Fueron alimentados ratones *ApoE*^{-/-} con comida convencional mientras que los ratones *Ldlr*^{-/-} recibieron comida suplementada con lípidos (15 % de grasas) y 0,5 % de colesterol (Genestil), desde la primera inyección de LP (5-6 semanas de edad) hasta el final del experimento.

b) Análisis citométrico de flujo de células de órgano linfoide

10 Para identificar a las células Tregs y dendríticas (CD), los nodos linfáticos de drenaje inguinales (NDL) de ratones *Ldlr*^{-/-} fueron recolectados 4 días después de la primera inyección de LP BCG o PBS. Después de la digestión con colagenasa-DNasa, los nodos linfáticos de drenaje (NLD) fueron machacados en un filtro de células para extraer las células, que fueron entonces teñidas con anticuerpos frente a CD4, CD11c, B220 (BD PHARMINGEN), Fcγ3 (EBIOSCIENCES), ICOS, ICOS-L (EBIOSCIENCES), y PDCA-1 (MILTENYI BIOTEC), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se aislaron esplenocitos de ratones *ApoE*^{-/-} de la mitad de los bazos en la semana 30 y se tiñeron con anticuerpos frente a CD4 (BD PHARMINGEN) y Fcγ3 (EBIOSCIENCES). Todas las muestras se analizaron en un FACSCalibur usando el software CellQuest (BD BIOSCIENCES).

c) Detección de factores de transcripción en células del bazo y extractos aórticos

20 Las otras mitades de los bazos (grupo de 2 ratones) fueron congelados a -25°C para guardarlos durante algunos días. Las proteínas fueron extraídas de los bazos y fueron resueltas en 7,5 % de SDS-PAGE. Las bandas de proteína transferidas a las hojas de nitrocelulosa fueron probadas con anti-FOXP3 monoclonal de ratón, -T-bet, -GAT A-3, -RORγt, RXRα, p-RXRα, STAT-1, pSTAT-1, STAT-4, p-STAT-4, STAT-5b, p-STAT-5b, STAT-6, p-STAT-6 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) o anticuerpo monoclonal de ratón de β-actina (Ac- 15, ABCAM). Fueron usadas IgG anti-conejo de cabra policlonal (DAKO CYTOMATION) o anti-conejo de cabra (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), ambas conjugadas con HRP, como anticuerpos secundarios. El complejo inmune fue visualizado con un sistema de detección quimioluminiscente potenciado (AMERSHAM) y fue analizado por escáner.

30 Fueron extraídas proteínas nucleares de homogeneados de bazo o aórticos (grupo de 3 ratones) después del tratamiento del inhibidor de proteasa y fueron procesadas con los kits de ensayo del factor de transcripción NFκBp65, PPARγ PPAR-α o SP-1 TransAM™ (ACTIVE MOTIF). De acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 10 µg de extractos nucleares fueron añadidos a las placas de 96 pocillos, estando revestida cada placa con un oligonucleótido específico que contenía el sitio de unión del consenso del factor de transcripción respectivo. La unión fue expresada como densidad óptica (OD). El número de muestras o grupos tratados en cada experimento se muestra en las leyendas de la figura.

d) Análisis serológico

Fueron recogidos sueros de ratones *Ldlr*^{-/-} en la semana 30 y de ratones *ApoE*^{-/-} en la semana 30 ó 34. Los niveles de pro-citoquinas inflamatorias y quimioquinas (IL-1α, IL-1 β, IL-6, IL-13, IL-17, KC (IL-8), IL-12p40, IL-12p70, IFNγ, TNF α, MIP-1β, eotaxina) y citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) en suero fueron medidos usando el ensayo de citoquinas de Bio-Plex (BIO-RAD). La TGF-β fue medida por el kit de ELISA (EBIOSCIENCE).

40 Los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma de ratones LP BCG y tratados con PBS fueron medidos usando kits colorimétricos enzimáticos (RANDOX LAB.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los perfiles de colesterol en plasma de lipoproteína fueron examinados usando un método modificado de Okazaki et al., J. Biochem., 1981, 89, 879-887. Brevemente, fueron fraccionadas muestras de plasma (50 µl) de ratones en una columna HRI 0/30 Superose 6 (GE HEALTHCARE) y un Discovery BIO GFC-500 como precolumna (5 cm x 7,8 d.i.; Supelco®; SIGMA-ALDRICH), que fueron acoplados a un sistema UFLC de Prominence (SHIMADZU) y equilibrado con solución salina de Tris tamponada, pH 7,4. Fracciones de 200 µl fueron recogidas en un Foxy Jr® (TELEDYNE) y el colesterol total fue medido en cada fracción usando un kit colorimétrico enzimático (RANDOX LAB.).

50 Fueron medidos anticuerpos frente a oxLBD en suero de ratones LP BCG y tratados con PBS mediante ELISA. Brevemente, se incubaron toda la noche a 4°C 50 µL de los antígenos (10 µg/ml en PBS pH 7,4) y se añadieron a placas ELISA de 96 pocillos. Las placas revestidas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con gelatina al 1% (GIBCO INVITROGEN) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron lavadas e incubadas durante 2 horas adicionales con plasma de ratón y se diluyeron en solución salina tamponada con Tris (TBS)/gelatina al 0,1%. Después de las etapas de lavado, los niveles de IgG total fueron medidos usando anticuerpos anti-ratón conjugados con enzima (BD BIOSCIENCES). Las placas fueron lavadas y las reacciones colorimétricas fueron desarrolladas con TMB (BD BIOSCIENCES). La absorbancia fue medida en un lector de microplacas (VersaMax, MOLECULAR DEVICE),

e) Análisis histológico e inmunotinción de las lesiones ateroscleróticas

Fueron recogidos los corazones y aortas de ratones ApoE^{-/-} y ratones Ldlr^{-/-} tratados con LP y tratados con PBS y fueron congelados a la temperatura de corte óptima (OCT; SAKURA FINETEK). Los bloques congelados fueron mantenidos a -80°C hasta que se cortaron por criosección.

- 5 Los corazones y las aortas ascendentes de ratones ApoE^{-/-} y Ldlr^{-/-} se cortaron por criosección como se describe previamente (Nicoletti et al., J. Clin. Invest. 1998, 102, 910- 918). Fueron recogidas secciones de diez micras de espesor a los intervalos de 100 µm, comenzando por 100 µm desde el principio de las válvulas aórticas. Las secciones fueron secadas al aire y fijadas con formaldehído al 4% en PBS y acetona enfriada en hielo durante los análisis histológicos e inmunohistoquímicos, respectivamente. Las secciones fijadas con formaldehído fueron teñidas con hematoxilina y aceite O de rojo o hematoxilina-eosina (HE) y se visualizaron bajo un microscopio de luz. Las áreas de las secciones transversales de las lesiones y la aorta fueron cuantificadas usando los programas de software de análisis de imagen Leica QWin (LEICA) y Atherose™ (MICROVISION INSTRUMENTS). Las áreas absolutas de las secciones transversales de las lesiones fueron calculadas para 8 secciones de la raíz aórtica a intervalos de 100 µm. Las comparaciones entre los grupos fueron hechas usando el promedio de las 3 secciones mayores. Los arcos aórticos de ratones Ldlr^{-/-} fueron cortados en criosección. Las secciones fueron secadas al aire y fijadas con acetona enfriada en hielo y luego fueron teñidas con hematoxilina-eosina. El área de la lesión y el espesor en los tres sitios diferentes (a, b, c) del arco aórtico fueron analizados usando un software de análisis de imagen Leica QWin. Los resultados fueron expresados como la puntuación (área de la lesión) para cada sitio. Además, el espesor de la lesión promedio y la superficie y el promedio del espesor aórtico y la superficie fueron calculados a partir de ocho a dieciséis secciones de arco de la aorta de cada ratón. Los resultados fueron expresados como la relación del espesor de la lesión/espesor de la aorta, área de la lesión/área de la aorta y como área de la lesión.

Fueron fijados los arcos aórticos en formaldehído al 4 %, fueron abiertos longitudinalmente y teñidos con Sudan IV (MERCK). Las lesiones de lípidos aparecieron en rojo.

- 25 Las células inmunes fueron detectadas mediante inmuno-tinción convencional usando anticuerpos frente a MOMA-2 (macrófagos).

f) Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio ± SD. El paquete InStat del Software Graph Pad fue usado para analizar los datos, usando la prueba de t con la corrección de Welch.

30 2) Resultados

a) Citoquinas y quimioquinas en suero

- 35 En ratones ApoE^{-/-} que recibieron tanto 3 como 6 inyecciones de LP (grupos 2 y 4), los niveles en suero de la anti-citoquina inflamatoria IL-10 fueron significativamente incrementados (8 veces; figuras 1, 5 y 11). Al mismo tiempo, los niveles en suero de las citoquinas inflamatorias y quimioquinas IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, eotaxina, KC (IL-8), MIP-1β y TNF-α pero no IFN-γ fueron significativamente menores cuando se compara con los ratones tratados con PBS (figuras 1, 2, 5, 6 y 11).

Los niveles en suero de TGF-β no fueron significativamente incrementados (2,6 veces) en ratones ApoE^{-/-} tratados con LP del grupo 4 (Figura 11). Las otras citoquinas y quimioquinas analizadas (IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1α y RANTES) permanecieron invariables después del tratamiento con LP (figuras 3 y 7).

- 40 En ratones Ldlr^{-/-} que recibieron 6 inyecciones de LP (grupo 6), los niveles en suero de IL-10 fueron incrementados de manera similar a la que fue observada para ApoE^{-/-} (figura 12 y 15). Entre las citoquinas "pro -inflamatorias" y quimioquinas analizadas, IL1-β, MIP1-β, IL-13, KC (IL-8) y TNF-α fueron significativamente menores y IFN-γ fue moderadamente mayor cuando se compara con ratones no tratados (figura 13 y 15). Los niveles de TGF-β fueron 1,9 veces incrementados -aunque no significativamente- en suero de ratones Ldlr^{-/-} tratados con LP comparado con ratones tratados con PBS (figura 15). Se ha notado que el tratamiento con LP no redujo significativamente los IL-6, IL-12p40, IL-17 y eotaxina en ratones Ldlr^{-/-} mientras que estas citoquinas y quimioquinas fueron significativamente menores en ratones ApoE^{-/-} después de 3 ó 6 de tratamiento con LP. Otras citoquinas y quimioquinas permanecieron invariables (IL-5, MIP-1α, MIG; figura 14).

- 50 Estos datos indican que la administración de LP BCG a ratones ApoE^{-/-} y Ldlr^{-/-} incrementa sistemáticamente la producción de IL-10 y decrece los niveles de citoquina inflamatorias (excepto para IFN-γ).

b) Factores de transcripción en extractos de células de bazo y aórticas

En extractos nucleares de esplenocitos de ratones ApoE^{-/-} que recibieron 3 ó 6 inyecciones de LP, NFκBp65 fue significativamente menor mientras que la expresión de PPARγ fue potenciada o estabilizada (figuras 4 y 9).

En extractos esplénicos de ratones ApoE^{-/-} que recibieron 6 inyecciones de LP, la expresión de ROR γ t (un factor de transcripción que gobierna el desarrollo de Th17 (Ivanov et al., Cell, 2006, 126, 1121-1133; firma de células Th17 inflamatorias) y GATA-3 (firma de células Th2) calló y la expresión de T-bet (un factor de transcripción crítico para el desarrollo de Th1 (Szabo et al., Cell, 2000, 100, 655-669); firma de células Th1) y FOXP3 (células Treg) fue fuertemente potenciada comparado con los ratones ApoE^{-/-} tratados con PBS (figura 8). El factor de transcripción de SP-1, un importante componente de la inmunoregulación mediada por IL-10 (Chanteux et al., Respiratory Research, 2007, 8, 71-80) fue significativamente potenciado en extractos nucleares de bazo (figura 10) en correlación con los altos niveles de IL-10 encontrados en los sueros de los ratones tratados con LP. El análisis FACS de células de bazo mostró un número significativamente mayor de células CD4⁺Foxp3⁺ Treg en los ratones tratados con LP que en los ratones tratados con PBS (6 inyecciones) (figura 10).

En ratones Ldlr^{-/-}, 6 inyecciones de LP redujeron significativamente la activación de NF κ B y potenciaron la expresión de PPAR γ en extractos nucleares de esplenocitos de 6 ratones (figura 16B). Similares resultados fueron obtenidos a partir de dos extractos de tres tejidos vasculares del grupo de 3 ratones (el número de grupos fue demasiado bajo para permitir un análisis estadístico) (figura 16A).

Para activar la transcripción, el PPAR γ requiere la heterodimerización con el receptor α retinoide X (RXR α), mientras que los complejos RXR α fosforilado y p-RXR α -PPAR γ están inactivos. En correlación con la expresión de PPAR γ potenciada en extractos nucleares de esplenocitos de ratones tratados con LP, la expresión RXR α se potencia después del tratamiento con LP, asociado con un bloqueo de su fosforilación, mientras que la forma inactiva de p-RXR α fue expresada en los ratones tratados con PBS (figura 18). Además, una expresión mayor de SP-1, el factor de transcripción que se correlaciona con la producción de IL-10, fue observada después del tratamiento con LP de ratones Ldlr^{-/-} (figura 19) como se ha mencionado previamente para los ratones ApoE^{-/-} (figura 10).

Después, el efecto de LP BCG sobre los factores de transcripción que regulan el compromiso de células T fue determinado. El tratamiento con LP fue asociado con mayor T-bet y FOXP3 y menor ROR γ t y GATA-3 en extractos de esplenocitos de ratones Ldlr^{-/-} (figura 18), como se encuentra también en ratones ApoE^{-/-} (figura 8). El tratamiento con LP se correlacionó con una menor fosforilación de STAT-1, STAT-4, STAT-6, todas las firmas de las respuestas inflamatorias de Th1 y Th2. Además, STAT-4 es un importante factor que regula el desarrollo de células Th1 (Thieu et al., Immunity, 2008, 29, 679-690) y p-STAT-4 ha sido mostrado recientemente que bloquea el desarrollo de Treg (O'Malley JT et al., Immunology, 2009, 127, 587-5953). Por el contrario, p-STAT-5b, un factor de transcripción que se ha publicado que activa la respuesta de Treg y el crecimiento de células musculares lisas vasculares (VSMC) se incrementó (figura 17).

Por lo tanto, estos datos indican que LP BCG inicia respuestas inmunoregulatoras activando SP-1 y p-STAT-5b, reduciendo la expresión de los factores de transcripción que regulan la diferenciación de Th2 y Th17, e incrementando la población de Foxp3⁺ Treg. Estos hallazgos también sugieren que LP BCG tiene efectos anti-inflamatorios, como se pone de manifiesto mediante una menor fosforilación de RXR α , STAT-1, STAT-4 y STAT-6; el bloqueo de la activación de NF- κ B; y la mayor expresión de PPAR- γ .

c) Células dendríticas plasmocitoides (pDC) y células T reguladoras (Treg)

Debido a que las diversas etapas de desarrollo y los subconjuntos de células dendríticas (DC) contribuyen a la expansión y diferenciación de las células T que regulan o suprimen a otras células T inmunes (Steinman RM et al., Annu. Rev. Immunol., 2003, 21, 685-711), fue realizado el análisis de los subconjuntos DC y Treg en los DLN inguinales en ratones Ldlr^{-/-}. El tratamiento con LP indujo el reclutamiento de células dendríticas plasmocitoides (pDC). Cuatro días después de la primera inyección subcutánea de 100 μ g de LP, más DC plasmocitoides (pDC; CD11c^{low}B220^{high}) fueron detectados en los nodos linfáticos de drenaje de LP BCG comparado con ratones inyectados con PBS (15% versus 0,3% de células CD11c⁺ controladas; figura 20). En contraste, unos pocos DC convencionales (cDC; CD11c^{high}B220^{neg}) fueron observados en los DLN después de la inyección de LP BCG comparado con PBS (32% versus 83% de células CD11c⁺ controladas; figura 20). Además, de 99% a 100% de los pDC (CD11c^{low}B220^{hi}) que se albergaban en los DLN inguinales después de la inyección de LP BCG o PBS expresaron PDCA-1, un marcador de pDC de ratón (Asselin et al., J. Immunol., 2003, 171, 6466-6477).

La maduración de los pDC puede generar Treg expresando altos niveles de ligando co-estimulador inducible (ICOS-L) (Ito T, et al., J. Exp. Med., 2007, 204, 105-115). Más pDC que expresaban ICOS-L en los DLN inguinales de ratones Ldlr^{-/-} fueron detectados después de la inyección de LP BCG que después del tratamiento con PBS (8% versus 0,7% de CD11c controlados) y en número absoluto 38529 \pm 1906 versus 415 \pm 48, $P < 0,001$; Figura 22A). En paralelo, el porcentaje de CD4⁺Foxp3⁺ Treg en los DLN inguinales de ratones tratados con LP BCG aumentaron comparado con los ratones control (13,2% versus 5,5% de células CD4⁺ controladas; Figura 21). Como la expresión de ICOS se ha implicado en la reducción de la aterosclerosis (Gotsman et al., Circulation, 2006, 114, 2047-2055), fue medido el número de ICOS⁺ Tregs inducidos por LP-BCG. Las células CD4⁺Foxp3⁺ICOS⁺ fueron mucho más numerosas en el nodo linfático inguinal después de LP-BCG que después de la inyección de PBS (119091 \pm 5890 versus 22814 \pm 2626, $P < 0,001$; Figura 22B).

d) Lesiones ateroscleróticas

El efecto de LP BCG en el desarrollo de la aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} y Ldlr^{-/-} fue determinado.

Después del tratamiento de LP BCG (6 inyecciones) de ratones ApoE^{-/-}, el área transversal promedio de las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica fue significativamente menor comparado con el control (59442 ± 24695 μm² versus 92502 ± 43607 μm²; Figura 23A), como fue la acumulación de macrófagos (células MOMA-2⁺) (Figura 23B).

- 5 La administración de LP BCG a ratones Ldlr^{-/-} redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas (Tabla 1, figuras 24, 25 y 26).

La Tabla I ilustra una semi-cuantificación del área de la lesión aterosclerótica en tres sitios diferentes (a, b o c) del arco aórtico (figura 24), para cada ratón Ldlr^{-/-} del grupo tratado con PBS (6 ratones) y para cada ratón Ldlr^{-/-} del grupo tratado con LP (6 ratones). El valor promedio en cada sitio es también indicado para los grupos tratados con PBS y con LP (Tabla 1).

10

Tabla 1: Cuantificación de lesiones ateroscleróticas en diferentes sitios del arco aórtico

Ratones tratados con PBS	Área de lesión (unidades arbitrarias) en diferentes sitios del arco aórtico			Ratones tratados con LP	Área de lesión (unidades arbitrarias) en diferentes sitios del arco aórtico		
	a	b	c		a	b	c
Nº 1	3	3	ND	Nº 1	2	-	ND
Nº 2	0,5	ND	2	Nº 2	2	3	3
Nº 3	4	4	1	Nº 3	2	2	1
Nº 4	3	4	4	Nº 4	3	2	1
Nº 5	ND	4	4	Nº 5	3	2	1
Nº 6	4	3	3	Nº 6	2	1	ND
promedio	2,9	3,6	2,8	promedio	2,4	1,6	1,5

* ND: no determinado

En los ratones tratados con LP, las lesiones fueron estadísticamente menores en el sitio b (p = 0,015; prueba de Mann-Whitney).

- 15 La cuantificación del área de la lesión y el espesor en los 6 ratones Ldlr^{-/-} tratados con LP y tratados con PBS (figuras 25 y 26) demostró que el área de la lesión y el espesor fueron significativamente menores en los ratones Ldlr^{-/-} tratados con LP.

La administración de LP BCG a ratones Ldlr^{-/-} redujo el área transversal lesional en la raíz aórtica comparado con los ratones tratados con PBS (87072 ± 28079 μm² versus 204051 ± 73623 μm², P<0,01; Figura 27A) y disminuyó el área de la lesión lipídica en la preparación aórtica de cara como se muestra en la Figura 27B.

20

La inmunohistoquímica mostró menos infiltración de macrófagos MOMA2⁺ en lesiones ateroscleróticas transversales en ratones tratados con LP BCG comparado con PBS (P<0,01; Figura 27C y D), que puede también prevenir la ruptura de placa, el mayor peligro en la enfermedad aterosclerótica.

e) Perfiles lipídicos y títulos de anticuerpo frente a LBD oxidadas (oxLBD)

- 25 Permanecieron invariables los perfiles de colesterol en suero, triglicéridos y colesterol lipídico después del tratamiento con LP BCG (Figuras 33 y 34).

Además, los niveles de anticuerpos frente al oxLBD en suero no difirieron entre los ratones tratados con LP BCG y PBS, sugiriendo que la protección con LP BCG es independiente del antígeno específico de la aterosclerosis (Figura 35).

30 **Ejemplo 3: Evaluación del tratamiento con LP BCG en el desarrollo de la aterosclerosis en modelos de ratones ApoE^{-/-} x CD4dnTβRII**

1) Material y Métodos

35 Se usaron ratones ApoE^{-/-} x CD4dnTβRII hembra en la línea de fondo de C57BL/6J, que expresa el receptor II de TGF-β dominante-negativo bajo el promotor de CD4 (Robertson et al., J. Clin. Invest, 2003, 112, 1342-1350), como un modelo a corto plazo de la aterosclerosis. Fueron generados y albergados en las instalaciones de reproducción en el Hospital de la Universidad de Karolinska con permiso del Comité de Ética Regional del Condado de Estocolmo.

Estos ratones recibieron 2 inyecciones subcutáneas en la base de la cola con 100 µl de PBS o 100 µg de LP BCG a la edad de 6 y 9 semanas. Fueron alimentados con comida estándar y sacrificados a la edad de las 12 semanas. El análisis del factor de transcripción de citoquina y los estudios inmunohistoquímicos fueron realizados como se describe en el ejemplo 2.

5 2) Resultados

El TGF-β puede ser producido por Treg y reduce el desarrollo de la aterosclerosis inhibiendo la activación de células T (Gojova et al., Blood, 2003, 102, 4052-4058; Robertson et al., J. Clin. Invest, 2003, 112, 1342-1350; Ait-Oufella et al., Nat. Med. 2006, 12, 178-180). Como tendencia, fueron observados niveles mayores de TGF-β en el suero de ratones tratados con LP BCG (Figuras 11 y 15) y fue examinado el efecto de LP BCG en ratones ApoE^{-/-} x CD4dnTβRII.

A pesar del tratamiento a corto plazo con LP BCG, el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica fue reducido en un 30% comparado con PBS (193600 ± 85948 µm² versus 278086 ± 87089 µm², P<0,05; Figura 28A, B).

En modelos convencionales de la aterosclerosis (Ldlr^{-/-} y ApoE^{-/-}) LP BCG incrementa respectivamente de 4 a 8 veces la producción de IL-10 y 16 veces en ratones LP BCG- ApoE^{-/-} x CD4dnTβRII versus ratones no tratados (P < 0,001; Figura 28C). Los niveles de TNF-α en suero disminuyeron ligeramente en ratones tratados con LP BCG comparado con ratones tratados con PBS (Figura 28C), mientras que los niveles de IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-13, y IL- 17 en suero no difirieron entre los 2 grupos. Notablemente, el LP BCG potenció la expresión de proteína Foxp3 en extractos de esplenocitos de ratones ApoE^{-/-} x CD4dnTβRII (Figura 28D).

Estos resultados sugieren que LP BCG reduce la aterosclerosis promocionando la expansión de Treg y la producción de IL-10 en ausencia de la señalización de TGF-β.

Ejemplo 4: El tratamiento con LP BCG no tiene efectos secundarios toxicológicos medibles

1) Materiales y métodos

Fueron albergados ratones OFI Swiss hembra, que se usan típicamente en estudios toxicológicos en la unidad de experimentación animal del Instituto Pasteur y les fueron inyectados durante 14 días consecutivos 100 µl de PBS o 0,01, 0,1 ó 1 mg de LP BCG (10 ratones por grupo). El peso corporal y la temperatura rectal fueron medidos cada día, 24 horas después de cada inyección, como se describe previamente (Lagranderie et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2008, 121, 471-478). Veinticuatro horas después de la última inyección, los ratones fueron sacrificados y los bazo fueron recuperados para las medidas de PPAR-γ nuclear y PPAR-α como se describe en el ejemplo 2.

30 2) Resultados

Múltiples inyecciones de LP no inducen efectos secundarios medibles

Los efectos secundarios del tratamiento repetido con LP BCG fueron evaluados en ratones suizos destetados OFI que son altamente diversos en un nivel de población y a menudo usados en estudios toxicológicos. Después de 14 inyecciones consecutivas de varias dosis de LP BCG (0,01, 0,1, 1 mg), cuando se compara con ratones tratados, con PBS no fue observado ningún cambio de la temperatura rectal (Figura 29A). El peso corporal de ratones tratados con PBS y LP BCG se incrementó de modo similar (de 6% a 7%) a partir de los días de 0 a 14 (Figura 29B).

Finalmente, los inventores también mostraron que el tratamiento con LP BCG potenció la expresión de PPARγ sin afectar a la expresión de PPARα. De hecho, la combinación de agonistas PPAR-γ (usados como sensibilizadores de insulina en pacientes diabéticos que tienen alto riesgo en la enfermedad cardiovascular) y de agonistas de PPAR-α (usados para tratar la dislipidemia) potenció la aterosclerosis en ApoE^{-/-} (Calkin et al., Atherosclerosis, 2007, 195, 17-22) e indujo acontecimientos cardiovasculares mayores adversos en seres humanos (Nissen et al., JAMA, 2005, 294, 2581-2586).

Por lo tanto, la expresión de dos isoformas de PPAR (α y γ) fue medida en extractos de esplenocitos a partir de ratones OFI Swiss que recibieron dosis crecientes de LP BCG durante 14 días consecutivos. Comparado con los ratones inyectados con PBS, la expresión de PPAR-γ se incrementó después de la inyección de LP BCG dependientemente de la dosis, mientras que los niveles de PPAR-α permanecieron idénticos, incluso a las mayores dosis de LP BCG (Figura 29C). Que LP BCG sea un inductor selectivo de PPAR-γ y que no induzca la activación de PPAR-α es una ventaja, apoyando su potencial para el uso clínico en seres humanos.

Ejemplo 5: El tratamiento con LP no interfiere con las infecciones de *M. tuberculosis*, *Leishmania major* o el virus de la gripe o impiden la vacunación de BCG o Neisseria

Finalmente, los efectos de LP BCG en la capacidad de defensa del huésped fueron evaluados

a) Infección por *M. tuberculosis* y vacunación de BCG

A conejillos de indias, una especie más susceptible frente a *M. tuberculosis* que los ratones, les fueron inyectados:

- Grupo 1: PBS (100 µl) el día 0 (control)
- Grupo 2: BCG (10⁶ unidades formadoras de colonia (UFC) en 100 µl de PBS) el día 0
- Grupo 3: BCG (10⁶ unidades formadoras de colonia (UFC) en 100 µl de PBS) el día 42

5 - Grupo 4: LP ((100 µg) en 100µl de PBS) el día 0

- Grupo 5: LP ((100 µg) en 100 µl de PBS) el día 0 y BCG (10⁶ unidades formadoras de colonia (UFC) en 100 µl de PBS) el día 42

- Grupo 6: BCG (10⁶ unidades formadoras de colonia (UFC) en 100 µl de PBS) el día 0 y LP ((100 µg) en 100µl de PBS) el día 42

10 El día 80, todos los grupos (n=6 conejillos de indias por grupo) fueron expuestos a *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv; 5x10⁵ UFC). Los conejos de india fueron sacrificados el día 122. Los bazos fueron recogidos y homogenizados. Las diluciones apropiadas para los bazos homogenizados fueron colocados en placas en medio agar 7H10 de Middlebrook (DIFCO). Las placas se incubaron a 37°C durante un mes y fueron contadas las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de las bacterias virulentas.

15 El tratamiento con LP, antes o después de la vacunación de BCG o sin vacunación de BCG, no respondió a la infección por *M. tuberculosis* ni impidió la vacunación con BCG (Figura 30).

b) Ensayo de *Leishmania major*

20 Les fue inyectado a ratones BALB/c (ratones no sanos) y ratones C57B1/6 (ratones sanos), 8 por grupo, (Día 0) en la base de la cola: 100 µl de PBS o LP (100 µg) en 100µl de PBS. El día 45, recibieron de 10 a 20 parásitos de *Leishmania major* viables en 10 µl, en la oreja derecha.

Las inflamaciones locales fueron observadas y medidas durante 6 meses: no fueron observadas diferencias entre grupos tratados con PBS y LP.

Las lesiones metastásicas fueron registradas el día 160.

25 En el grupo tratado con PBS, todos los ratones (excepto uno) tuvieron lesiones de pequeñas a medias locales: 5 tuvieron la cola normal, 1 con una pequeña lesión en la base de la cola y 2 habían perdido su cola y tenían lesión en las patas traseras.

30 En el grupo tratado con LP, todos los ratones tuvieron lesiones de pequeñas a medias locales: 7 conservaron su cola, 2 con una pequeña lesión en la base de la cola y 1 había perdido su cola, con lesiones en ambas patas traseras. No fueron observadas diferencias (lesiones similares) entre ratones BALB/c de grupos tratados con PBS y LP (ratones no sanos). No fueron observadas diferencias (ausencia de lesión en todos los ratones) entre ratones C57B1/6 inyectados con PBS y LP (ratones sanos).

Estos resultados que muestran que el tratamiento con LP no responde a los ratones frente a la infección por *Leishmania major* indican que LP no interfiere con la infección del patógeno.

c) Vacunación de *Neisseria*

35 Un grupo de ratones BALB/c fue tratado subcutáneamente con 100 µg de LP en 100µl, los otros dos grupos recibieron 100 µl de PBS (n=6 ratones por grupo). Veintiún días más tarde, el grupo tratado con LP y uno del grupo tratado con PBS fueron vacunados con *Nesseiria meningitidis* inactivada por calor (3 dosis a un intervalo de una semana). El segundo grupo de ratones inyectados con PBS no fue vacunado (control). Dos semanas después de la última inyección de vacuna, los ratones vacunados y no vacunados fueron expuestos con 10⁷ UFC de *Neisseria meningitidis* virulenta (ip) y la bacteriemia fue medida 2, 6 y 24 horas después de la exposición. El tratamiento con LP no modificó el efecto protector de la vacunación (figura 31).

d) Infección del virus de la gripe

45 Un grupo de ratones BALB/c fue tratado subcutáneamente con 100 µg de LP en 100 µl, el otro grupo recibió 100 µl de PBS. Veintiún días más tarde, ambos grupos fueron infectados intranasalmente con la cepa Scotland A del virus de la gripe (5000 pfu), los síntomas clínicos de los ratones y el número de ratones supervivientes fueron registrados diariamente durante 14 días. No se encontraron diferencias entre los grupos tratados con LP y PBS (figura 32), indicando que el tratamiento con LP no modifica el curso de la infección por el virus de la gripe.

50 Estos datos demuestran que, a pesar de su efecto inmunoregulador, el LP BCG no atenuó la protección que fue conferida por las vacunas frente a *Mycobacterium tuberculosis* en conejos de india, *Neisseria meningitidis* en ratones (infecciones que inducen respuestas inmunes mediadas por Th1 y Th2, respectivamente), ni exacerbó la infección

por infecciones de *Mycobacterium tuberculosis* en conejos de india y el virus de la gripe o *Leishmania major* en ratones. Por tanto, LP BCG no causa ningún efecto medible adverso en dos especies animales, en diferentes cepas de ratón, ni cuando se administra a altas dosis.

Conclusiones de los ejemplos 1 a 5

- 5 Los presentes estudios demuestran que LP BCG ejerce efectos protectores frente al desarrollo de la aterosclerosis en 3 modelos de ratón distintos. LP BCG elicidó simultáneamente: 1) un efecto inmunoregulador a través de la producción de IL-10 y la expansión de Treg, 2) una inhibición de la activación de NF- κ B, y 3) un incremento en PPAR- γ sin alterar los niveles de PPAR- α . LP BCG no tuvo efectos secundarios medibles en este estudio y, a pesar de su actividad inmunoreguladora, no atenuó la protección conferida por las vacunas que generan respuestas inmunes de Th1 y Th2, ni exacerbó la infección por *M. tuberculosis*.

10 En todos los modelos, LP BCG redujo significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas e indujo la producción de IL-10. Además, en ratones *Ldlr*^{-/-}, el tratamiento con LP BCG incrementó el número de células dendríticas plasmocitoides (pDC) y *Foxp3*⁺ Treg en los nodos linfáticos de drenaje poco tiempo después de la inyección. Al final del experimento, la acumulación de Treg en el bazo disminuyó los niveles en suero de procitoquinas inflamatorias, redujo el NF- κ B e incrementó la expresión de PPAR- γ en el bazo y los extractos vasculares nucleares fueron observados en ratones *Ldlr*^{-/-}. Los niveles en suero elevados de IL-10 en ratones *Ldlr*^{-/-} tratados con LP BCG fueron acompañados por la mayor expresión de factores de transcripción que gobiernan la activación de IL-10 (SP-1 y p-STAT5b) en extractos de bazo, apoyando la noción de que IL-10 media la ateroprotección. Además de potenciar la señalización de IL-10, el tratamiento a largo plazo con LP BCG en ratones *Ldlr*^{-/-} y *ApoE*^{-/-} disminuyó la mayor parte de las citoquinas inflamatorias que los inventores analizaron, excepto IFN- γ . La reducción concomitante en NF- κ B nuclear y el aumento de PPAR γ en ratones *Ldlr*^{-/-}, asociados a niveles menores de RXR- α fosforilados, sugieren que LP BCG inhibe fuertemente el estado inflamatorio. El perfil de expresión de los factores de transcripción y las citoquinas reflejó la desregulación de la diferenciación de Th2 por LP BCG, como se pone de manifiesto mediante los menores niveles en suero de IL-13 y disminuyeron GATA3 y p-STAT-6 en el bazo. El modelo fue menos evidente con respecto al brazo de Th1. De hecho, LP BCG provocó niveles mayores de IFN- γ , la firma de la citoquina Th1, en el suero de ratones *Ldlr*^{-/-} y *ApoE*^{-/-}, y potenció, en extractos celulares de bazo, la expresión de T-bet, un factor crítico de la transcripción para el desarrollo de Th1. Sin embargo, LP BCG disminuyó la fosforilación de STAT-4, otro importante factor que regula el desarrollo de células Th1. Como p-STAT-4 ha sido mostrado recientemente que muestra que impide el desarrollo de Treg, la reducción de p-STAT-4 inducido por LP BCG benefició potencialmente la expansión de Treg en este estudio. Finalmente, la función de las células Th17 fue examinada estudiando ROR γ t, un factor de transcripción que gobierna el desarrollo de las células Th17. Los niveles de ROR γ t fueron menores después del tratamiento con LP BCG en ratones *Ldlr*^{-/-} y *ApoE*^{-/-}, concomitante con los menores niveles de IL-17 en el último modelo. La modulación parcial del brazo de Th1 de la inmunidad asociada a perfiles menores de Th17 y más fuertes de Treg puede ser suficiente para proteger frente a la aterosclerosis mientras se mantiene una inmunocompetencia eficaz del huésped, como se atestigua por la defensa inmune inalterada frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Neisseria meningitidis* en ratones tratados con LP BCG. El perfil inflamatorio sistemático modulado en los ratones tratados con LP BCG también fue asociado a una menor acumulación local de macrófagos MOMA⁺ en las lesiones (Figuras 23B, 27C y 27D), lo que también puede prevenir la ruptura de las placas, el mayor peligro en la enfermedad aterosclerótica. Después de la inmunización con LP BCG, no fue observada ninguna evidencia para la inmunodepresión como se evalúa por la reactividad frente a *M. tuberculosis* (protección mediada por Th1) o *N. meningitidis* (protección mediada por Th2). El mantenimiento de la inmunocompetencia frente a infecciones después del tratamiento con LP BCG sugirió que es un agente terapéutico tolerable en seres humanos. Finalmente, la LP BCG es un inductor selectivo de PPAR- γ y no induce la activación de PPAR- α , lo que es una ventaja, apoyando su potencial para su uso clínico. En conclusión, la LP BCG es un candidato prometedor como preparación inmunoterapéutica para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende bacterias de *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas mediante liofilización prolongada, que no son desnaturalizadas y que tienen proteínas cuya estructura primaria se preserva para su uso en la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis.
- 5 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas bacterias *Mycobacterium bovis* BCG consisten en bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas y no desnaturalizadas que contienen menos del 1,5 % de agua.
3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg de bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas mediante liofilización prolongada.
- 10 4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, la cual comprende de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg de bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas mediante liofilización prolongada.
5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, la cual comprende una dosis unitaria de 100 µg de bacterias *Mycobacterium bovis* BCG eliminadas mediante liofilización prolongada, siendo pretendidas dichas dosis unitarias para la administración subcutánea cada semana, cada mes o de cada 3 a 6 meses.
- 15 6. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dichas bacterias son obtenibles mediante un procedimiento que comprende:
 - (i) recolectar un cultivo de células bacterianas vivas de *Mycobacterium bovis* BCG,
 - (ii) congelar las células bacterianas de *Mycobacterium bovis* BCG en agua o en una solución acuosa de una sal,
 - 20 (iii) eliminar las células bacterianas de *Mycobacterium bovis* BCG congeladas secándolas en un liofilizador, durante un tiempo suficiente para eliminar al menos el 98,5% de agua, y
 - (iv) recolectar las células bacterianas eliminadas de *Mycobacterium bovis* BCG secadas por congelación prolongada.
- 25 7. Los productos que contienen una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos otro producto seleccionado a partir del grupo que consiste en fármacos anti-inflamatorios e inmunomoduladores, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis.

EFD 100µg sc 3 veces a un intervalo de 10 semanas

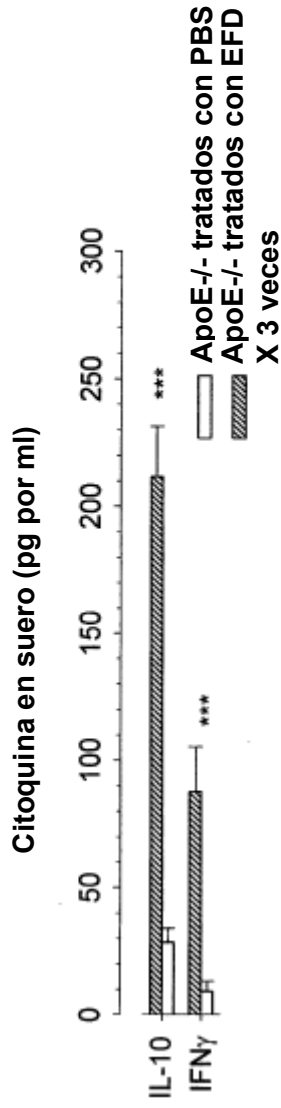


Figura 1

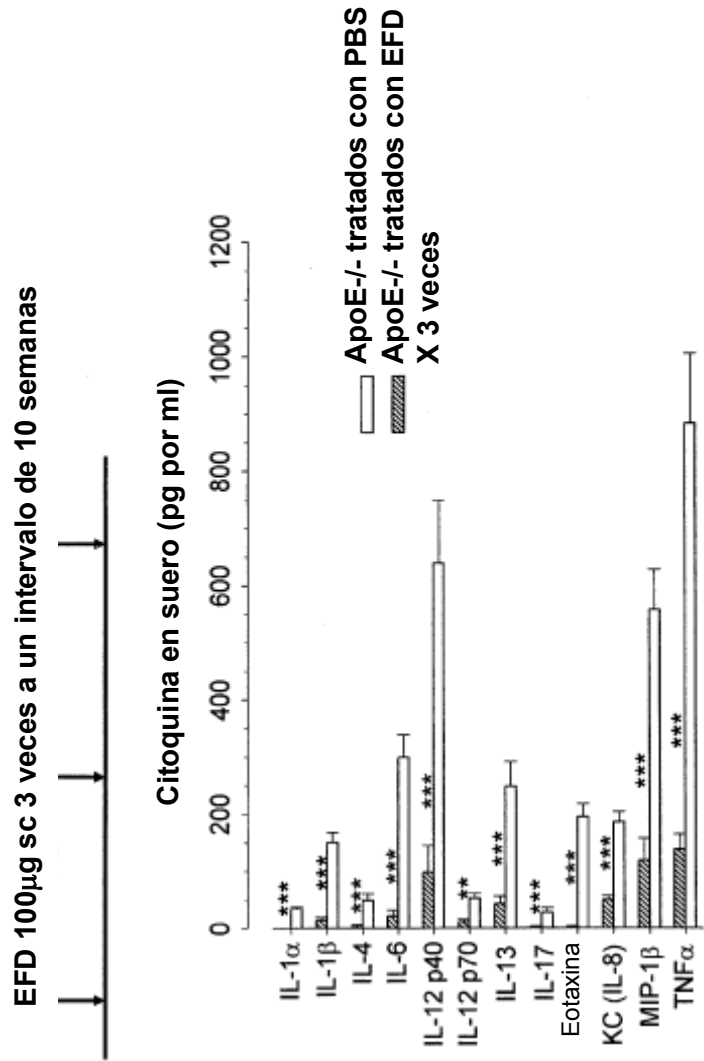
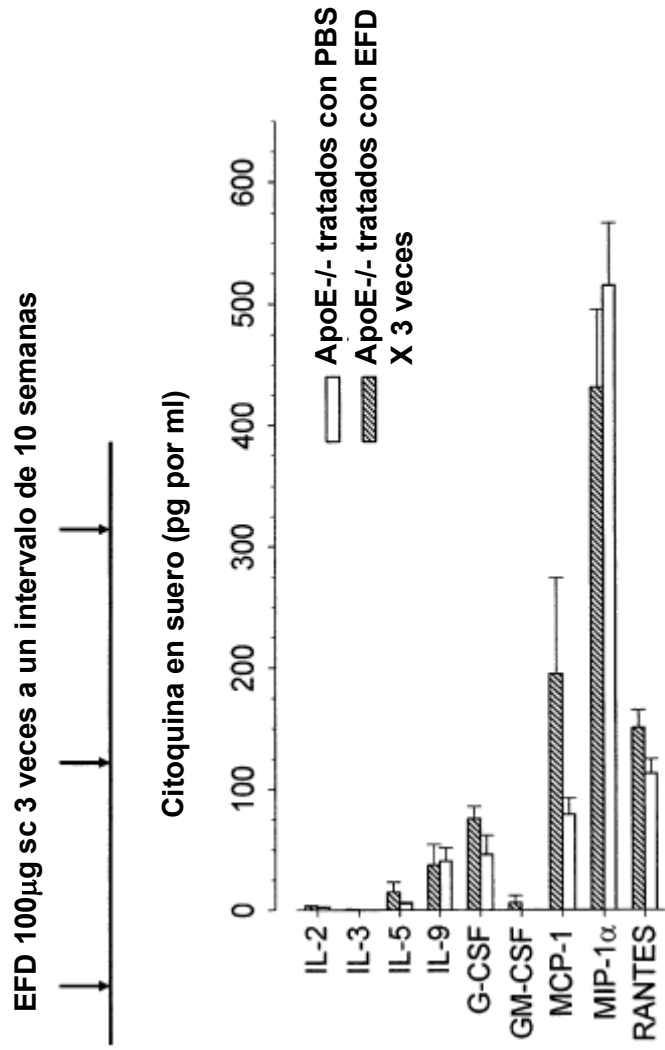


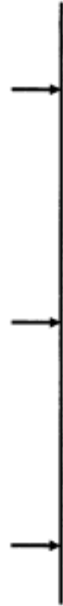
Figura 2



Estadísticamente no significativo para citoquinas

Figura 3

EFD 100µg sc 3 veces a un intervalo de 10 semanas



Factores de transcripción en extractos nucleares de bazo de ApoE^{-/-} (O.D.)

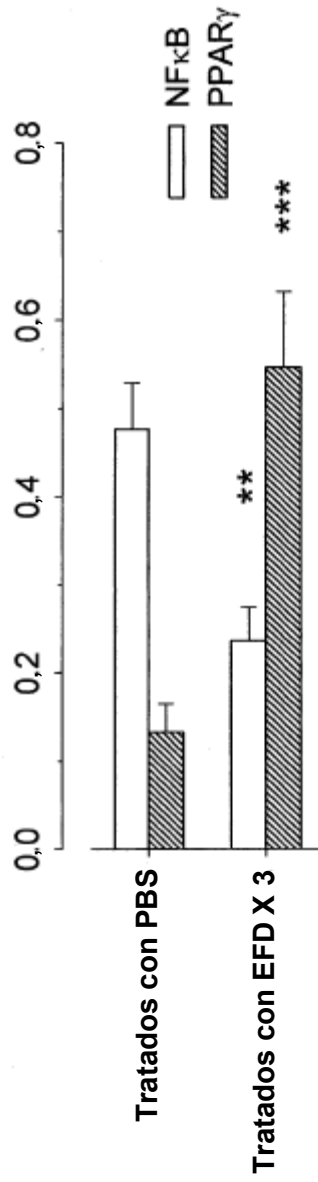


Figura 4

EFD 100µg sc mensualmente (X6) ApoE^{-/-}

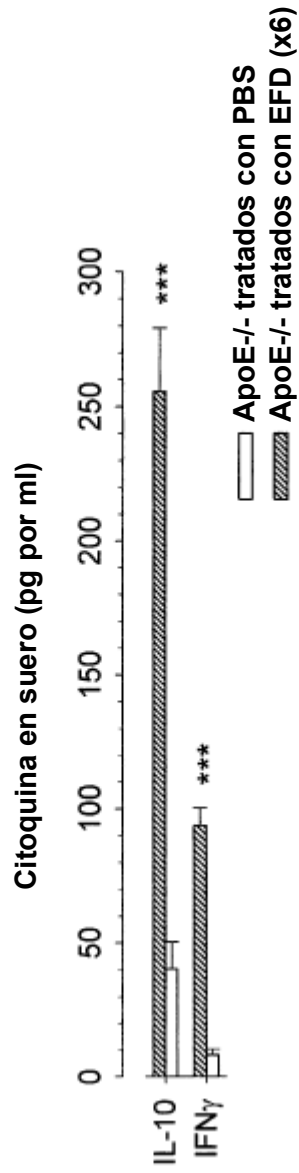


Figura 5

EFD 100µg sc mensualmente (X6) ApoE^{-/-}

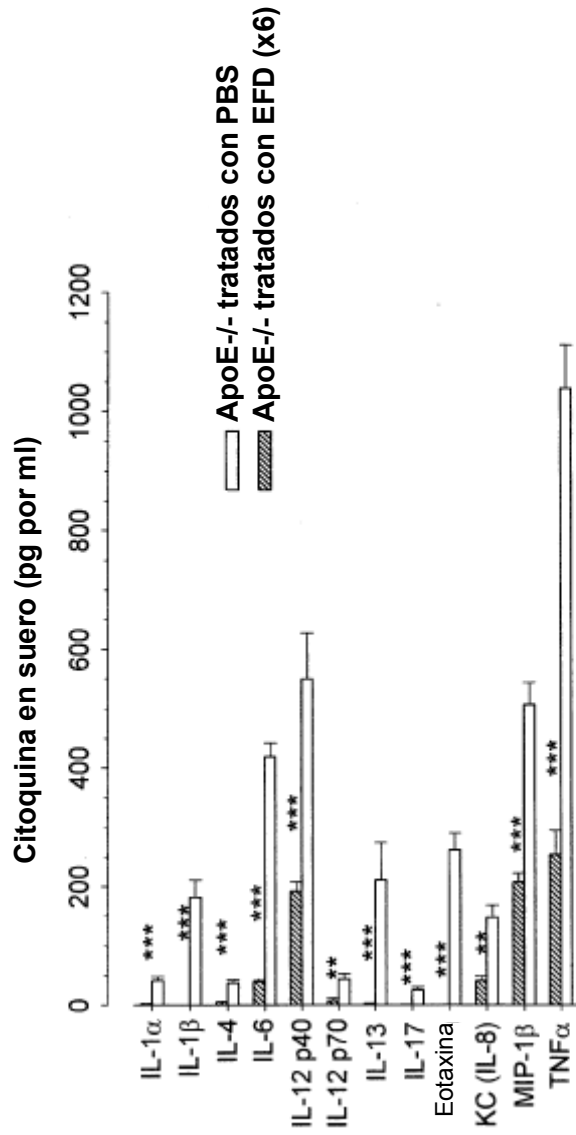
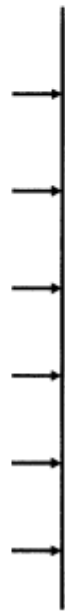


Figura 6

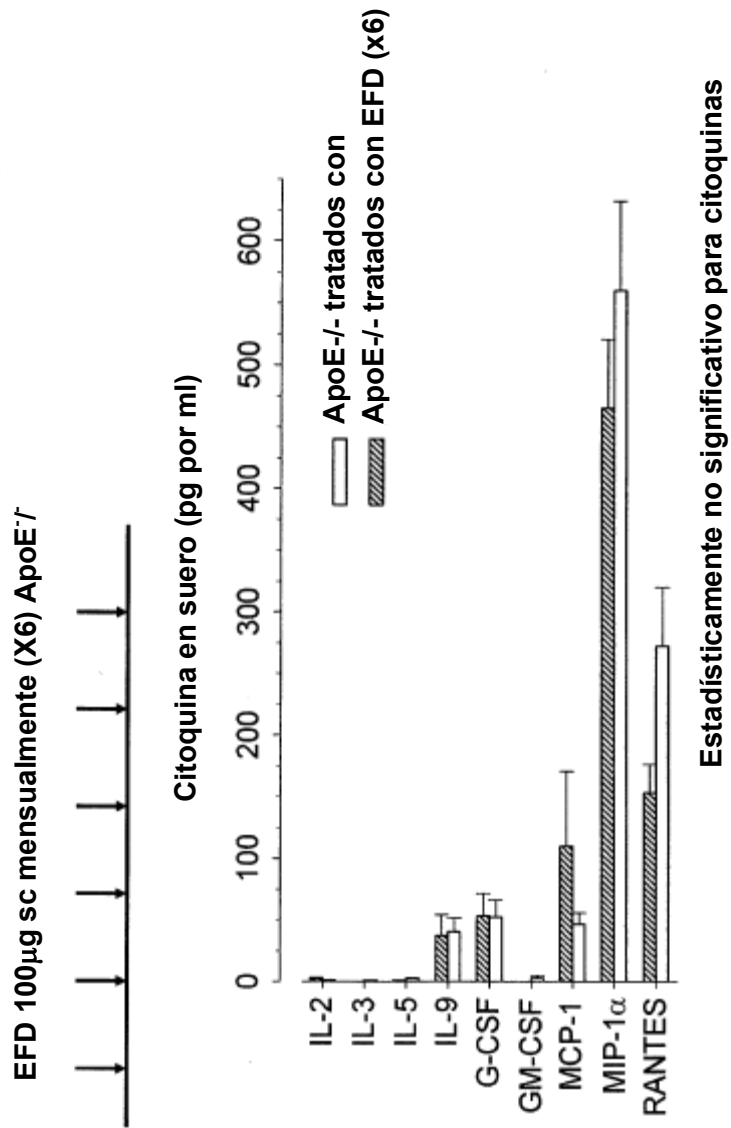


Figura 7

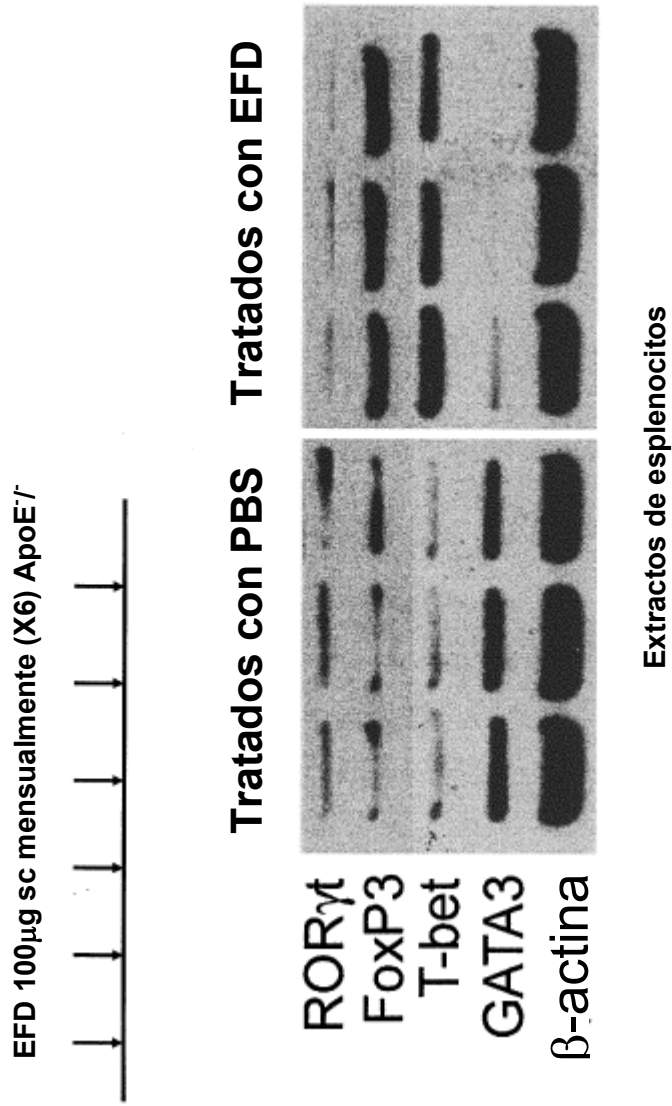


Figura 8

EFD 100µg sc mensualmente (X6) ApoE^{-/-}



Factores de transcripción en extractos nucleares de bazo de ApoE^{-/-} (O.D.)

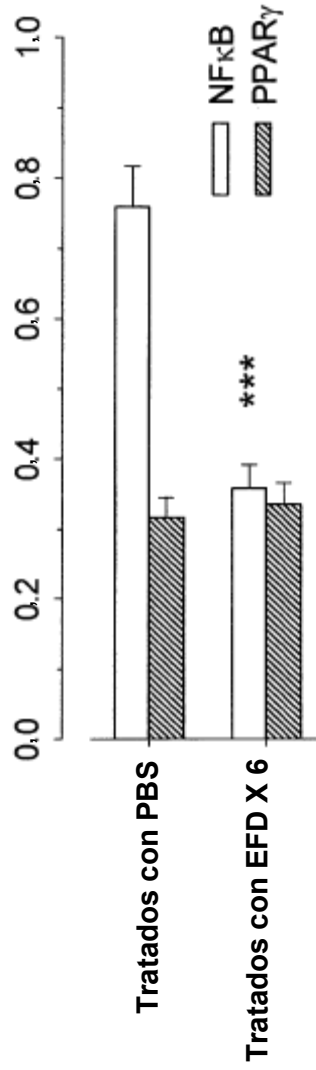


Figura 9

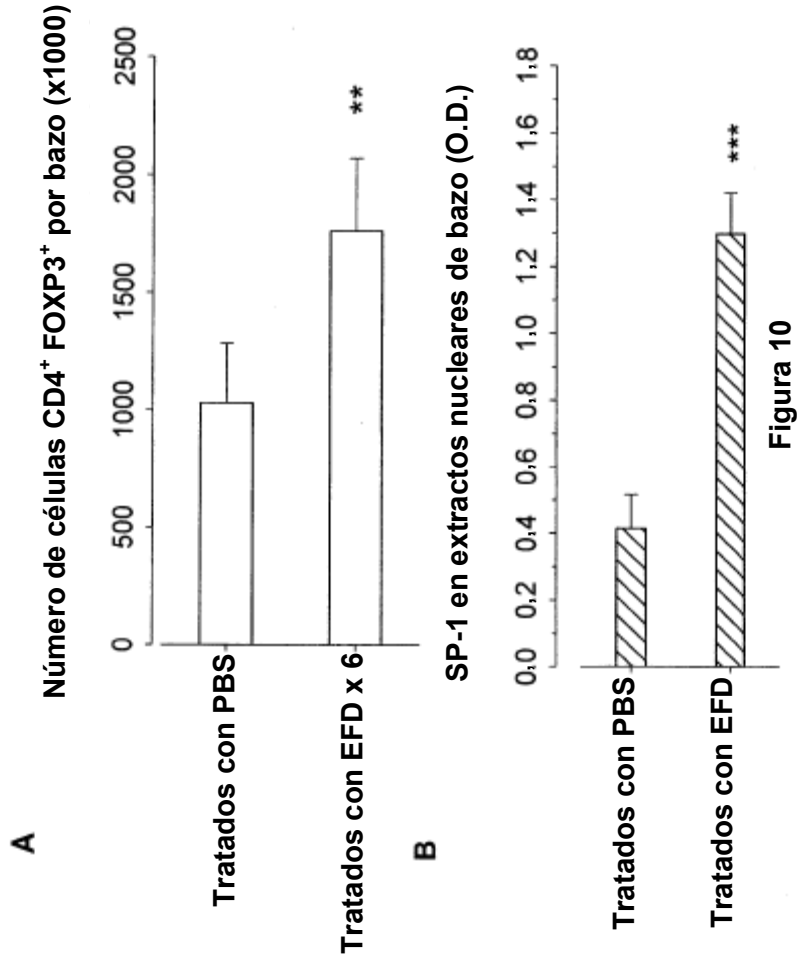


Figura 10

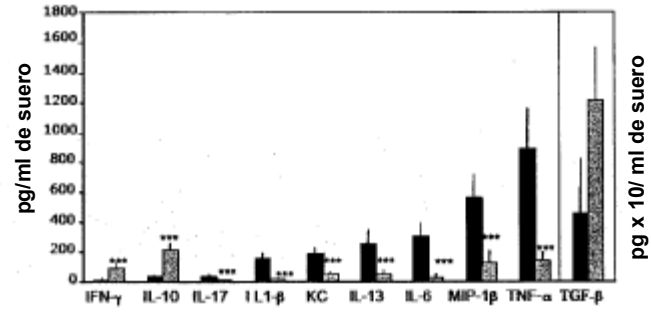


Figura 11

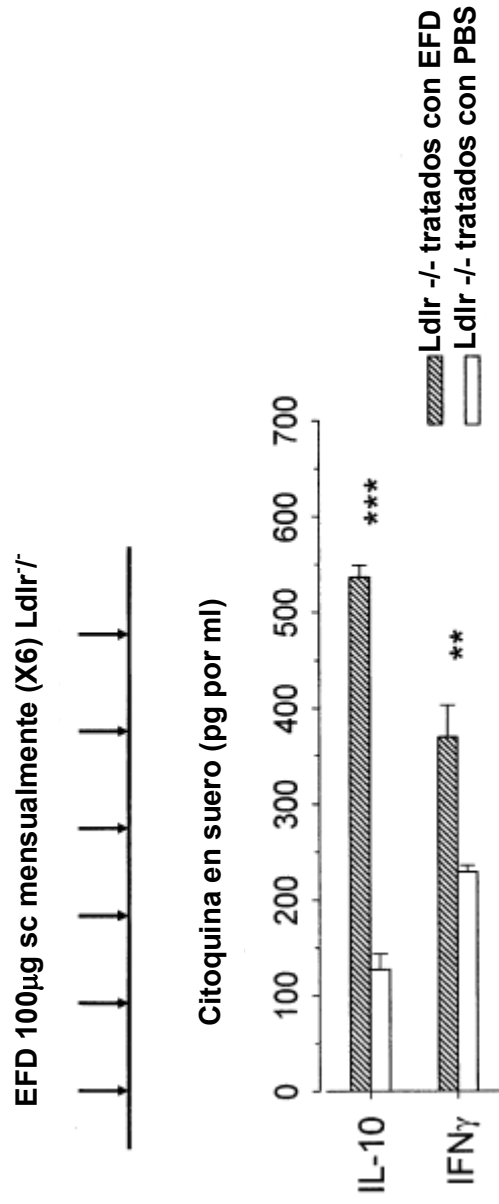


Figura 12

EFD 100µg sc mensualmente (X6) Ldlr^{-/-}

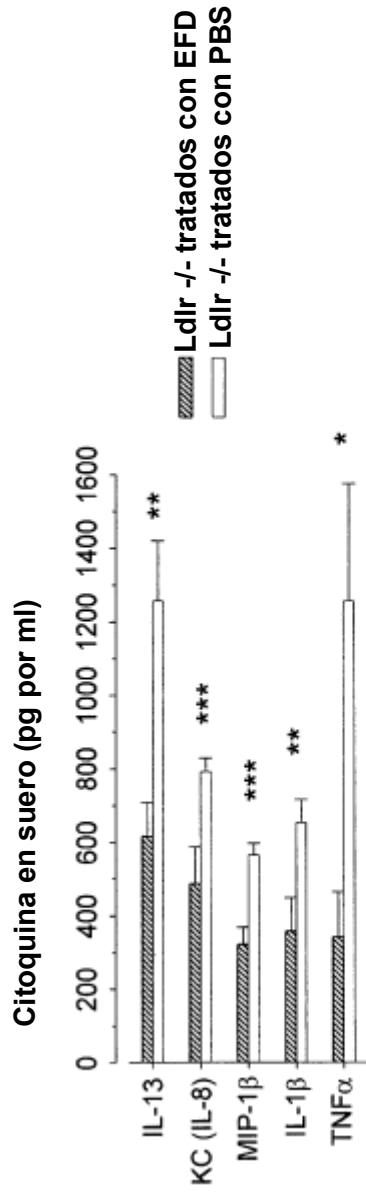
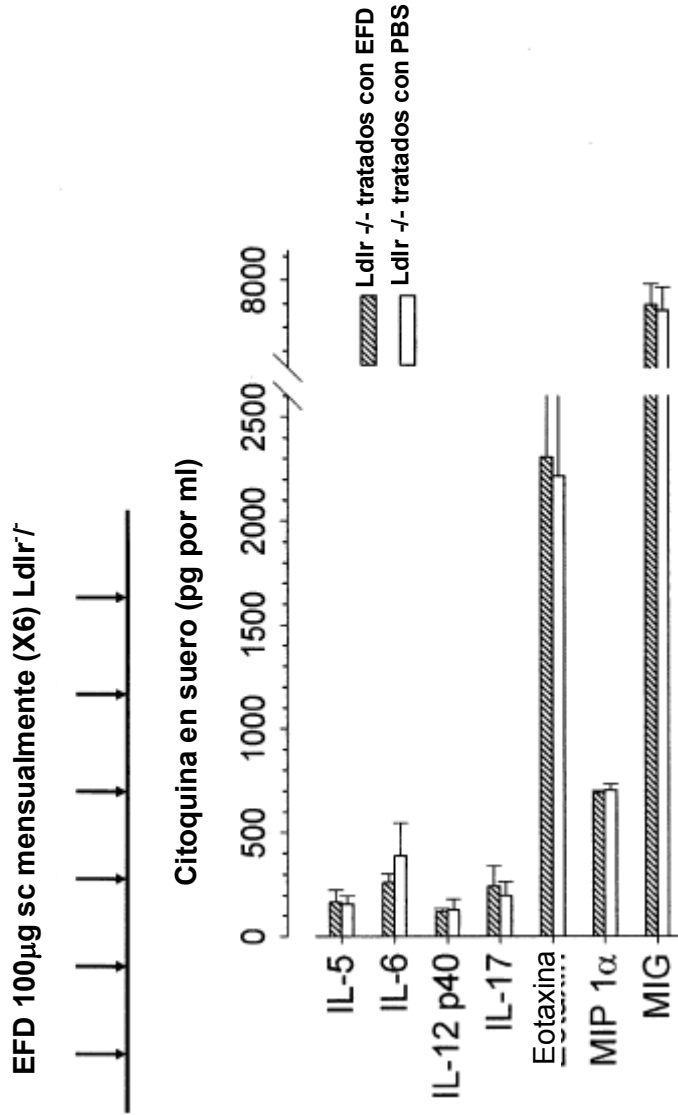


Figura 13



Estadísticamente no significativo para citoquinas
Figura 14

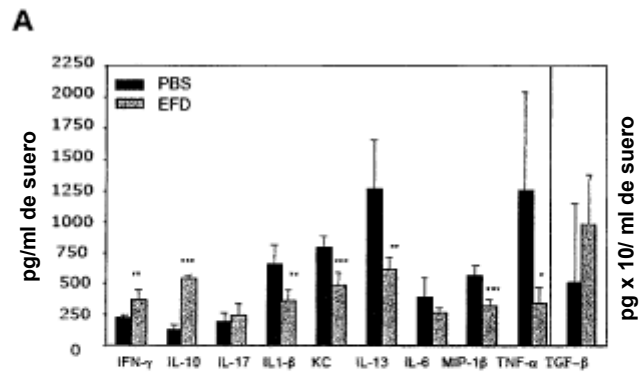
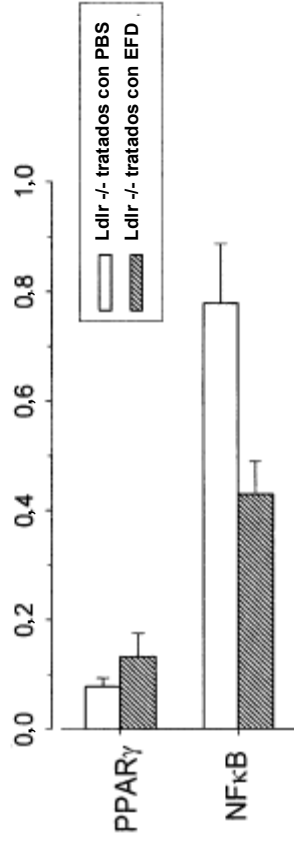


Figura 15

A Factor de transcripción en extractos nucleares de tejidos vasculares (O.D.)



B Factor de transcripción en extractos nucleares de bazo (O.D.)

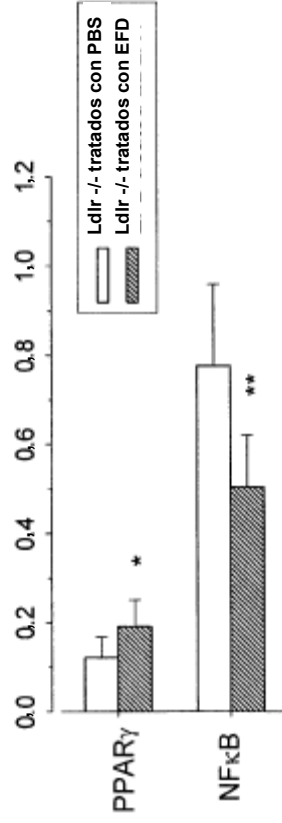
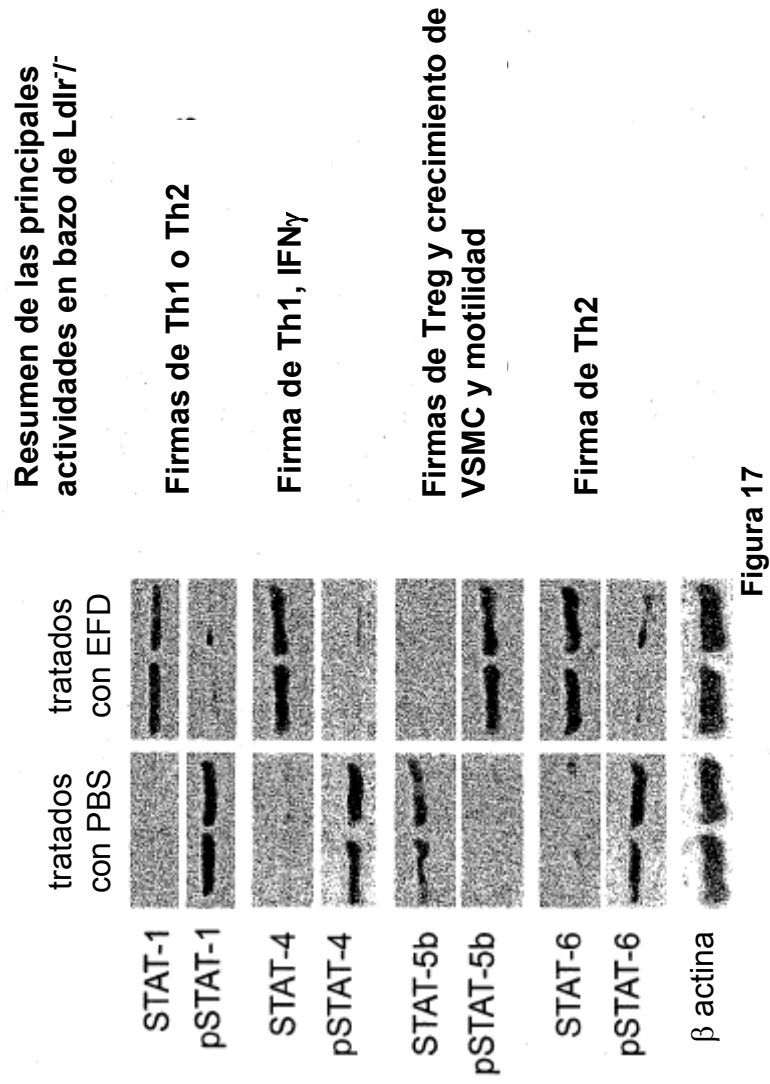


Figura 16



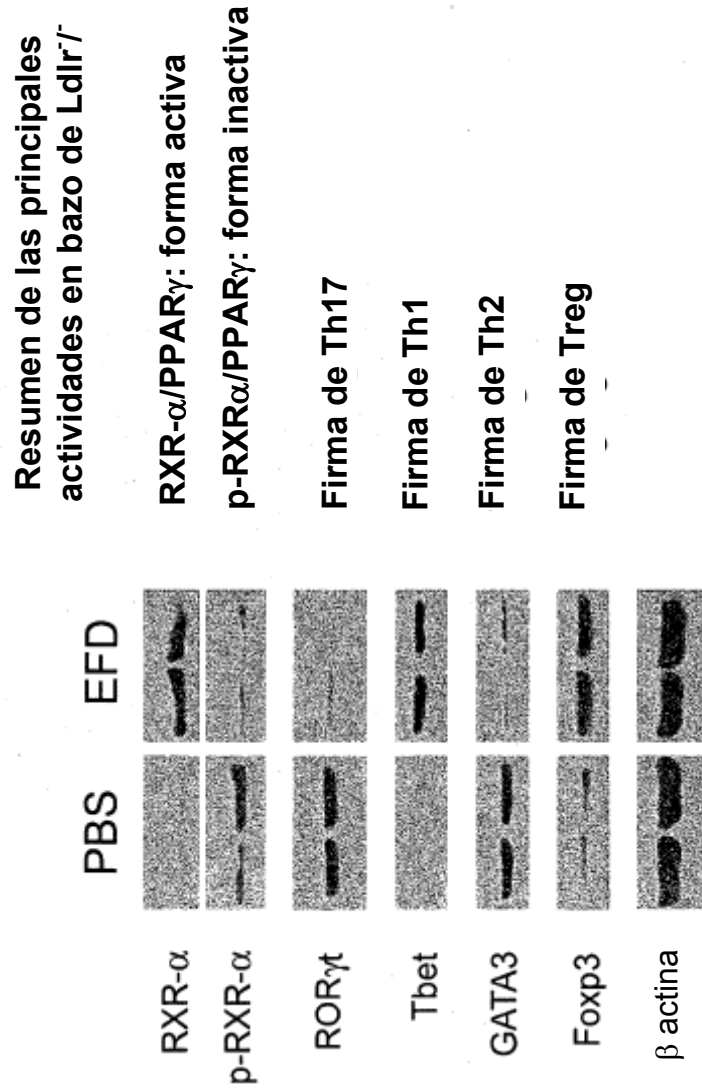


Figura 18

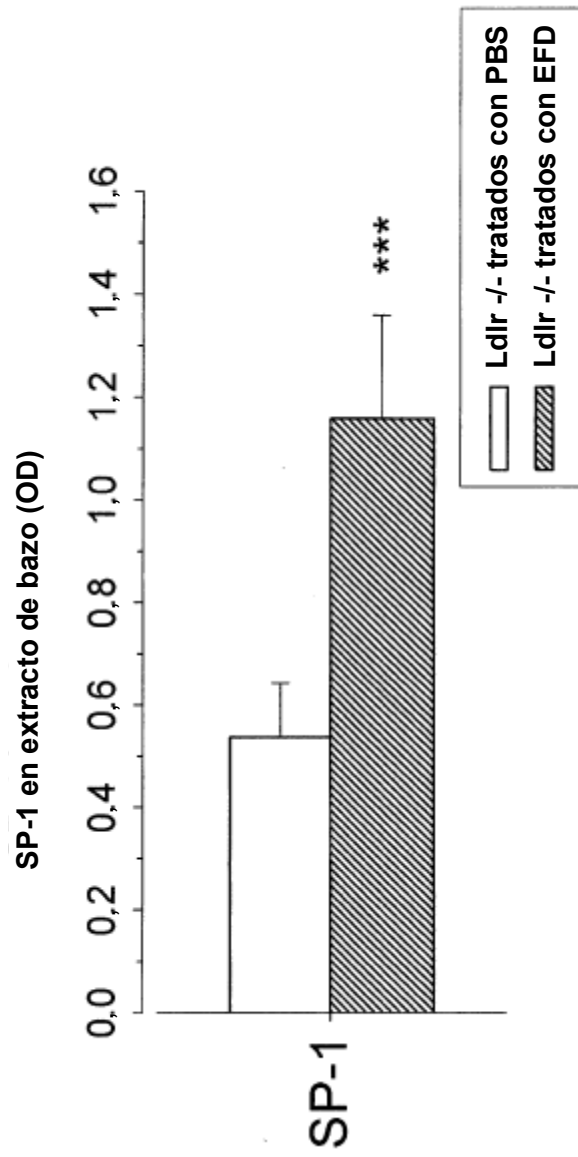


Figura 19

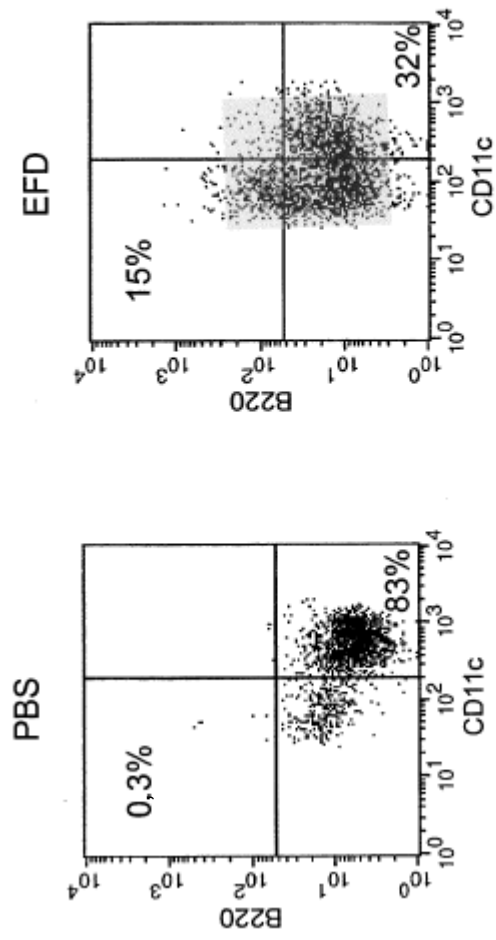


Figura 20

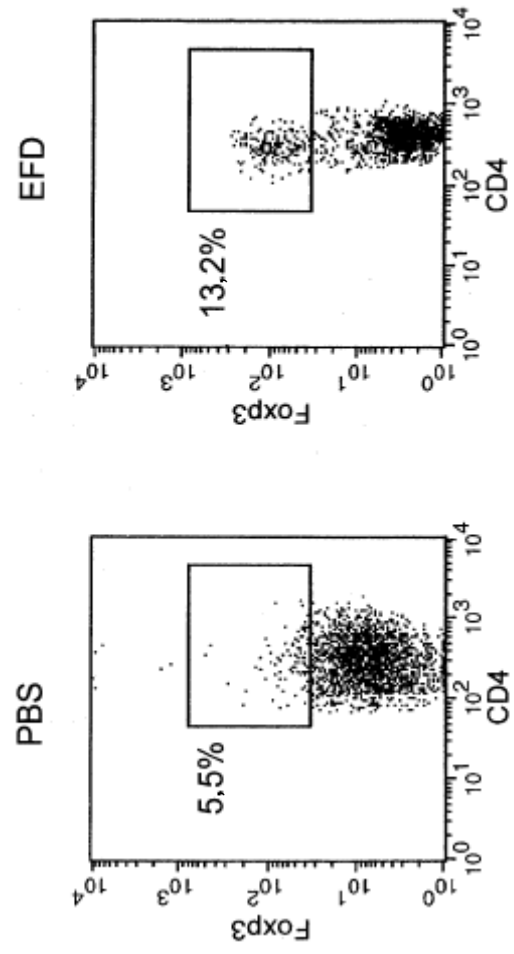


Figura 21

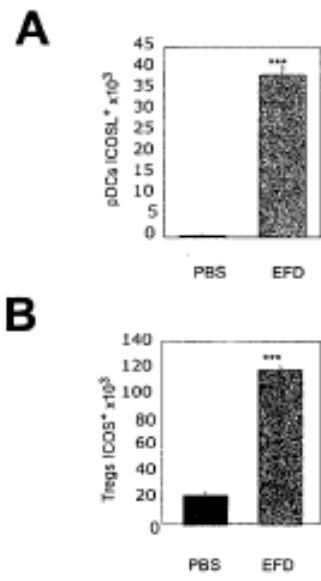


Figura 22

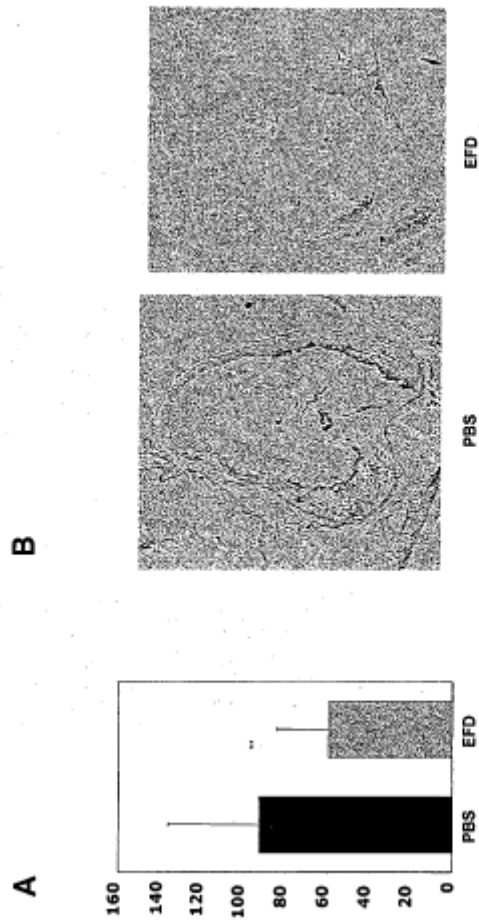


Figura 23

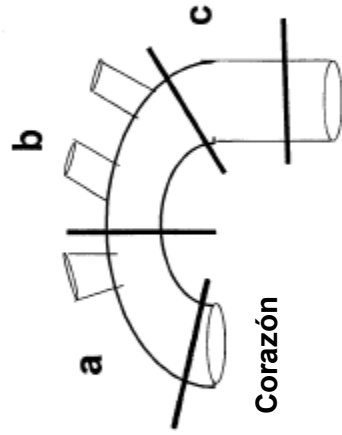


Figura 24

EFD 100 µg sc mensualmente (x6) Ldlr^{-/-}

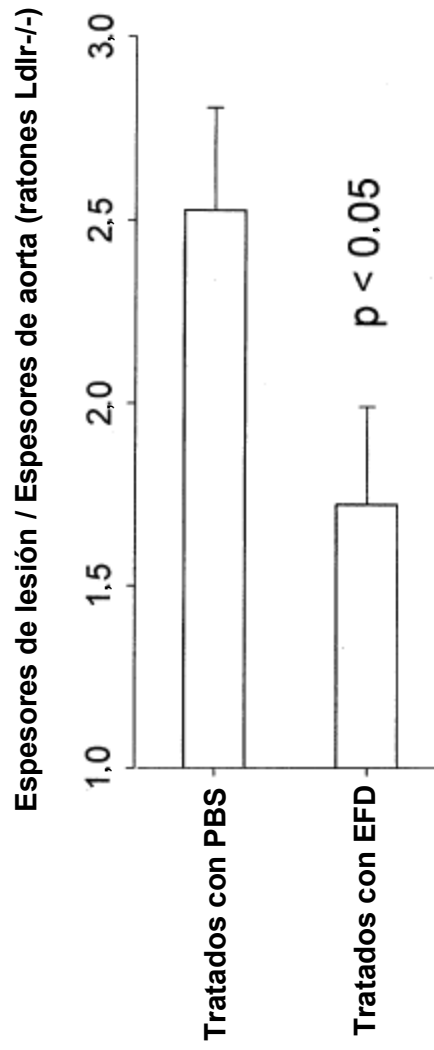


Figura 25

EFD 100 µg sc mensualmente (x6) Ldlr^{-/-}

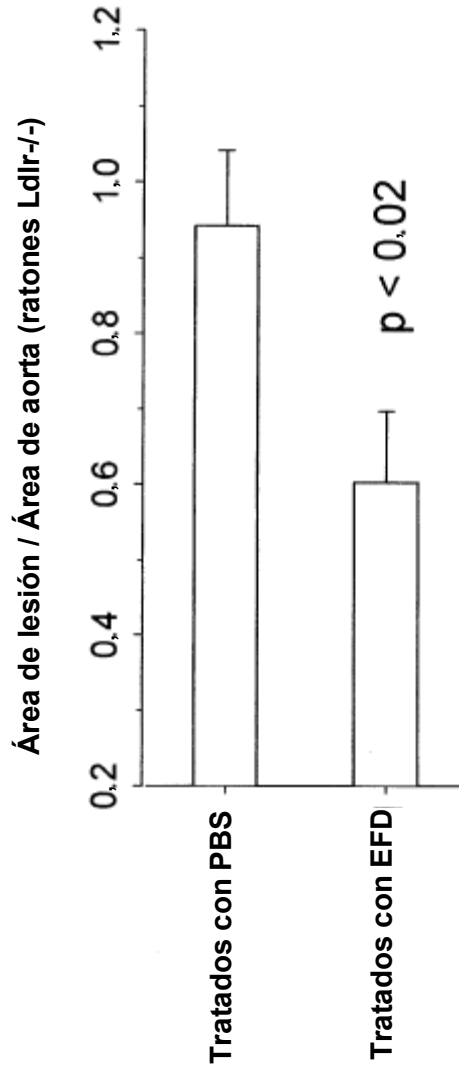


Figura 26

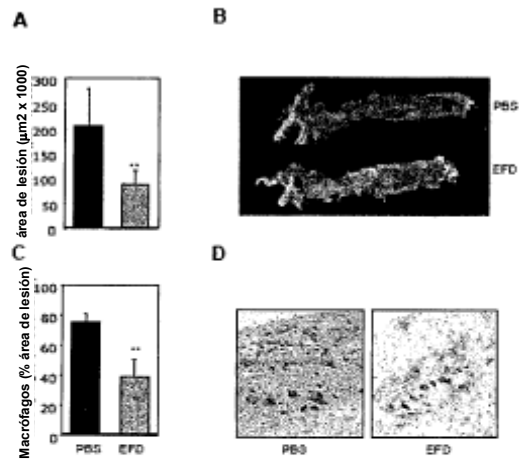


Figura 27

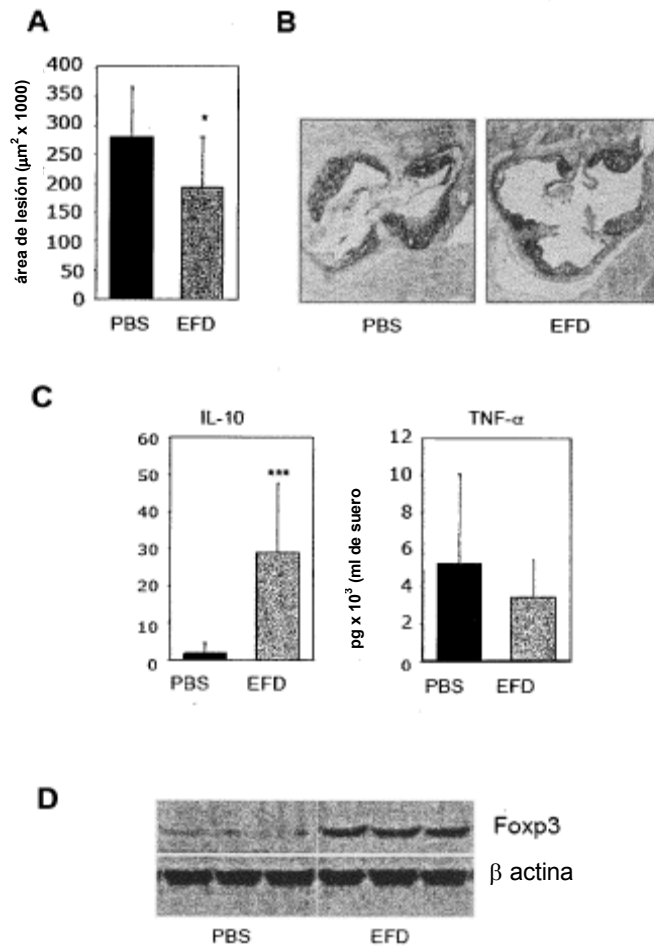


Figura 28

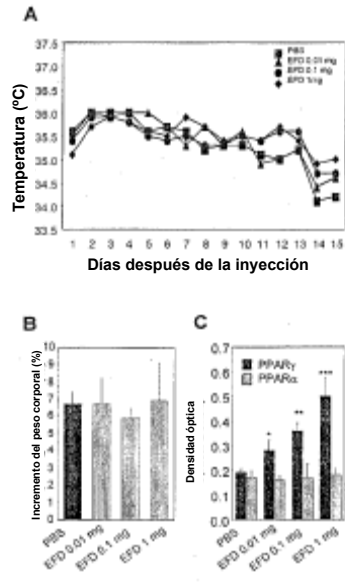
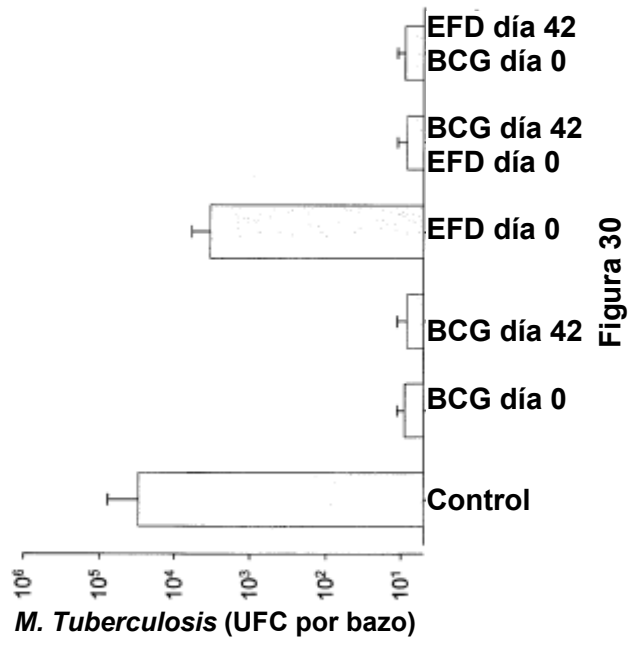


Figura 29



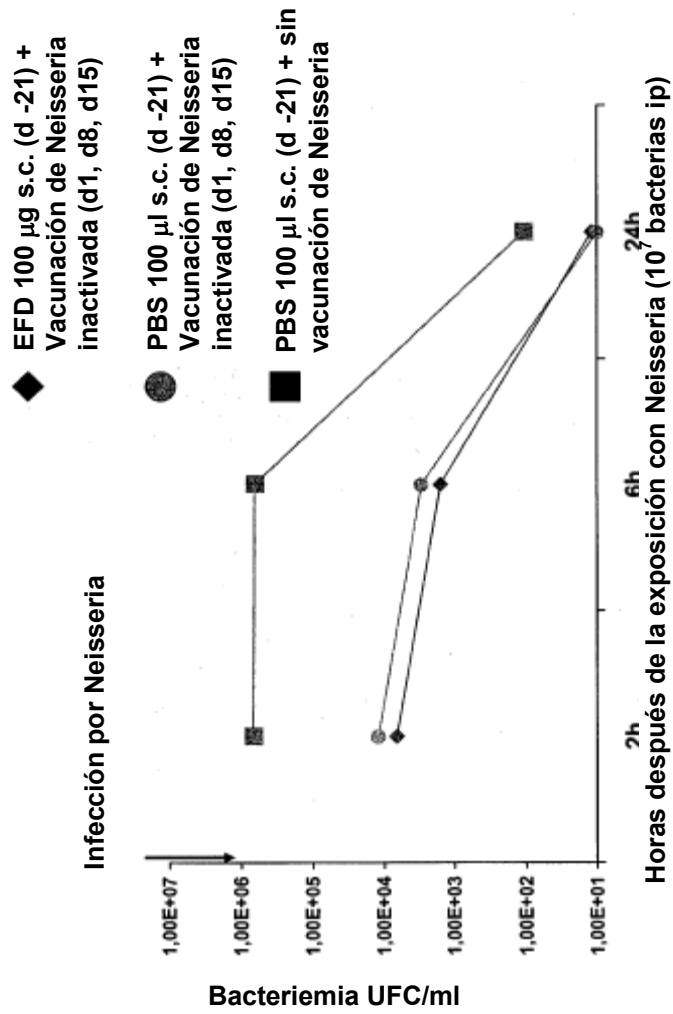


Figura 31

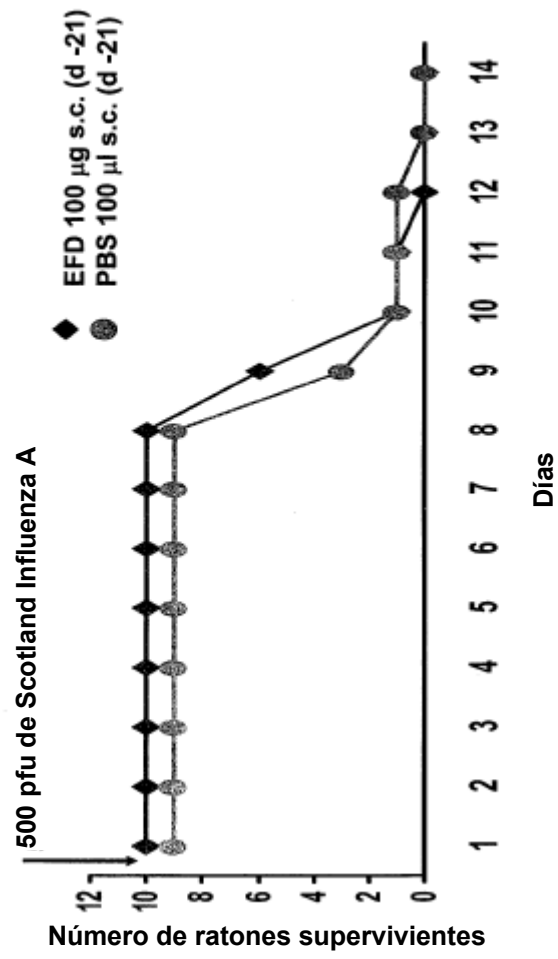


Figura 32

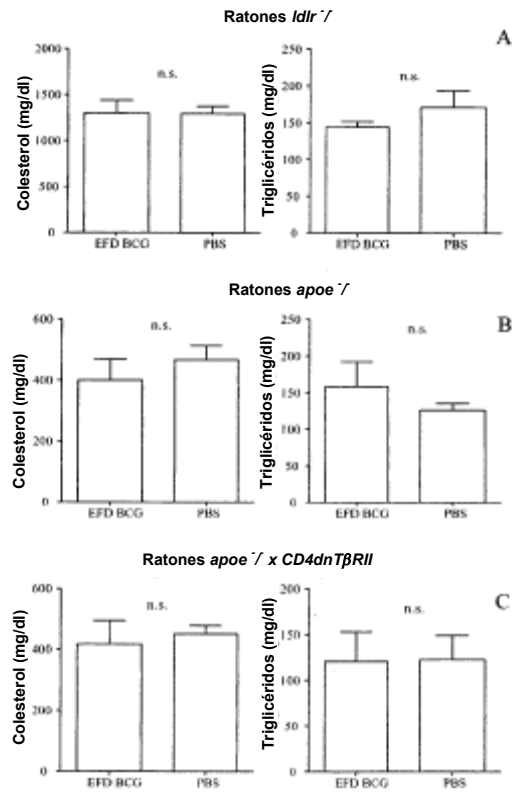
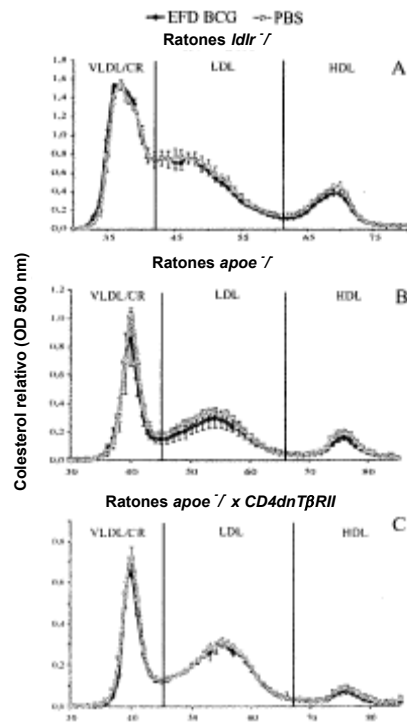


Figura 33



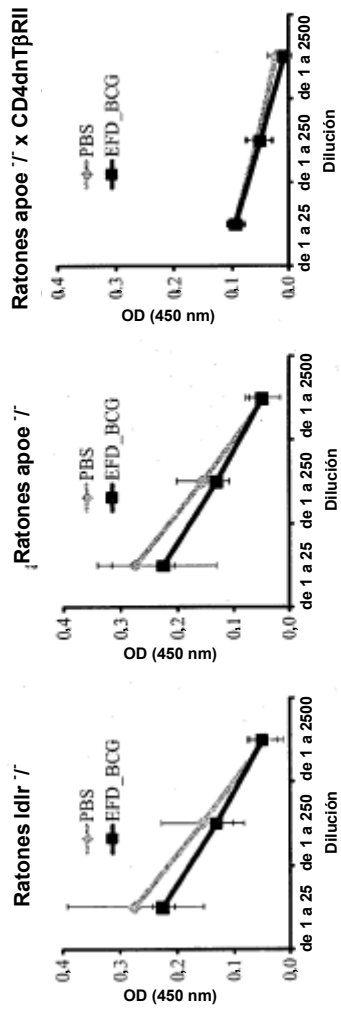


Figura 35