

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 806**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/7008 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/EP2011/068909**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12055981**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11776775 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2632488**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas y procedimientos de tratamiento de trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

26.01.2011 GB 201101331
27.10.2010 US 407235 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

HALLE, MAXIME;
LAROCQUE, DANIEL;
PALMANTIER, REMI;
PRIEELS, JEAN-PAUL y
TRIBOUT-JOVER, PASCALE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 627 806 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas y procedimientos de tratamiento de trastornos neurológicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la prevención y tratamiento de depósito [beta]-amiloide y/o enfermedad de Alzheimer y composiciones para los mismos.

Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que representa la causa más importante de demencia en los seres humanos. Los depósitos extracelulares de péptidos β -amiloide (A β), frecuentemente denominados placas seniles, y la formación intracelular de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada son las dos principales características de esta enfermedad. Se sabe que los agregados A β inducen disfunción sináptica, una posible reducción a largo plazo en la región del hipocampo del cerebro, y por tanto están relacionados con déficits en el aprendizaje y la memoria tanto en seres humanos como en modelos de ratón de EA, lo que hace que los depósitos A β sean un objetivo para la prevención o tratamiento contra este trastorno.

Se ha observado EA en todas las razas y grupos étnicos de todo el mundo y constituye un problema para la salud pública, presente y futuro. 4.500.000 de norteamericanos padecen EA. La enfermedad suele comenzar a partir de los sesenta años de edad y el riesgo es más alto con la edad. Aunque es posible que una persona joven tenga EA, es mucho menos corriente. Aproximadamente un cinco por ciento de los hombres y mujeres con edades comprendidas entre 65 a 74 años tienen EA, y cerca de la mitad de los que tienen 85 o más padecen la enfermedad. Conviene señalar, sin embargo que EA no es una parte normal del envejecimiento. Actualmente la EA no tiene cura. De momento no se conoce ningún tratamiento que evite de forma eficaz la EA o que corrija los síntomas o su curso.

El depósito de péptidos beta-amiloide (Abeta o Ab o A β en el presente documento) en el sistema nervioso central en forma de placas amiloides constituye una de las características de EA (publicación de patente estadounidense No. 20040214774 para Wisniewski y col; patente estadounidense No. 6.114.133 para Seubert; Wegiel y col., "Alzheimer Dementia Neuropathology," in *Dementia: Presentations, Differential Diagnosis & Nosology*, 89-120 (Emery & Oxman, eds., 2003). Varias líneas de evidencia apoyan la conclusión de que la acumulación de beta amiloide destruye las neuronas en el cerebro provocando déficits en las capacidades cognitivas. Dado que la acumulación de beta amiloide parece ser el resultado de un cambio en el equilibrio desde la eliminación al depósito, la identificación y promoción de mecanismos que potencien la eliminación de beta amiloide del cerebro es enormemente deseable.

La inyección intramuscular de péptido A β_{42} en ratones transgénicos jóvenes, que sobre expresaban una forma mutante de la PPA humano, previno eficazmente la formación de depósitos A β , al mismo tiempo que la administración a animales de edad más avanzada redujo su carga de placa amiloide. Schenk, D. y col. *Nature* 400, 173-177 (1999). Asimismo, la inyección intracerebroventricular de un anticuerpo monoclonal contra A β impidió eficazmente que el oligómero A β inyectado inhibiera la potenciación a largo plazo (una medida electrofisiológica que guarda correlación con la memoria), véase Klyubin, I. y col. *Nature medicine* 11, 556-561 (2005). Por tanto, en el modelo de ratón, la vacuna es un enfoque válido para prevenir fenotipos relacionados con EA.

La vacuna ha sido el primer enfoque de tratamiento que ha demostrado tener un genuino impacto sobre el proceso de la enfermedad, al menos en modelos de animales de EA (Sadowski y col., "Disease Modifying Approaches for Alzheimer's Pathology," *Current Pharmaceutic Design*, 13:1943-54 (2007); Wisniewski y col., "Therapeutic Approaches for Prion and Alzheimer's Diseases," *FEBS J.* 274:3784-98 (2007); Wisniewski y col., "Immunological and Anti-Chaperone Therapeutic Approaches for Alzheimer Disease," *Brain Pathol.* 15:72-77 (2005)). La vacunación de EA de ratones transgénicos (Tg) con beta amiloide 1-42 o péptidos homólogos Abeta inyectada en combinación con adyuvante de Freund previno la formación de depósito beta amiloide y, en consecuencia, eliminó el deterioro conductual asociado a los depósitos de beta amiloide (Schenk y col., "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-Like Pathology in the PDPPA Mouse," *Nature* 400:173-77 (1999); Sigurdsson y col., "Immunization with a Nontoxic/Nonfibrillar Amyloid-beta Homologous Peptide Reduces Alzheimer's Disease-Associated Pathology in Transgenic Mice," *Am. J. Pathol.* 159:439-47 (2001); Morgan y col., "A Beta Peptide Vaccination Prevents Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer's Disease," *Nature* 408:982-85 (2001); Janus y col., "A Beta Peptide Immunization Reduces Behavioural Impairment and Plaques in a Model of Alzheimer's Disease," *Nature* 408:979-82 (2000)).

El sorprendente efecto biológico de la vacuna en ensayos preclínicos y la aparente ausencia de efectos secundarios en ratones Tg EA animó a Elan Pharmaceuticals, Inc./Wyeth Research a lanzar ensayos clínicos con una vacuna indicada como AN 1792 que contenía Abeta1-42 pre-agregado y QS21 como adyuvante. Se pensó que este tipo de diseño de vacuna podría inducir una fuerte respuesta inmunitaria adaptativa mediada por célula, ya que se sabe que QS21 es un fuerte inductor de linfocitos T auxiliares de tipo-1 (Th-1). La fase II de la prueba terminó prematuramente cuando un 6% de pacientes vacunados manifestó síntomas de meningoencefalitis aguda. La autopsia realizada en uno de los pacientes afectados reveló la existencia de una extendida reacción de linfocitos T citotóxicos alrededor de algunos vasos sanguíneos cerebrales. El análisis de la carga A[beta] en la corteza cerebral, no obstante, indicó que se había producido la eliminación de Abeta (Nicoll y col., "Neuropathology of Human Alzheimer Disease after

Immunization with Amyloid- beta Peptide: A Case Report," Nature Med. 9:448-52 (2003)). Las pruebas de neuropsiquiatría de pacientes vacunados que aumentaron la respuesta inmunitaria presentaron un moderado, aunque estadísticamente significativo, beneficio cognitivo, lo que demuestra una mejora en algunas escalas de la prueba cognitiva en comparación con el valor basal y una ralentización de la progresión de la enfermedad en los pacientes que habían desarrollado anticuerpos para Abeta (Hock y col., "Antibodies Against Beta-Amyloid Slow Cognitive Decline in Alzheimer's Disease," Neuron 38:547-54 (2003)). Esto indicó que el enfoque de vacunación podría ser beneficioso para pacientes EA humanos, si bien es posible que el concepto de la vacuna tenga que ser rediseñado.

El documento WO2009105641 reconoce los antecedentes mencionados y se refiere a un procedimiento para prevenir o reducir depósitos amiloides en un paciente. Dicho procedimiento implica la selección de un paciente con depósitos amiloides y la estimulación del sistema inmunitario innato del paciente seleccionado en condiciones eficaces para reducir los depósitos amiloides. En particular, se utiliza un agonista TLR9.

Frenkel y col. (Ann Neurol. mayo 2008; 63(5):591-601) desvela el uso de un adyuvante proteosoma nasal para prevenir el depósito amiloide.

El propio cerebro posee un mecanismo inmunológico inherente para prevenir la enfermedad y la sobrecarga tóxica. Las microglías son células inmunes del cerebro y, al igual los macrófagos periféricos, son fagocitos, producen citoquinas y participan en la respuesta inmunitaria innata protegiendo el cerebro contra patógenos invasores. En ratones transgénicos EA, A β estimula el reclutamiento de microglía derivada de la sangre, un linaje celular que es específicamente capaz de eliminar los depósitos amiloides por fagocitosis, véase Simard, A.R. y col. Neuron 49, 489-502 (2006). Asimismo, la inyección intrahipocámpal de lipopolisacárido (LPS) induce el reclutamiento de microglía derivada de médula ósea activada provocando un descenso de la carga de A β en un modelo de ratón transgénico para EA, véase Malm, T.M. y col. Neurobiol Dis 18, 134-142 (2005).

Asimismo, al igual que LPS, A β puede estimular la expresión de receptor 2 de tipo Toll (TLR2) en la microglía. Cabe destacar que la inactivación del gen TLR2 en ratones transgénicos PPA (PPA Tg/TLR2^{-/-}) causó una mayor producción de A β ₄₂ y aceleró el deterioro cognitivo, Richard, K.L. y col. J Neurosci 28, 5784-5793 (2008). Por tanto, la ruta TLR2 desempeña un papel crítico en el desarrollo de patologías EA.

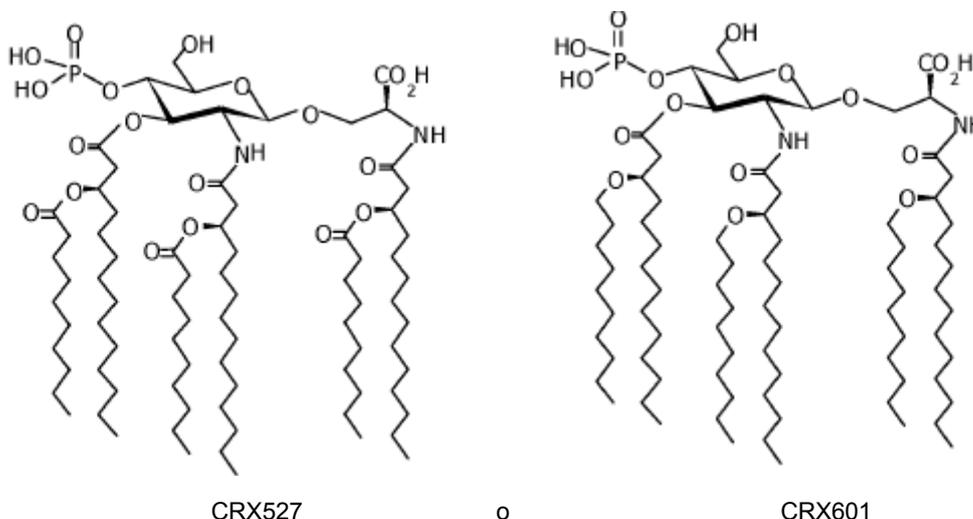
La inyección de Protollin en ratones Tg PPA mejoró significativamente su memoria y estimuló la activación de la microglía, que está correlacionado con una reducción de la carga de A β [Frenkel, D. y col. The Journal of clinical investigation 115, 2423-2433 (2005); Frenkel, D. y col. Ann Neurol 63, 591-601 (2008)]. Además, no se observó ninguna toxicidad aparente tras el tratamiento con Protollin. Frenkel, D. y col. Ann Neurol 63, 591-601 (2008).

Existe una urgente necesidad de contar con un tratamiento profiláctico y curativo para la enfermedad de Alzheimer (EA). Los modelos murinos han indicado que el enfoque inmunoterapéutico o de vacunación es viable para el desarrollo de una vacuna contra EA. [Malm, T.M. y col. Neurobiol Dis 18, 134-142 (2005)].

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a:

Una composición que comprende un fosfato de aminoalquil glucosaminida agonista de TLR4:



que está desprovisto de endotoxina para su uso en la prevención y/o la reducción de enfermedad de Alzheimer en un paciente, tal como se evalúa por la mejora de la memoria espacial del paciente.

Uso de un fosfato de aminoalquil glucosaminida agonista de TLR4 que es CRX527 o CRX601 desprovisto de endotoxina en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o reducir enfermedad de Alzheimer en un paciente, tal como se evalúa por la mejora de la memoria espacial del paciente.

5 Una composición para su uso, o uso de la invención, en el que la composición consiste en CRX527 o CRX601 en combinación con una emulsión de aceite en agua.

Figuras

Figura 1: Transcripción de ARNm de TLR2 tras la inyección de agonistas de TLR4 desprovistos de endotoxina.

Figura 2: Citoquina inflamatoria (TNF α) en sueros de ratón tras (2 h después de la inyección) inyección periférica de agonistas de TLR4 desprovistos de endotoxina.

10 Figura 3: Los agonistas de TLR4 desprovistos de endotoxina accionan un mayor número de monocitos CD11b+ dentro de la periferia.

Figura 4: Número de monocitos en sangre periférica tras una única inyección intramuscular de diferentes dosis de 3D MPL (5 μ g, 25 μ g y 50 μ g).

15 Figura 5: Número de monocitos en sangre periférica tras una única inyección intramuscular de diferentes dosis de AS01 B (1/2, 1/5 de la dosis con respecto a la dosis total para ratones)

Figura 6: Número de monocitos en sangre periférica tras una única inyección intramuscular de diferentes dosis de CRX601 (de 0,2 μ g a 20 μ g).

Figura 7: Número de monocitos en sangre periférica tras una sola inyección intramuscular de diferentes dosis de CRX601 (de 0,2 μ g a 20 μ g) en combinación con dosis constante de AS03.

20 Figura 8: Absorción de A β ₄₂ *ex vivo* por monocitos de sangre periférica de ratones adyuvados.

Figura 9: Análisis de carga total de placa A β .

Figura 10: 12 inyecciones semanales de 3D-MPL o CRX527 o CRX601 o AS01 B en un modelo de ratón PPA/PS1 presenta una mejora de la memoria espacial en comparación con los ratones sin tratar.

Figura 11: Prueba de retención de evitación pasiva.

25 Figura 12: Histología 3D de la placa Ab del cerebro tras el tratamiento con 3D MPL y LPS de ratones PPA/PS1.

Figura 13: Resultados del análisis conductual utilizando agonistas de TLR4 desprovistos de endotoxina.

Figura 14: Reducción de A β monomérico en fracciones enriquecidas extracelulares de cerebros de ratones a los que se les inyectó 3D MPL.

30 Figura 15: Fagocitosis de péptido beta-amiloide 1-42 por células microgliales humanas tras el tratamiento con agonistas TLR4s desprovistos de endotoxina.

Figura 16: Fotografía representativa de microscopía fluorescente de línea celular de microglía humana que presenta la localización de A β 1-42 dentro del lisosoma tras el tratamiento con AS01 B.

35 Figura 17: Perfil de citoquinas innatas de sueros tras la inyección de LPS o 3DMPL a ratones por vía intraperitoneal al cabo de 2 horas o 6 horas desde el momento de la inyección. Los resultados se muestran en unidades relativas (UR o pg/ml) de varias citoquinas/quimioquinas en sueros para ratones a los que se les inyectó PBS y LPS o 3DMPL al cabo de 2 horas o 6 horas. N = 5 ratones por grupo. Las barras representan la media \pm SEM; * P < 0,05, significativamente diferente de los grupos comparados. Se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para la comparación tras el análisis ANOVA-1.

40 Figura 18: Perfil de citoquinas innatas de sueros tras la inyección de AS01 B, AS03 o AS04D a ratones por vía intramuscular al cabo de 2 horas o 6 horas desde el momento de la inyección. Los resultados se muestran en unidades relativas (UR o pg/ml) de varias citoquinas/quimioquinas en sueros para ratones a los que se les había inyectado PBS y LPS o 3D MPL al cabo de 2 horas o 6 horas. N = 5 ratones por grupo. Las barras representan la media \pm SEM.

Figura 19: Se regula al alza el número de monocitos 4,5 veces mediante AS01 B.

45 Figura 20: AS01 B y QS21 + liposoma estimulan *in vivo* un aumento del número de monocitos (panel A) y el estado de activación de monocito (Ly6C alto) (panel B) de manera sobre todo significativa tras 24 h en la sangre periférica de ratón C57BL/6 tras la inyección intramuscular.

Figura 21: AS01 B y QS21 + liposoma estimula la absorción de A β *ex vivo* por los monocitos de sangre periférica de ratones de manera sobre todo significativa tras 24 horas de la inyección intramuscular en ratones C57BL/6.

(En las Figuras, todas las referencias a MPL son referencias a 3D-MPL).

Descripción detallada

5 La invención se refiere de forma general a un procedimiento para prevenir y/o reducir enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende el tratamiento de dicho paciente con una composición que comprende agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, por ejemplo que comprende un fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP), que es CRX527 o CRX601.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, "amiloide" engloba cualquier agregado de proteína fibroso insoluble que se deposita en el organismo. El depósito amiloide puede ser específico de órgano (p.ej. sistema nervioso central, páncreas, etc.) o sistémico. De acuerdo con este aspecto de la invención, las proteínas amiloidogénicas susceptibles de deposición incluyen precursor de proteína beta, prion, alfa-sinucleína, tau, proteína precursora ABri, proteína precursora ADan, amilina, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, lisozima, cistatina C, gelsolina, proteína, factor natriurético atrial, calcitonina, queratoepitelina, lactoferrina, cadenas ligeras de inmunoglobulina, transtiretina, [beta]2 microglobulina de amiloidosis A, cadenas pesadas de inmunoglobulina, cadenas alfa de fibrinógeno, prolactina, queratina y medina. El depósito amiloide puede tener lugar de por sí o como resultado de otras enfermedades (p.ej. mieloma múltiple, infección crónica o enfermedad inflamatoria crónica).

20 La presente divulgación se refiere asimismo al tratamiento de un paciente que tiene una afección o una enfermedad que está asociada con el depósito de proteínas amiloidogénicas, o que es el resultado de ello. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad por cuerpos difusos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, insomnio familiar fatal, demencia familiar (variante británica), demencia familiar (variante danesa), amiloidosis corneal familiar, distrofias corneales hereditarias, cáncer de tiroides medular, insulinooma, diabetes tipo 2, amiloidosis atrial aislada, amiloidosis pituitaria, amiloidosis aórtica, trastornos de las células plasmáticas, amiloidosis familiar, amiloidosis cardíaca senil, amiloidosis asociada a inflamación, fiebre mediterránea familiar, amiloidosis asociada a diálisis, amiloidosis sistémica y amiloidosis sistémica familiar.

El tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer es un elemento distintivo preferente de la invención.

30 La invención se refiere a la prevención o tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un paciente. En un aspecto, es posible que se hayan diagnosticado ya síntomas de la enfermedad en el paciente para prevención o tratamiento. En un aspecto, no se han diagnosticado todavía síntomas en el paciente para tratamiento.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un efecto sobre los depósitos de proteína amiloide y, en otro aspecto, a un efecto en las conductas que están asociadas con patologías y, en particular, la prevención o reducción de conductas asociadas con enfermedad de Alzheimer.

35 En un aspecto, los procedimientos y composiciones desvelados tienen un efecto tanto sobre el depósito de proteína amiloide como en la conducta asociada a la enfermedad, como pueda ser la conducta asociada a enfermedad de Alzheimer, si bien, en otro aspecto, los procedimientos y composiciones de la invención tienen un efecto o bien en lo que respecta a los depósitos amiloides o bien en lo que respecta a la conducta.

En un aspecto de la invención, la prevención o reducción de la gravedad de la enfermedad de Alzheimer comprende la mejora de la memoria espacial.

40 También se desvela el uso de composiciones, tal como se desvelan en el presente documento, para una mejor fagocitosis de beta amiloide, así como composiciones para su uso en la mejora de fagocitosis de beta amiloide.

Sin ánimo establecer una teoría, se cree que el uso de un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina como fosfato de aminoalquil glucosaminida, 3D-MPL o MPL, actúa por estimulación del sistema inmunitario innato.

45 También se desvela un procedimiento para prevenir o reducir el depósito amiloide o enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende: selección de un paciente con depósitos amiloides y estimulación del sistema inmunitario innato del paciente seleccionado utilizando un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina en condiciones eficaces para reducir los depósitos amiloides.

También se desvela el uso de composiciones, tal como se desvelan en el presente documento, para la estimulación de la actividad de células microgliales.

50 Las células microgliales pueden ser activadas por un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, u otro activador adecuado, en cultivo, antes de suministrarse al cerebro para la eliminación de amiloide β .

También se desvela:

Un agonista de TLR4 desprovisto de un agonista TLR2 para su uso en los procedimientos de la invención desvelados en el presente documento, en concreto para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedad de Alzheimer y/o reducción de B amiloide, y en particular en el uso en la prevención o tratamiento de conductas adversas asociadas con la enfermedad de Alzheimer, como puedan ser la prevención o reducción de la pérdida de memoria, o la mejora de la memoria. La memoria puede ser memoria espacial. El agonista de TLR4s puede ser cualquier de los descritos en el presente documento.

Un agonista de TLR4 para su uso en la prevención o tratamiento de conductas adversas asociadas a la enfermedad de Alzheimer, como pueda ser la prevención o reducción de la pérdida de la memoria y/o una mejora de la memoria. La memoria puede ser la memoria espacial. El agonista de TLR4s puede consistir en los que se describen en el presente documento.

Convenientemente, los agonistas de la invención tienen como resultado una mejora de los resultados en cualquiera de los ensayos con animales llevados a cabo en el presente documento, tales como laberinto en T de agua o pruebas de evitación pasiva o de conducta de construcción del nido cuando se comparan con un control adecuado.

En un aspecto, la presente invención utiliza un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP), que es CRX527 o CRX601.

Los agonistas de TLR4 se pueden sintetizar desprovistos de endotoxinas o se pueden purificar para que estén desprovistos de endotoxinas.

La endotoxina se puede detectar a través de una prueba LAL. Otro enfoque aceptable es la prueba de pirógenos en conejos, que se puede utilizar para 3D MPL o AGPs, por ejemplo, y en la que por vía iv en los conejos se inyecta una solución de 3D MPL o AGP y se vigila el ascenso de la temperatura.

La despirogenación se puede conseguir a través de técnicas muy conocidas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico o ultrafiltración.

El agonista de TLR4s incluye MPL y 3D-MPL, que son menos tóxicos que Lípido A. Ambos son agonistas de TLR4. La patente estadounidense No. 4.436.727 desvela monofosforil lípido A [MPL] y su fabricación. La patente estadounidense No. 4.912.094 y su certificado de reexamen B1 4.912.094 desvelan monofosforil lípido A 3-O-desacilado [3D MPL] y un procedimiento para su fabricación.

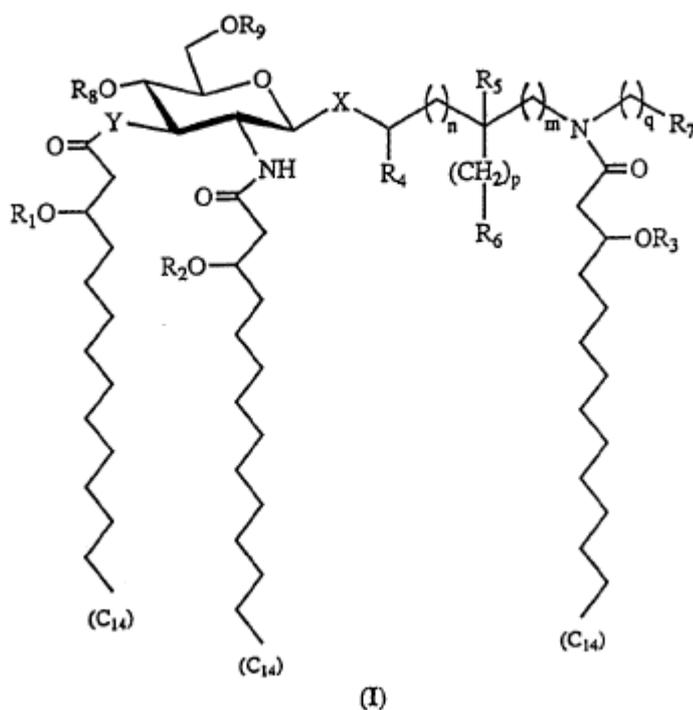
La presente invención utiliza un agonista de TLR4 sintético, desprovisto de endotoxina. El nivel de endotoxina para los agonistas de TLR4 sintéticos puede ser cero.

Los agonistas de TLR4 pueden consistir en moléculas de disacárido sintéticos, similares en estructura a MPL y 3D-MPL o puede consistir en moléculas de monosacárido sintéticas, tales como los compuestos fosfato de aminoalquil glucosaminida desvelados por ejemplo en los documentos WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO3065806, WO04062599, WO06016997, WO0612425, WO03066065, y WO0190129 cuya divulgación se incorpora al presente documento como referencia. Dichas moléculas también han sido descritas en la bibliografía científica y de patentes como miméticos de lípido A, que también forman un aspecto de la presente invención.

El agonista de TLR4 utilizado en la presente invención es un mimético de lípido A. Los miméticos de lípido A comparten convenientemente parte de la actividad funcional y/o estructural con el lípido A y, en un aspecto, son reconocidos por receptores TLR4. Los AGP, tal como se describen en el presente documento, se denominan a veces miméticos de lípido A en la técnica. Los miméticos de lípido A, en un aspecto, son menos tóxicos que lípido A.

Se desvelan fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP) en los que el grupo aminoalquilo (aglicón) está unido glucosídicamente a una 2-desoxi-2-amino- α -D-glucopiranososa (glucosaminida) para formar la estructura básica de las moléculas que se reivindican. Los compuestos están fosforilados en los carbonos 4 o 6 del anillo de glucosaminida. Asimismo, los compuestos poseen tres radicales 3-alcanoíloxicanoilo que comprenden una cadena de acilo graso primaria o secundaria, consistiendo cada cadena en 2-24 átomos de carbono, preferentemente 7-16 átomos de carbono. En un aspecto preferente, cada cadena primaria contiene 14 átomos de carbono y cada cadena secundaria tiene entre 10 y 14 átomos de carbono.

Se desvelan compuestos AGP descritos con la fórmula general:



Dichos compuestos comprenden un 2-desoxi-2-amino- α -D-glucopiranososa (glucosamina) en unión glicosídica con un grupo aminoalquilo (aglicón). Los compuestos están fosforilados en el carbono 4 o 6 en el anillo de glucosamina y tienen tres radicales alcanoiloxialcanoilo. Los compuestos se describen de forma general con la Fórmula I, en la que X representa un átomo de oxígeno o azufre, Y representa un átomo de oxígeno o un grupo NH, "n", "m", "p" y "q" son enteros de 0 a 6, R₁, R₂ y R₃ representan radicales acilo graso normales que tienen de 7 a 16 átomos de carbono, R₄ y R₅ son hidrógeno o metilo, R₆ y R₇ son hidrógeno, hidroxilo, alcoxi, fosfono, fosfonoxi, sulfuro, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo o carboxi y ésteres y amidas de los mismos; R₈ y R₉ son fosfono o hidrógeno. La configuración de los centros estereogénicos en 3' a los que se unen radicales acilo graso normales es R o S, pero preferentemente R. La estereoquímica de los átomos de carbono a los que están unidos R₄ o R₅ puede ser R o S. Todos los estereoisómeros, tanto enantiómeros como diaesteómeros, y mezclas de ellos se consideran incluidos dentro del ámbito de la presente divulgación.

El heteroátomo X de dichos compuestos de la presente invención pueden ser oxígeno o azufre. Aunque la estabilidad de las moléculas podría establecerse con una sustitución en X, no es de esperar que cambie la actividad de inmunomodulación de las moléculas con estas sustituciones.

El número de átomos de carbono entre el heteroátomo X y el átomo de nitrógeno del aglicón se determina por variables "n" y "m". Las variables "n" y "m" pueden ser enteros de 0 a 6. En ciertos compuestos, el número total de átomos de carbono entre el heteroátomo X y el átomo de nitrógeno del aglicón es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 y es sobre todo preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4.

Dichos compuestos son compuestos de aminoalquil glucosamina que están fosforilados. Los compuestos pueden estar fosforilados en la posición 4 o 6 (R₈ o R₉) en el anillo de glucosamina y son máximamente eficaces si están fosforilados en al menos una de estas posiciones. En ciertos compuestos, R₈ es fosfono y R₉ es hidrógeno.

Dichos compuestos están hexa-acilados, es decir contienen un total de seis radicales ácido graso. La fracción aminoalquil glucosamina está acilada en los grupos 2- amino y 3-hidroxilo de la unidad glucosamina y en el grupo amino de la unidad aglicón con radicales 3-hidroxialcanoilo. En la Fórmula I, estas tres posiciones están aciladas con fracciones 3-hidroxitetradecanoilo. Los radicales 3-hidroxitetradecanoilo están sustituidos a su vez con ácidos grasos normales (R₁-R₃), proporcionando tres radicales 3-n-alcanoiloxitetradecanoilo o seis grupos ácido graso en total.

La longitud de cadena de los ácidos grasos normales R₁-R₃ puede ser de aproximadamente 7 a aproximadamente 16 carbonos, p.ej., R₁-R₃ son de aproximadamente 9 a aproximadamente 14 carbonos. Las longitudes de cadena de estos ácidos grasos normales pueden ser iguales o diferentes. Aunque solamente se describen ácidos grasos normales, es de esperar que los ácidos grasos insaturados (es decir, fracciones de ácido graso que tienen enlaces dobles o triples) sustituidos en R₁, -R₃ en los compuestos produzcan moléculas biológicamente activas. Por otra parte, no es de esperar que ligeras modificaciones de la longitud de cadena de los radicales 3-hidroxialcanoilo afecten de forma espectacular la actividad biológica.

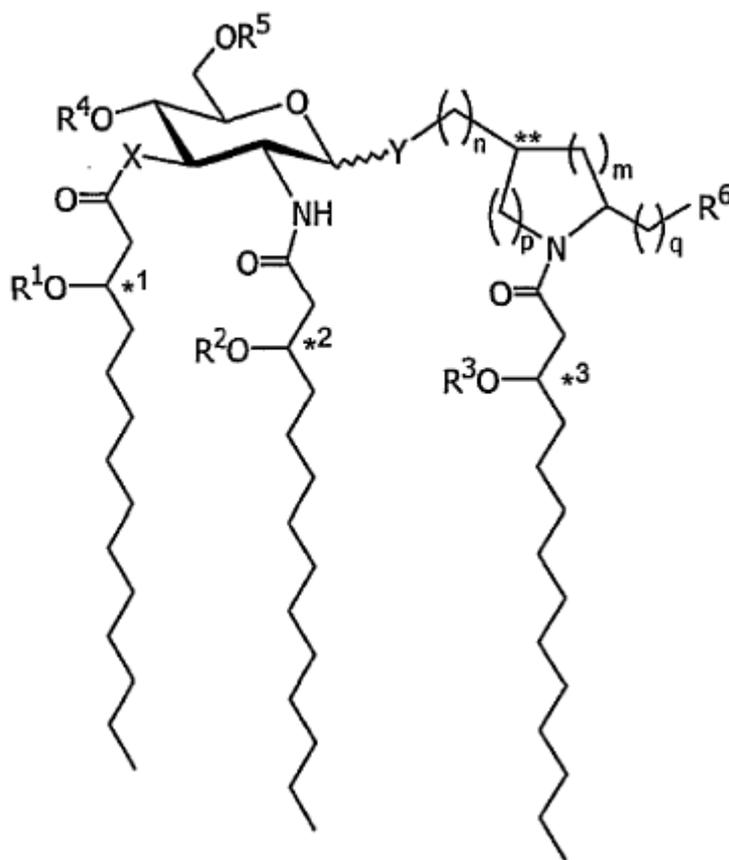
Entre los ejemplos concretos de los AGP utilizados en la invención se incluyen: CRX- 527 desvelados en JBC 2004 279, No 6, página 4440 - 4449 (<http://www.jbc.org/content/279/6/4440.full.pdf>).

En los documentos WO0212258 y WO3065806 se desvelan realizaciones adicionales de AGP que tienen un aminoalquilo cíclico (aglicón) unido a una 2-desoxi-2-amino-a-D-glucopiranososa (glucosaminida), denominados comúnmente "AGP cíclicos."

La referencia general a AGP en el presente documento incluye AGP tanto cíclicos como no cíclicos.

Los AGP cíclicos poseen tres radicales 3-alcanoiloxialcanoilo que comprenden una cadena de acilo graso primaria y secundaria, consistiendo cada cadena de carbonos en entre 2 y 24 átomos de carbono, p.ej. entre 7 y 16 átomos de carbono. En ciertos compuestos, cada cadena primaria contiene 14 átomos de carbono y cada cadena de carbonos secundaria tiene entre 10 y 14 átomos de carbono por cadena.

Los AGP cíclicos se describen con la siguiente fórmula general II:



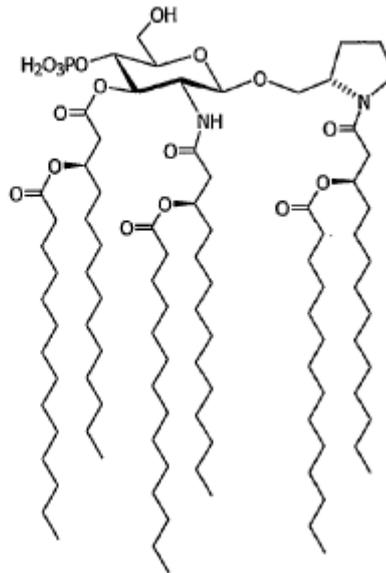
Estos compuestos comprenden una 2-desoxi-2-amino-p-D-glucopiranososa (glucosamina) glucosídicamente unida a un grupo aminoalquilo cíclico (aglicón). Los compuestos están fosforilados en la posición 4 o 6 del anillo de glucosamina y acilados con radicales alcanoiloxitetradecanoilo en el nitrógeno del aglicón en las posiciones 2 y 3 del anillo de glucosamina. Los compuestos se describen de forma general con fórmula (II); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que X es -O- o NH- e Y es -O- o -S-; R1, R2, y R3 son cada uno de ellos independientemente (C2-C24) grupo acilo, incluyendo grupos acilo, saturados, insaturados y ramificados; R4 es -H o -PO₃R7R8, en el que R7 y R8 son cada uno de ellos independientemente H o alquilo de (C1-C4); R5 es -H, -CH₃ o -PO₃R9R10, en el que R9 y R10 se seleccionan cada uno de ellos independientemente entre -H y alquilo de (C1-C4); R6 se selecciona independientemente entre H, OH, alcoxi de (C1-C4), -PO₃R11R12, -OPO₃R11R12, -SO₃R11, -OSO₃R11, -NR11R12, -SR11, -CN, -NO₂, -CHO, -CO₂R11, y -CONR11R12, en el que R11 y R12 se seleccionan cada uno independientemente entre H y (C1-C4) alquilo; siempre que, cuando R4 sea -PO₃R7R8, R5 sea distinto a -PO₃R9R10, en la que "*1-3" y "**" representan centros quirales; en la que los subíndices n, m, p y q son cada uno de ellos independientemente un entero de 0 a 6, siempre y cuando la suma de p y m sea de 0 a 6.

Algunos compuestos contienen un -O- en X e Y, R4 es PO₃R7R8, R5 y R6 son H, y los subíndices n, m, p, y q son enteros de 0 a 3. En ciertos compuestos, R7 y R8 son -H. En una realización más preferente aún, el subíndice n es 1, el subíndice m es 2, y los subíndices p y q son 0. En otra realización incluso más preferente aún, R1, R2, y R3 son

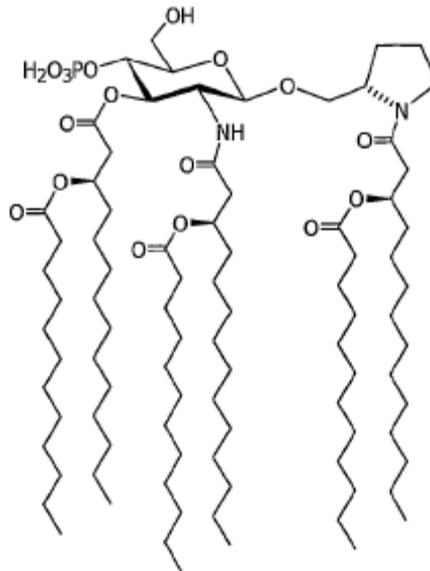
radicales tetradecanoílo. En ciertos compuestos, *1-3 están en la configuración R, Y está en la posición ecuatorial y ** está en la configuración S (N-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]- (S)-2-pirrolidinometil 2-desoxi-4-O-fosfono-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-p-D-glucopyranosida y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 Ciertos compuestos incluyen:

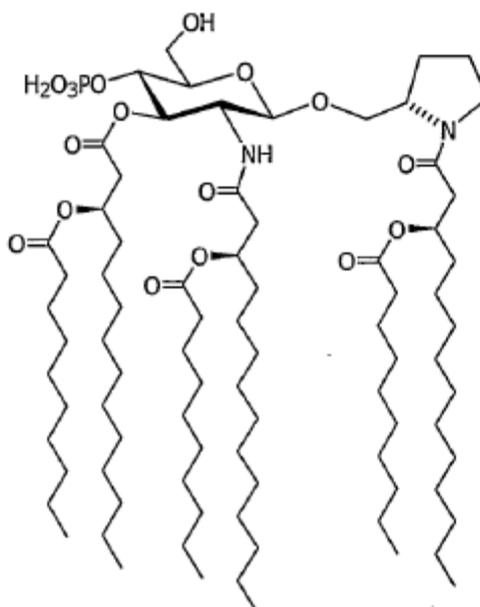
[III]



[IV]



[M]



La Fórmula V es CRX 590.

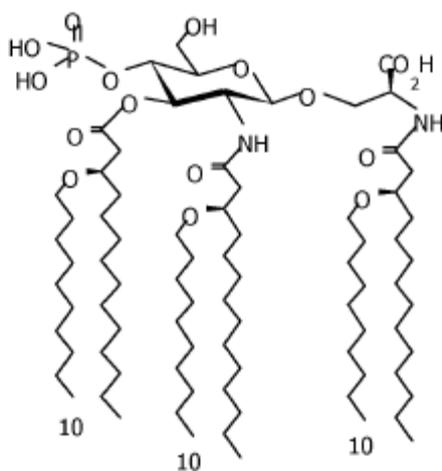
También se desvela un ligando de receptor TLR4 que es un AGP que tiene uno o más grupos lípido primarios y/o secundarios unidos a éter en lugar de a éster. En este caso, R1-R3 representan grupos alquilo de cadena lineal y no grupos acilo, dando los grupos R1O-, R2O- y R3O- alcoxi en lugar de grupos alcanoiloxi y la unión a la cadena de acilo primaria de una unión éter en lugar de éster. En el caso de un grupo lípido primario unido a éter, el radical 3-alcanoiloxialcanoilo unido al grupo 3-hidroxi de la unidad glucosamina está reemplazado por una fracción 3-alcanoiloxialquilo o una fracción 3-alcoxialquilo, dando una unión del grupo lípido primario en la posición 3 de glucosamina de un éter en lugar de una unión éster.

5

10

Una fórmula general para los éteres es la fórmula IV del documento WO2006016997.

Un ejemplo de un compuesto preferente utilizado en la presente invención es CRX601.

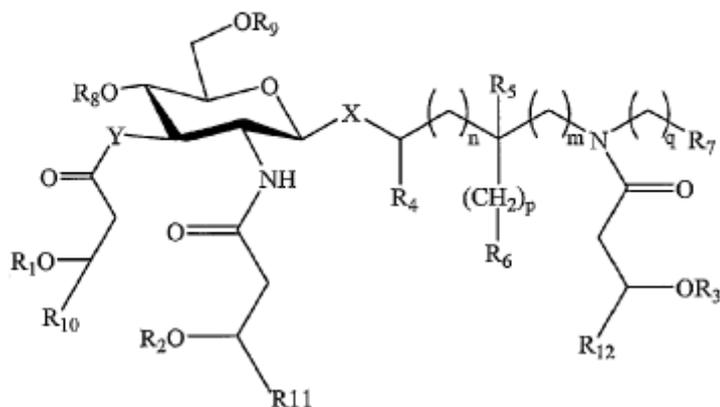


15

También se desvela una molécula de AGP que tiene un número de carbonos diferente en la cadena primaria y/o la cadena secundaria de la molécula. Dichos compuestos se desvelan en los documentos WO04062599 y WO06016997, Al igual que con otros AGP, cada cadena de carbonos puede consistir en 2-24 átomos de carbono, y preferentemente 7-16 átomos de carbono. En un aspecto preferente, cada cadena primaria contiene 14 átomos de carbono y cada cadena de carbonos secundaria tiene entre 10 y 14 átomos de carbono por cadena.

Dichos compuestos están representados por las siguientes estructuras:

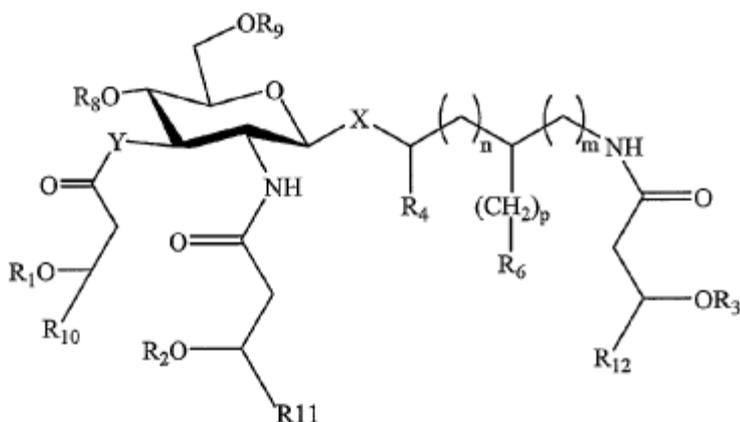
[VI]



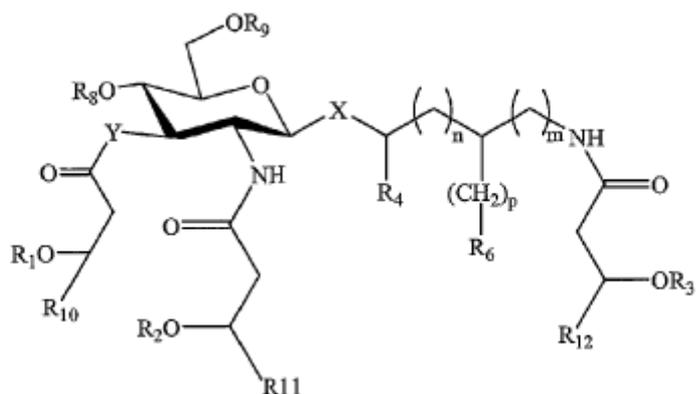
5 en la que X se selecciona del grupo que consiste en O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que consiste en O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y son radicales acilo graso que tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono y en la que uno entre R1, R2 o R3 es opcionalmente hidrógeno; R4 y R5 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R6 y R7 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfo, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R8 y R9 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y al menos uno entre R8 y R9 es fosfona; R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente entre grupos alifáticos saturados sin sustituir de cadena lineal que tienen de 1 a 10 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

[VII]



15 en la que X se selecciona del grupo que consiste en O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que consiste en O y NH; n y m son 0; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y son radicales acilo graso que tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono y en la que uno entre R1, R2 o R3 es opcionalmente hidrógeno; R4 se selecciona del grupo que consiste en H y metilo; p es 1 y R6 es $COOH$ o p es 2 y R6 es OP_3H_2 ; R8 y R9 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y al menos uno entre R8 y R9 es fosfona; y R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente entre grupos alifáticos saturados sin sustituir de cadena lineal que tienen de 1 a 10 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.



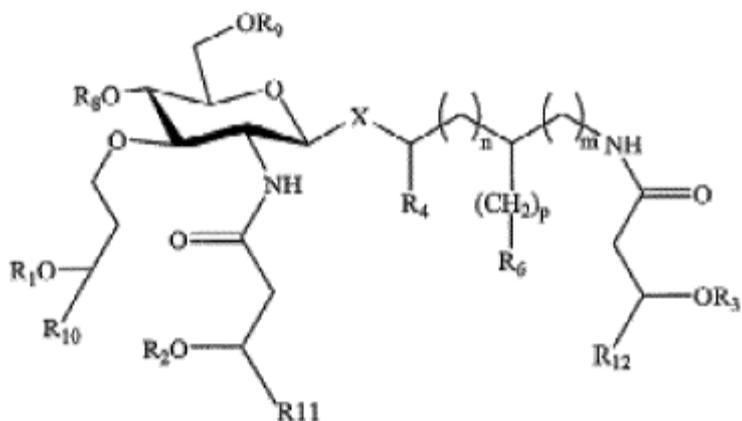
[VIII]

en la que X se selecciona del grupo que consiste en O y S en la posición axial o ecuatorial; Y se selecciona del grupo que consiste en O y NH; n, m, p y q son enteros de 0 a 6; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y son grupos alifáticos saturados de cadena lineal (es decir, grupos alquilo de cadena lineal) que tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono y en la que uno entre R1, R2 o R3 es opcionalmente hidrógeno; R4 y R5 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H y metilo; R6 y R7 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en H, hidroxilo, alcoxi, fosfona, fosfonoxi, sulfona, sulfoxi, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo y carboxi, y ésteres y amidas de los mismos; R8 y R9 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y al menos uno entre R8 y R9 es fosfona; R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente entre grupos alifáticos saturados sin sustituir de cadena lineal que tienen de 1 a 11 átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La fórmula general puede comprender además un grupo R5, en la misma posición que la que se muestra en la fórmula VI anterior, en la que R5 se selecciona del grupo que consiste en H y metilo.

[IX]



(IV)

Otro tipo de compuesto más tiene la fórmula (IV): en la que Y está fijado ahora como oxígeno; X se selecciona del grupo que consiste en O y S en la posición axial o ecuatorial; n y m son 0; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y son radicales de ácido graso que tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono y en la que uno entre R1, R2 o R3 es opcionalmente hidrógeno; R4 se selecciona del grupo que consiste en H y metilo; p es 0 o 1 y R6 es COOH, o p es 1 o 2 y R6 es OPO3H2; R8 y R9 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en fosfona y H, y al menos uno entre R8 y R9 es fosfona; y R10, R11 y R12 se seleccionan independientemente entre grupos alifáticos saturados sin sustituir de cadena lineal que tienen de 1 a 10 átomos de carbono; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Estos compuestos tienen por tanto dos cadenas aciladas y una cadena de éter no acilada.

En el documento WO0612425 también se desvelan procedimientos para fabricar AGPs.

En los documentos WO03066065 y WO0190129 se desvelan procedimientos para prevenir y tratar enfermedades

mediante la administración de AGP en ausencia de antígenos exógenos.

En *Infection and Immunity*, mayo 2005, p. 3044-3052 Vol. 73, No. 5, se desvelan otras estructuras AGP como CRX 524.

5 En el presente documento se desvelan también composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, como por ejemplo fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP), 3D-MPL o MPL.

Las composiciones pueden consistir alternativamente, o consistir esencialmente en un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, como MPL, 3D MPL y AGP, pudiéndose administrar cada uno de estos agentes en solitario o en combinación con excipientes, como puedan ser vehículos, excipientes, tampones y similares.

10 El agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina se puede formular con otros componentes que puedan potenciar su eficacia.

El agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina se puede combinar con otros agentes farmacéuticamente activos.

15 En un aspecto de la presente divulgación, una composición farmacéutica que comprende 3D-MPL consiste, o consiste esencialmente en 3D MPL en combinación con una saponina, como por ejemplo QS21, y liposomas. En un aspecto, la composición consiste o consiste esencialmente en AS01 B (véase por ejemplo la patente europea EP822831). En un aspecto, el tratamiento con 3DMPL o el uso de 3DMPL de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación incluye el uso de AS01 B.

20 Se desvela asimismo una composición farmacéutica que comprende un AGP que consiste o consiste esencialmente en un AGP en combinación con una emulsión de aceite en agua, como por ejemplo AS03 (por ejemplo, tal como se desvela en la patente europea EP868918). El tratamiento con un AGP o el uso de un AGP de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la invención incluye el uso de un AGP en combinación con una emulsión de aceite en agua.

25 La composición de la invención no comprende un polipéptido amiloide o fragmento del mismo. En un aspecto no comprende un antígeno específico de la enfermedad de Alzheimer, como beta amiloide o fragmento del mismo. Puede comprender un antígeno o un agente específico para una enfermedad que no se caracteriza por depósito amiloide.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, como por ejemplo un fosfato de aminoalquil glucosaminida, MPL o 3D MPL y un excipiente farmacéuticamente aceptable en ausencia de un antígeno específico de enfermedad, como por ejemplo antígeno de Alzheimer.

30 Se desvela asimismo composiciones farmacéuticas y el uso de composiciones que consisten o consisten esencialmente en

un AGP;

un AGP en combinación con una emulsión de aceite en agua;

3D-MPL;

35 3D-MPL en combinación con QS21 y liposomas.

Se desvelan asimismo composiciones farmacéuticas, y el uso de composiciones, que consiste o consiste esencialmente en

un AGP;

un AGP en combinación con una emulsión de aceite en agua;

40 3D-MPL; y

3D-MPL en combinación con QS21 y liposomas;

en combinación con un excipiente adecuado para su uso en un individuo, como pueda ser un ser humano.

Generalmente, una composición farmacéutica es aquella que es adecuada para su administración a un ser humano.

45 Se desvela asimismo, un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, como fosfato de aminoalquil glucosaminida, 3D MPL o MPL en forma de una composición farmacéutica formulada con un inmunoestimulante. El inmunoestimulante puede ser una saponina, como QS21, o puede ser una emulsión de aceite en agua, como por ejemplo una emulsión que comprende adicionalmente tocoferol, o puede ser cualquier otro inmunoestimulante adecuado.

50 En un aspecto de la presente divulgación el agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina es AS03 en combinación con CRX601.

En un aspecto de la presente divulgación el immunoestimulante es un estimulador de la respuesta inmunitaria innata y, en un aspecto, no es un antígeno asociado a una enfermedad concreta.

En un aspecto de la presente divulgación, el agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina no se formula con un CpG oligodesoxinucleótido.

5 También se desvela una composición que comprende un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, combinado con una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno, alfa tocoferol y polisorbato 80, por ejemplo que tiene una dosis para un ser humano de 10,69 mg de escualeno, 11,86 mg de DL- α -tocoferol, 4,86 mg de polisorbato 80, o componentes en esta relación general.

10 También se desvela una composición que comprende una combinación de un agonista de TLR4 desprovisto de endotoxina, como monofosforil lípido A, y un derivado de saponina, en particular, la combinación de QS21 y 3D-MPL tal como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica, en la que QS21 se inactiva con colesterol, tal como se desvela en el documento WO96/33739. En el documento WO95/17210 se describe una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua, que es una formulación adecuada.

15 Tal como se ha mencionado, se puede utilizar una o más de las composiciones desveladas en el presente documento para prevenir o reducir el efecto de los depósitos de proteína amiloide, estimular la inmunidad innata a través de células microgliales, aumentar la fagocitosis de amiloides o prevenir o reducir conductas que están asociadas a patologías como la enfermedad de Alzheimer. Los ejemplos que se ofrecen en el presente documento proporcionan procedimientos adecuados para evaluar estos parámetros.

20 Los depósitos beta amiloides pueden medirse en función del área de las placas en una sección del cerebro, o se pueden evaluar según la concentración total de proteína tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Otros procedimientos adecuados se desvelan en el documento WO2009105641, que se incorpora en el presente documento como referencia.

25 Los efectos de los tratamientos y las composiciones de la invención sobre la conducta asociada a la enfermedad de Alzheimer se pueden evaluar en pacientes humanos o en modelos animales, por ejemplo. Entre los modelos animales adecuados se incluyen modelo de ratón PPA para enfermedad de Alzheimer, modelo de ratón PS1 y modelo PPA/PS1. Véase Richard, K.L. y col. J Neurosci. 28, 5784-5793 (2008).

30 Las pruebas con animales (roedores) adecuadas incluyen una o más pruebas de laberinto de agua en T, test de evitación pasiva, o pruebas de conducta de construcción del nido, tal como se describen en el presente documento (Fillail M. y cols. Cognitive and non-cognitive behaviours in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. Genes Brain Behav. 2009 Mar; 8(2):143-8. Epub 2008 dic. 3. Pub Med PMID: 19077180.). Otras pruebas de conducta que se pueden emplear se describen en el documento WO2009105641, que se incorpora en el presente documento como referencia.

35 La estimulación del sistema inmunitario innato se puede efectuar y/o medir por estimulación de la microglía. En otro aspecto, la respuesta inmunitaria innata se puede evaluar accionando la actividad transcripcional de TLR2 en los tejidos del cerebro, por ejemplo en modelos de animales, ratones, apropiados.

40 Las preparaciones de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar a un mamífero a través de la administración por vía sistémica o mucosa. Dichas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de la administración mucosa al tracto oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La composición de la invención se puede administrar como una única dosis o como múltiples dosis. Asimismo, las composiciones de la invención se pueden administrar a través de diferentes vías para cebado o refuerzo, por ejemplo, dosis de cebado IM y dosis de refuerzo IN.

45 La composición de la presente invención se puede administrar en solitario o con vehículos farmacéuticos adecuados, y puede presentarse en forma sólida o líquida, como por ejemplo comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Un fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP), 3D MPL o MPL o cualquier composición de la invención, se puede formular en una "vacuna" y administrarse libre en solución, o se puede formular con un adyuvante o excipiente. La preparación de la vacuna se describe de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). Fullerton, patente estadounidense 4.235.877, describe la encapsulación dentro de liposomas. Las vacunas de la
50 presente invención se pueden conservar en solución o se pueden liofilizar.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de un paciente que tiene depósitos amiloides o EA varían dependiendo de muchos factores diferentes, entre los que se incluyen el medio de administración, el sitio de la diana, el estado fisiológico del paciente, otras medicaciones administradas, el estado físico del paciente en relación con otras complicaciones médicas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. La
55 posología de tratamiento deberá valorarse para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de agonista depende de si se administre o no un adyuvante también. Las dosis al paciente del agonista descrito en el presente documento oscilan típicamente entre aproximadamente 0,1 μ g y 50 mg por administración, que, dependiendo de la

aplicación, podrían administrarse diariamente, semanalmente o mensualmente, o cualquier intervalo de tiempo comprendido en ellos. Más generalmente, las dosis mucosal o local oscilan entre aproximadamente 10 µg y 10 mg por administración, y opcionalmente entre aproximadamente 100 µg y 1 mg, espaciándose 2-4 administraciones días o semanas. Más generalmente, las dosis estimulantes inmunes oscilan entre 1 µg y 10 mg por administración, siendo lo más normal, entre 10 µg y 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento para administración parenteral, p.ej., para inducir una respuesta inmunitaria innata, o en vehículos de suministro especializados, oscilan normalmente entre aproximadamente 0,1 µg y 10 mg por administración, que, dependiendo de la aplicación, podrían administrarse diariamente, semanalmente o mensualmente o cualquier intervalo de tiempo comprendido en ellos. Más generalmente las dosis parenterales para este fin oscila entre aproximadamente 10 µg y 5 mg por administración, siendo sobre todo normal de aproximadamente 100 µg a 1 mg, espaciándose 2-4 administraciones días o semanas. En algunos modos de realización, sin embargo, las dosis parenterales para estos fines pueden utilizarse en el intervalo de 5 a 10.000 veces más que las dosis normales que se han descrito.

Para evitar cualquier duda, los autores de la invención pretenden que las expresiones y términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento se puedan sustituir opcionalmente por las expresiones y términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en la(s) reivindicación(es) "que comprende" (y cualquier forma conjugada de comprender, como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma conjugada de tener, como "tienen" o "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma conjugada de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "que contienen" (y cualquier forma conjugada de contener, como "contiene" o "contienen") son inclusivos o están abiertos y no excluyen elementos adicionales o etapas de procedimiento no citados.

Las realizaciones en el presente documento que se refiere a "composiciones de vacuna" de la divulgación también son aplicables a realizaciones que se refieran a "composiciones inmunogénicas" de la divulgación y viceversa. El término "aproximadamente" (o "alrededor de") en todos los valores numéricos permite una variación del 5 %, es decir, un valor de aproximadamente 1,25% significaría entre 1,19% y 1,31 %.

El uso de la palabra "un" o "uno" cuando se utilizan en combinación con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva pueden significar "uno", pero también se ajustan al significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones sirve para referirse a "y/o" a no ser que se indique de manera explícita que se refiere a alternativas solamente o que las alternativas se excluyan entre sí, aunque la divulgación apoye una definición que se refiera solamente a alternativas, así como "y/o". A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para la medida, empleándose el procedimiento para determinar el valor o la variación que existe entre los pacientes del estudio.

La expresión "o combinaciones de los mismos", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados precediendo al término. Por ejemplo, se pretende que A, B, C, o combinaciones de los mismos incluya al menos uno entre: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC y, si el orden es importante en un contexto en particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen de forma expresa combinaciones que contienen repeticiones de uno o más de los artículos o el término, como BB, AAA, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. Las personas especializadas en la técnica, entenderán que normalmente no existe ningún límite en el número de artículos o términos en ninguna combinación, a no ser que resulte evidente de otra forma con el contexto.

Todas las composiciones y/o los procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento se pueden realizar y ejecutar sin una experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y procedimientos de la presente divulgación han sido descritos en lo que se refiere a realizaciones adecuadas, para las personas especializadas en la técnica será evidente que son aplicables variaciones de las composiciones y/o procedimientos, así como en las etapas o la secuencia de las etapas del procedimiento que se describe en el presente documento sin por ello alejarse del concepto, espíritu y ámbito de la divulgación. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones en este sentido, evidentes para las personas especializadas en la técnica, entran dentro del espíritu, ámbito y concepto de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que las realizaciones en particular descritas en el presente documento se presentan a título ilustrativo y no como limitación de la divulgación. Los rasgos principales de la divulgación se pueden emplear en varias realizaciones sin por ello alejarse del ámbito de la divulgación. Las personas especializadas en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar mediante un simple estudio rutinario, numerosos equivalentes de los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Se considera que dichos equivalentes entran dentro del ámbito de la presente divulgación. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de especialización de los expertos en la técnica en la que se encuadra la presente divulgación.

La presente divulgación se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos que no son exhaustivos:

Ejemplos

En los ejemplos y las Figuras que se describen a continuación, todas las referencias a MPL son referencias 3D-MPL.

Ejemplo 1

Activación innata en el cerebro tras una única inyección de CRX524 o CRX527 o CRX601 o 3D MPL.

- 5 Se ha demostrado que los ligandos de TLR4, como LPS, inducen la expresión conjunta de ARNm TLR2 (Fan, J., Randall, S.F., Malik, AB., 2003. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. 112 (8): 1234. J Clin Invest.). Hasta ahora, no se ha presentado en la bibliografía ningún otro mimético de LPS que induzca la activación innata dentro del cerebro a partir de inyección periférica. Uno de los primeros receptores inmediatos dentro del cerebro activado por el agonista de TLR4 es el ARNm TLR2 (P. A. Carpentier, D. S. Duncan, y S. D. Miller, "Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection y autoimmunity," Brain, Behavior, y Immunity, vol. 22, no. 2, pp. 140-147, 2008.).

Para evaluar la activación innata dentro del cerebro, los inventores realizaron la hibridación *in situ* 24 horas después de la inyección sistémica de 3D MPL, CRX524 o CRX527 o CRX601 utilizando la ruta intraperitoneal.

- 15 Concretamente, GSK Bio inyectó diferentes composiciones a ratones C57BL/6J para evaluar la potencia de los adyuvantes al cabo de 24 horas de la inyección periférica para desencadenar la activación de célula microglial en el cerebro. Los grupos de estudio con animales fueron:

1. NaCl 0,9 % (n=5), inyecciones i.p.
2. CRX524 (20 mg/ratón, 130 ml, n=5/ grupo), inyecciones i.p.
3. CRX527 (20 mg/ratón, 130 ml, n=5/ grupo), inyecciones i.p.
- 20 4. CRX601 (20 mg/ratón, 130 ml, n=5/ grupo), inyecciones i.p.
5. 3D MPL (50 mg/ratón, 130 ml, n=5/ grupo), inyecciones i.p
6. AS01 B (1/10 de dosis para humano mg/kg, 50 ml, n=5/ grupo), inyecciones i.m. (intramuscular).

- 25 GSK Bio aplicaron varias inyecciones a ratones C57BL6 en el Centre de biologie experimentale de l'INRS-IAF con arreglo al protocolo aprobado por el IACUC. 24 horas después de las inyecciones, se anestesió profundamente a los ratones por inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de ketamina y xilazcina y, a continuación, se perfundieron intracardialmente con solución salina al 0,9 % enfriada con hielo seguido de 4% paraformaldehído (PFA) en 0,1 M de tampón borax, pH 9,5, a 4 °C. Se extirparon rápidamente los cerebros de los cráneos, se fijaron posteriormente en PFA 1-3 d a 4 °C y fueron enviados al Centro Hospitalario Universitario de la Universidad de Laval. Fueron crioprotectados en 10% de sacarosa diluida en PFA durante toda la noche. Se seccionaron los
- 30 cerebros congelados en secciones coronales de 25 µm de espesor utilizando un micrótopo (Reichert-Jung, Cambridge Instruments Company), y se recogieron los cortes en una solución crioprotectora (0,05 M tampón fosfato sódico, buffer, pH 7,3, 3 0% etilen glicol, y 20% glicerol, se conservó a -20 °C).

Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

- 35 Se montó cada 12ª sección de cortes del cerebro, comenzando desde el extremo del bulbo olfatorio hasta el extremo de la corteza cerebral, sobre portaobjetos de microscopio Colorfrost/Plus (Fisher Scientific). Se llevó a cabo la localización histoquímica de la hibridación *in situ* del transcrito TLR2 utilizando sonda de ARNc ³⁵S-marcada. Se llevaron a cabo la síntesis de ribosonda y la preparación de hibridación *in situ* de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente (Laflamme y col., 1999 (Neuroscience 1999 ene.; 88(1):223-40); Laflamme y Rivest, 2001 (FASEB Journal. 2001; 15:155-163); Nadeau y Rivest, 2000 (Neurosci 20: 3456-3468); Naert y col., 2009).

- 40 Se realizó el marcado dual combinando inmunocitoquímica e hibridación *in situ* tal como se ha descrito anteriormente (Laflamme y Rivest, 2001; Nadeau y Rivest, 2000 más adelante) para localizar transcritos TLR2 en microglía (marcado iba-1). Los inventores utilizaron una molécula adaptadora de unión a calcio anti-ionizada de conejo policlonal 1 (iba-1, 1:3000, Wako Chemicals) para teñir microglia. Todas las imágenes fueron capturadas utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una cámara digital (Qimaging), se trataron para mejorar el
- 45 contraste y la nitidez con Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems), y a continuación, se montaron con Adobe Illustrator (Adobe Systems). Las imágenes descritas en los diferentes paneles son representativas de la señal detectada en los portaobjetos de cada grupo de ratones.

- En el presente documento, (Figura 1), los inventores demuestran que ARNm TLR2 se activa claramente en las regiones ventriculares y en el plexo coroideo tras la inyección de CRX524 (panel b), CRX527 (panel c) y CRX601 (panel d). En menor grado, los inventores demuestran que 3D MPL activa transcripción del ARNm de TLR2 (panel e y f). Para determinar la localización de los transcritos de TLR2, realizaron un inmunomanchado de recuento utilizando el marcador de célula microglial (Iba 1) (véase panel g).
- 50

Ejemplo 2, Figura 2

Se midió la citoquina (TNFα) en sueros de ratón tras inyección periférica (2 h después de la inyección) de 3D MPL u

otras moléculas agonistas de TLR4 desprovistos de endotoxina. En la Figura 2 se muestran los resultados.

Ejemplo 3, Figuras 3 - 7

Regulación a la alza del número de monocitos en la circulación tras la inyección de composiciones que comprenden agonista de TLR4s desprovisto de endotoxina, tales como 3D MPL, AS01 B, AS15, CRX527 o CRX601.

5 Los monocitos son las células precursoras de microglía de sangre periférica (Rezaie, P., y col 1999. Microglia in the human fetal spinal cord-patterns of distribution, morphology and phenotype. Brain Res. Dev. Brain Res. 115:71-81; Mildner y col. Nat Neurosci. 2007 Dic; 10 (12):1544-53. Epub 2007 Nov 18. PubMed PMID: 18026096.). Durante el desarrollo embrionario, la microglía puebla el SNC a partir de precursores de linaje mielóide en la médula ósea y estas células están en circulación en la sangre periférica antes de convertirse en macrófagos en sus tejidos infiltrantes, como la microglía para el cerebro. Marcadores como CD11 b y Ly6C son marcadores inmunológicos que están presentes en monocitos de la sangre periférica y persisten cuando infiltran el cerebro (Mildner y col., 2007 infra, Lebson L, y col Trafficking CD11 b-positive blood cells deliver therapeutic genes to the brain of amyloid-depositing transgenic mice. J Neurosci. 2010 Jul 21; 30(29):9651-8. PubMed PMID: 20660248.). Para investigar si 3D MPL con contenidos en adyuvantes y s contribuyen en la inducción del número de monocitos en la sangre periférica, los inventores aplicaron una única inyección de esas moléculas y la medición al cabo de 24 horas (tras la inyección) del número de monocitos CD11b+ a través de un procedimiento de citometría de flujo (Mildner A, y col Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. Nat Neurosci. 2007 dic.; 10(12):1544-53. Epub 2007 Nov 18. PubMed PMID: 18026096). Tal como se describe en la Figura 3, los inventores demuestran un aumento del número de monocitos CD11b+ que tienen la composición fenotípica de los marcadores: CD11b+, coctel de linaje negativo (CD3-, B220-, NK1.1-, Ly6G-) tras la inyección de 3D MPL o AS15 o AS01B o CRX527 o CRX601. En comparación con el recuento del número de monocitos normal en la sangre periférica, que es 5%, la inyección intramuscular (i.m.) de AS01 B, y AS15 presenta un aumento del número de monocitos en la circulación de hasta 20 %. Además, la inyección de 3D MPL o CRX601 o CRX601 utilizando la ruta intraperitoneal también muestra un 22 % de monocitos en tota en la sangre periférica. En un menor grado, la inyección intramuscular de CRX601 o 3D MPL presentan un aumento del número de monocitos (hasta 12% y 13% respectivamente).

Resultados

En el presente documento, en la Figura 4, una dosis de 5 ug de 3D MPL es suficiente para accionar un doble aumento de monocito CD11 b+ en la sangre periférica. La mayor dosis de 3D MPL intramuscular (50ug) presenta una caída del recuento de monocitos en la sangre periférica al cabo de 24 horas.

En la Figura 5, una dilución de 1/20 de AS01 B es suficiente para accionar un aumento del recuento de monocitos en la sangre periférica. Se aprecia un aumento constante hasta la dosis completa para ratón, es decir, la dosis completa para ratón AS01 B contiene 5 µg de 3D MPL y 5 µg de QS21.

En la Figura 6, los autores de la invención realizaron un análisis de dilución completo de CRX601 para identificar la dosis óptima de CRX601 que activan el número de monocitos CD11b+. Después del ensayo con seis dosis crecientes de CRX601 los inventores demostraron que una cantidad de 1 µg de CRX 601 es suficiente para accionar un aumento del recuento de monocitos dentro de la sangre periférica. Se aprecia un aumento constante hasta la respuesta máxima a 10 µg de dosis y el efecto se modula a la baja a una dosis de 20 ug.

En la Figura 7, los inventores realizaron un análisis de dilución del CRX601 combinado con una dosis constante de AS03. Se calculó el número de monocitos en la sangre periférica seguido de una única inyección intramuscular de diferentes dosis de CRX601 (de 0,2 µg a 20 µg).

Procedimientos:

Análisis de citometría flujo:

Se extrajo sangre periférica de ratones C57BL/6 por punción cardíaca con litio-heparina como anticoagulante, 24 horas después de la inyección de los adyuvantes de TLR. Se realizó la lisis de glóbulos rojos dos veces en sangre de estasis con tampón a base de cloruro de amonio (Sigma, Steinheim, Alemania) y se hizo el recuento de las células con EasyCount™ System (Immunicon). Después de una etapa de lavado, se incubaron 500.000 células con CD16/CD32 anti-ratón de rata (BD Fc Block™ de BD Biosciences) durante 10 minutos sobre hielo y se volvieron a incubar las células durante 30 minutos con una combinación de los siguientes anticuerpos directamente conjugados a su concentración óptima predeterminada, tal como describe Mildner y col., 2007): estreptavidina marcada con PerCP, CD3 anti-ratón de hámster PE, CD45R/B220 anti ratón de rata, Ly-6G anti-ratón de rata, CD11b anti-ratón de rata conjugado con NK 1.1 APC anti-ratón de ratón, CD11c anti-ratón de hámster conjugado con PE-Cy7. Ly-6C anti-ratón de rata-FTC (todos ellos de BD Biosciences) y CD62L anti-ratón de rata Pacific Blue™ (BioLegend, San Diego, CA). Finalmente, se lavaron las células tres veces y se fijaron durante 15 minutos con una solución 2% de paraformaldehído en PBS. Se incluyeron siempre controles de fluorescencia menos uno (FMO) en los ensayos para el ajuste de compensación fluorescente.

Se introdujeron las muestras en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II) y se analizaron los datos con el programa informático FACSDiva (BD Biosciences).

Los monocitos se identificaron por sus propiedades de dispersión lateral/directa, excluyendo el residuo y se seleccionaron como CD3-/CD45R/B220-/Ly-6G-/NK1,1-(linaje-)/células CD11b+. La frecuencia de monocitos CD11b+ se registró como porcentaje del total de células excluyendo el residuo.

Ejemplo 4, Figura 8

Para empezar a examinar la función del aumento de monocitos en la sangre periférica, los inventores examinaron la capacidad de dichos monocitos para absorber Aβ42 en un tubo de ensayo. Para medir la actividad fagocítica, utilizaron HiLyteFluo Aβ42 fluorescente (Anaspec Inc). El análisis de citometría de flujo demostró que la inyección intramuscular de AS01 B (dosis completa para ratón) o CRX601 (2 mg de dosis) acciona los monocitos para ser capaces de absorber una mayor cantidad de Aβ42 en comparación con monocitos de ratón no adyuvantes (grupo PBS).

Ejemplo 5, Figuras 9 -12

Para determinar si el agonista de TLR4 desprovisto de endotoxinas mejora el deterioro cognitivo y la eliminación de de Aβ en ratones PPA/PS1.

Inyecciones

Cinco grupos de ratones PPA_{Swe}/PS1 recibieron una vez a la semana, durante un período de 12 semanas, el siguiente tratamiento:

- Gr1: PPA_{Swe}/PS1 + NaCl 0,9 % n (=20), inyecciones i.p.
- Gr4: PPA_{Swe}/PS1 + CRX527 (20 mg/ratón, 130 ml, n=10), inyecciones i.p.
- Gr5: PPA_{Swe}/PS1 + CRX601 (20 mg/ratón, 130 ml, n=10), inyecciones i.p.
- Gr6: PPA_{Swe}/PS1 + 3D MPL (50 mg/ratón, 130 ml, n=10), inyecciones i.p.
- Gr8 PPA_{Swe}/PS1 + AS15
- Gr9: PPA_{Swe}/PS1 + AS01B (1/10 de dosis para ser humano mg/kg, 50 ml, n=10), inyecciones i.m.

Grupo	Agonista	n = t ₀	n = t ₁₂
1	Salina	20	19
4	CRX527	10	9
5	CRX601	10	10
6	3D-MPL	10	9
8	AS15	10	10
9	AS01b	10	10

1.2 ANÁLISIS CONDUCTUAL

Laberinto de agua en T

Se sometió a ensayo a los ratones durante la fase del día “con luz”. Se ocultó al experimentador de la conducta el estado genético y de tratamiento de los animales. Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente de hipocampo, se entrenó a los ratones en la tarea del laberinto de agua en T. En dicho paradigma, se evaluó la capacidad del ratón para recordar la localización espacial de la plataforma sumergida. El aparato del laberinto T (longitud del eje, 64 cm; longitud de los brazos, 30 cm; ancho, 12 cm; altura de las paredes, 16 cm), estaba fabricado de fibra de vidrio transparente y relleno con agua (23 ± 1°C) a una altura de 12 cm. Se colocó una plataforma (11x11 cm) en el extremo del brazo objetivo y se sumergió 1 cm por debajo de la superficie. La fase de adquisición permite evaluar el aprendizaje espacial izquierda-derecha de los animales. Durante los primeros dos intentos, se colocaron plataformas en cada uno de los brazos del laberinto para determinar la preferencia de vuelta espontánea del ratón. Tras estos dos intentos, se reforzó el brazo menos elegido con la plataforma de escape. Se colocó a los ratones en el eje del laberinto en T, que eligieron nadar hacia la izquierda o hacia la derecha hasta que encontraron la plataforma sumergida y se escaparon con ella, hasta un máximo de 60 s. Después de alcanzar la plataforma, los ratones permanecieron sobre ella durante 20 segundos y después se los volvió a colocar inmediatamente en el laberinto. Si los animales no encontraban la plataforma dentro de este límite, se los guio hacia ellos suavemente. Se repitieron los intentos el mismo día hasta un máximo de 48 pruebas. Se reservó un período de descanso de al menos 10-15 minutos entre cada bloque de 10 intentos. Se consideró que un ratón había aprendido la tarea cuando

no cometió ningún error en un bloque de cinco intentos consecutivos. 48 horas después se llevó a cabo una fase de aprendizaje inverso.

5 Durante esta fase, se repitió el mismo protocolo, con la excepción de que se entrenó a los ratones para que encontraran la plataforma de escape en el lado opuesto a aquel en el que habían aprendido en la fase de adquisición. Se midió el número de intentos para alcanzar el criterio (cinco de cinco elecciones correctas realizadas en intentos consecutivos) fue medido, así como la demora para encontrarla plataforma de escape.

Prueba de evitación pasiva

10 Basándose en la tendencia natural del animal a preferir un entorno oscuro, se evaluó también la retención de la memoria no espacial de los animales para realizar una tarea de evitación pasiva con un solo intento. Se dividió en dos secciones el aparato de evitación pasiva (Ugo Basile), una iluminada (el compartimento de partida) y una oscura (el compartimento de escapada). El suelo de cada uno de los compartimentos contenía una rejilla, estando electrificada con un generador solamente la del compartimento oscuro. El día del entrenamiento, se colocó a los ratones en el compartimento iluminado durante un período de aclimatación de 60 segundos. A continuación, se abrió la puerta de tipo guillotina y se registró la demora en entrar en el lado oscuro. Inmediatamente después de entrar en el compartimento oscuro, se cerró la puerta y se lanzó una descarga eléctrica (0,5 mA durante 2 s). Se mantuvo al ratón en el compartimento oscuro durante 10 s antes de retornarlo a su jaula habitual. Al día siguiente, se volvió a colocar a los ratones en el compartimento con luz y se midió el tiempo que tardó el animal en cruzar al lado oscuro durante hasta 300 s.

Conducta de construcción del nido

20 A continuación, se observó la conducta de construcción del nido para determinar los cambios en el estado emocional (p.ej. apatía). Se ha observado una menor tendencia a construir el nido en modelos ratones con lesiones hipocampales de la enfermedad de Alzheimer (Deacon, 2006). Se alojó a cada uno de los ratones individualmente en una jaula que contenía serrín y en la que se introdujo un trozo de algodón de 5 x 5 cm para dar cabida a la conducta de construcción del nido. Transcurrido un día, se determinó la calidad del nido con arreglo a una escala de cinco puntos descrita por Deacon (2006): 1-Nido aparentemente intacto, 2- Nido parcialmente rasgado, 3- Nido desmenuzado pero sin un lugar para anidad, 4- Nido plano observable, 5- Nido perfecto (casi) observable.

ANÁLISIS DE TEJIDO

30 Se anestesió a los ratones con isoflurano y se extrajo la sangre por punción cardiaca antes de sacrificar por decapitación a los ratones. Se extrajeron rápidamente los cerebros del cráneo y se colocaron en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS). A continuación se separaron los hemisferios cerebrales y se retiraron los bulbos olfativos y el cerebelo. Se congeló rápidamente uno de los hemisferios cerebrales en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C para el análisis de proteína. Se fijó posteriormente el otro durante 2-4 días en 4% paraformaldehído (PFA), pH 9,5 a 4 °C, y a continuación, se colocó en una solución PFA que contenía 10 % de sacarosa, durante toda la noche a 4 °C. Se montaron los cerebros congelados sobre un micrótopo (Reichert-Jung) y se cortaron en secciones coronales de 25- μ m. Se recogieron los cortes en una solución de crioprotección fría (0,05 M tampón fosfato sódico, pH 7,3, 30% etilen glicol y 20% glicerol) y se conservó a -20°C hasta la inmunocitoquímica o la histoquímica de hibridación *in situ*.

Análisis estereológico.

40 Todos los análisis histológicos cuantitativos fueron realizados por un observador al que se le ocultó el estado de tratamiento del material. Para hacer el recuento de placas A β , se inmunomancharon secciones de ratones PPA_{Swe}/PS1 para determinar A β (ratón policlonal 6E10 anti-A β , 1:3000; Covariance) tal como se ha descrito anteriormente (Richard y col., 2008; Simard y col., 2006). Se seleccionaron dos secciones para la corteza prefrontal a +2,34 y +2,10 mm desde el punto bregma según un atlas esterotáxico (Paxinos and Franklin, segunda edición) y cuatro secciones del hipocampo/corteza cerebral a -1,70, -1,94, -2,46 y -2,92 mm. Se realizó el análisis estereológico imparcial tal como se ha descrito previamente (Boissonneault y col., 2009; Richard y col., 2008; Simard y col., 2006). Brevemente, se trazaron los contornos de la corteza prefrontal, el hipocampo y las zonas de la corteza como una superposición virtual sobre imágenes de alta resolución y se calcularon las áreas. Se determinó el área ocupada por todas las placas marcadas con A β . Se obtuvieron imágenes en tiempo real (1600_1200 pixels) utilizando un microscopio Nikon C80i equipado con platina motorizada (Ludl) y una cámara a color MicrofireCCD (Optronics). Se el aparato funcionó utilizando un programa informático Stereo Investigator diseñado por Microbrightfield. Tanto las zonas de la corteza como las del hipocampo fueron trazadas utilizando un Cintiq 18S interactive pen display (Wacom).

Extracción de proteína y detección de los niveles totales de A β por transferencia de Western.

55 Se extrajeron las proteínas de los hemisferios cerebrales anteriores utilizando un procedimiento modificado del procedimiento publicado por Lesné y col. (Lesné y col., 2006). Todas las manipulaciones fueron realizadas sobre hielo para minimizar la degradación de la proteína. Se colocó un hemisferio del cerebro anterior en una jeringuilla de 1 ml con una aguja de calibre 20. Se añadieron 500 μ l de tampón A (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,01% NP-40, 150 mM

NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), cóctel de inhibidor de proteasa) y se agitó de arriba abajo 10 veces para homogeneizar el tejido, seguido de 5 minutos de centrifugación a 3.000 rpm a 4 °C. A continuación, se recogió el sobrenadante (fracción enriquecida con proteínas extracelulares) y se congeló a -80°C. Se suspendió el sedimento insoluble en 500 µl tampón TNT (Tampón B; 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF, cóctel de inhibidor de proteasa), seguido de 90 minutos de centrifugación a 13.000 rpm a 4 °C. A continuación, se recogió el sobrenadante (fracción enriquecida con proteínas citoplásmicas) y se congeló a -80°C. Se suspendió el sedimento en 500 µl de tampón C (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 1 mM EGTA, 3 % SDS, 1 % desoxicolato, 1 mM PMSF, cóctel inhibidor de proteasa) y se incubó a 4°C, 50 rpm, durante 1 hora. Se centrifugaron las muestras durante 90 minutos a 13.000 rpm y 4 °C y se recogió el sobrenadante (fracción enriquecida con proteínas de membrana) y se congeló a -80°C. Se determinó la concentración de proteínas de cada fracción utilizando el kit de ensayo Quantipro BCA assay kit (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para una detección del total de A β , se separaron 10-30 µg de fracciones de proteína extracelular, citoplásmica y de membrana en un gel precast de 10-20% SDS poliacrilamida Tris-Tricina (Bio-Rad). A continuación, se transfirieron las proteínas separadas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (PerkinElmer Life y Analytical Sciences) y se detectaron por transferencia de western. Se sondearon las manchas de transferencia con un clon 6E10 de anticuerpo monoclonal de proteína anti-beta amiloide de ratón (1:1000, Covariance) en 1M Tris-HCl, pH 8,0, 5 M NaCl, 5% leche descremada, y 0,05% Tween 20. Se visualizaron las manchas de transferencia utilizando anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (1:1000; Jackson Immuno-Research) y quimioluminiscencia potenciada (PerkinElmer Life y Analytical Sciences). Se separaron las membranas en 25 mM glicina-HCl, pH 2,0, que contenía 1% SDS para permitir el revelado de actina utilizando un anticuerpo actina de ratón (MAB1501, 1:5000; Millipore Bioscience Research Reagents) y a continuación anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-ratón de cabra (1:1000; Jackson ImmunoResearch).

La cuantificación se realizó determinando la densidad de integración de las bandas utilizando un sistema de reproducción de imagen con gel (scanner Agfa Arcus II; programa informático NIHImage J, versión 1,32) y se eliminaron los valores del fondo. Se normalizaron los valores ópticos de acuerdo con el control de carga de actina. Los resultados se expresan como una media \pm SEM.

Resultados

En la Figura 9 se muestran los resultados para la carga de placa A β total. Los análisis de la carga de placa A β total revelan una significativa diferencia entre el grupo de control PBS frente al grupo 3D MPL en lo que se refiere a la medida de la carga de placa Abeta por inmunofluorescencia. * indica ANOVA, P=0,05 frente al grupo PBS.

Los resultados del análisis de la conducta se exponen en las Figuras 10 y 11.

En la Fig 10, 12 inyecciones semanales de 3D MPL o CRX527 o CRX601 o AS01 B en un modelo de ratón PPA/PS1 demuestra una mejora en la memoria espacial en comparación con los ratones sin tratar.

En la Fig 11, los animales tratados con AS01 B presentaron una significativa puntuación de retención en comparación con los animales sin tratar. Se midió el tiempo que tardaron en cruzar al otro lado durante la prueba de evitación pasiva tras la 12ª inyección semanal. Los datos se expresan como la media. (+/- SEM (ANOVA en una dirección)).

En la Figura 12 se exponen los resultados de la histología del cerebro.

3D-MPL proporciona una reducción estadísticamente significativa del número de placas beta amiloides.

3D-MPL, CRX 527, CRX 601 y AS01 B proporcionan todos ellos mejoras significativas en la conducta según la evaluación de la prueba de laberinto de agua en T.

Ejemplo 6, Figura 13

Se llevaron a cabo otros experimentos utilizando los siguientes grupos.

Gr 1: PBS i.m. - 12 x semanalmente, control negativo [n=10 (2 hembras)]

Gr 2: CRX-601 i.m. (0,2 ug por ratón) [n=10 (2 hembras)]

Gr 3: CRX-601 i.m. (2 ug por ratón), 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Gr 5: AS03-CRX601 (2ug dosis para CRX601, 1/10 dosis para ser humano de AS03, i.m. 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Gr 6: AS01B i.m (1/10 dosis para ser humano), 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Gr 7: AS01 B i.m (1/50 dosis para ser humano), 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Gr 9: 3D 3D MPL intraperitoneal (como tal en Aim 1), 50 ug por ratón, 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Gr 10: 3D MPL i.m. (5 ug por ratón), 12 x semanalmente [n=10 (2 hembras)]

Los resultados indican que los grupos 3, 5, 9 y 10 mejoraron significativamente en la prueba de laberinto en T inverso en comparación con el grupo 1.

5 Ejemplo 7 Fig. 14

Se inyectaron 3D MPL y PBS en los ratones y se llevó a cabo la determinación del estado de monomerización de beta amiloide intracelular por inmunomanchado utilizando Inmunomanchado: anticuerpo anti A β 1-16. Hubo una reducción de A β monomérico en las fracciones enriquecidas extracelulares de los cerebros a los que se había inyectado 3D MPL.

10 Ejemplo 8 Figura 15

Se observó la fagocitosis de péptido 1-42 beta-amiloide por células microgliales tras la adición de una gama de compuestos de la invención. La mayoría de los compuestos utilizados aumentaron el porcentaje de fagocitosis de péptido 1-42 beta-amiloide por células microgliales humanas. En este experimento, se observó el aumento máximo de fagocitosis con AS01 B y AS15.

15 En la Figura 15, la línea celular de microglía humana (CHME) demuestra que aumenta su actividad fagocítica de A β 42 con la incubación previa durante 18 horas de las células con los adyuvantes. La dosis de adyuvante para dicho ensayo de fagocitosis *in vitro* se basó en el contenido de MPL (es decir 2 ug per ml). El adyuvante Cpg 7909 fue adquirido de Invitrogen y se utilizó a 79 ug por ml. Se utilizó A β 42 a 1 ug por ml en medio completo DMEM (Invitrogen).

20 Ejemplo 9 Figura 16

Se trataron células microgliales humanas durante 18 horas con AS01 B que tenía 1 μ g/ml de 3D MPL, en presencia de 1 μ g/ml de HiLyteFluo A β 1-42. Se llevó a cabo la tinción con rojo de Lysotracker y se montaron los portaobjetos y se tiñeron conjuntamente con DAPI para presentar el núcleo (azul).

25 La imagen representativa de microscopio de fluorescencia de la línea celular microglial human muestra la localización de A β 1-42 dentro del lisosoma tras el tratamiento con AS01 B.

La línea celular microglial human tiene más actividad fagocítica amiloide tras la estimulación con adyuvantes que contienen lípido A. El amiloide se dirige al lisosoma. Las imágenes representativas del experimento anterior se describen en la Fig. 15. Se realizó inmunofluorescencia doble para detectar Abeta dentro del compartimento de lisosoma dentro de la línea celular microglial humana CHME. Se incubaron conjuntamente las células CHME con Abeta 42 fluorescente (HiLyte Fluo 488, Anaspec) a 1 ug por ml y MPL a 1 ug por ml. Los reactivos de rojo de Lysotracker fueron adquiridos de Invitrogen y se utilizaron según las recomendaciones del fabricante.

30

Ejemplo 10: Figuras 17 y 18

Por lo general, la microglía se ven rodeando las placas β amiloides y, en menor medida, dentro de ellas, en los cerebros de Alzheimer y tratando de aclarar placas. Es posible que fuera necesario regular este fenómeno de activación de la microglía como control para evitar el efecto negativo de la activación excesiva de células inmunes en el SNC. Los activadores más potentes de la microglía son los agonistas de receptor 4 de tipo Toll, tales como lipopolisacáridos (LPS). Los LPS provocan una activación innata rápida y fuerte de células cerebrales, como microglía y sus precursores, en la sangre periférica, como puedan ser los monocitos que provienen de las células mieloides de la médula ósea. Sin embargo, los LPS de *E. coli*, *Salmonella* y otras bacterias gram negativas son endotoxinas fuertes, son tóxicas y se ha demostrado que exacerban la neuropatología pre-existente en ratones cuando se inyectan en la sangre periférica. LPS no se pudo utilizar a nivel clínico dada su alta toxicidad. Por lo tanto, para evitar estos efectos negativos, se evaluó en este punto una molécula derivada desintoxicada de lipopolisacárido denominada 3D MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) aislada de bacteria *Salmonella* gram negativa cepa minnesota R595. Los inventores demostraron que 3DMPL administrado por la ruta intraperitoneal promueve el perfil de citoquina atenuado en comparación con LPC, al mismo tiempo que puede activar un aumento de células fagocíticas y la fagocitosis. Esto indica que 3DMPL es más adecuado para inducir la activación de células fagocíticas, p.ej. células microgliales, sin provocar un estallido de citoquinas pro-inflamatorias con el riesgo de exacerbar lesiones neurodegenerativas.

50 De manera similar, los inventores demostraron que AS01B inyectado por la ruta intramuscular, una formulación liposomal que contiene 3D MPL, presenta incluso una actividad biológica entre más atenuada y similar en la producción de citoquina que 3DMPL, lo que sugiere que se puede utilizar en lugar de MPL para conseguir una activación innata sistémica comparable.

Resultados:

Figura 17 - 3DMPL induce una baja respuesta inflamatoria en ratones

Los inventores midieron varias citoquinas y quimioquinas en los sueros de ratones C57BL/6 2 y 6 h después de una única inyección intraperitoneal MPL o LPS. Se observó que la mayoría de los niveles de citoquina y quimioquina habían aumentado en los ratones a los que se les inyectó 3DMPL, pero estos niveles fueron sustancialmente más bajos que los de los animales tratados con LPS (Fig. 17a a k). Los niveles de TNF- α e IL-6 fueron muy altos 2 h después de la inyección de LPS, mientras que se observó un aumento moderado en los ratones a los que se les inyectó 3DMPL, pero se anuló esencialmente al cabo de 6 h. Curiosamente, 2 h después de la inyección, las quimioquinas que están más relacionadas con los monocitos y la activación de microglía como CXCL-1 y CCL2 se modularon respectivamente a niveles similares o más altos en los ratones tratados con MPL en comparación con el grupo de LPS.

Figura 18 - 3DMPL induce una baja respuesta inflamatoria en ratones

Perfil de citoquinas innato de sueros después de inyectar a ratones AS01 B, AS03 o AS04D por ruta intramuscular, se tomaron muestras al cabo de 2 h o 6 h desde el momento de la inyección. Los resultados se muestran en unidades relativas (UR o pg/ml) de varias citoquinas/quimioquinas en sueros para ratones a los que se les inyectó PBS y LPS o MPL al cabo de 2 horas o 6 horas. N = 5 ratones por grupo. Las barras representan la media \pm SEM.

Ejemplo 11 – Análisis de monocitos y recuento tras inyección de adyuvante en ratones.

Se sometieron a ensayo adyuvantes TLR para determinar su capacidad para estimular monocitos periféricos.

24 horas después de la inyección de los adyuvantes TLR, se extrajo sangre periférica de ratones C57BL/6 por punción cardíaca con litio-heparina como anticoagulante. Se realizó la lisis de glóbulos rojos dos veces en sangre de estásis con tampón a base de cloruro de amonio (Sigma, Steinheim, Alemania) y se hizo el recuento de las células con el sistema EasyCount™ (Immunicon). Tras una etapa de lavado, se incubaron 500.000 células con CD16/CD32 anti-ratón de rata (BD Fc Block™ de BD Biosciences) durante 10 minutos sobre hielo y se siguieron incubando las células durante 30 minutos más con una combinación de los siguientes anticuerpos directamente conjugados a la concentración óptima predeterminada, tal como describe Mildner y col., 2007): estreptavidina marcada con PerCP, CD3 anti-ratón hámster PE, CD45R/B220 anti-ratón de rata, Ly-6G anti-ratón de rata, CD11b anti-Ratón de rata conjugada con NK1.1 APC anti-ratón, CD11c anti-ratón de hámster conjugado con PE-Cy7 y Ly-6C anti-ratón de rata FITC (todos ellos de BD Biosciences) y CD62L anti-ratón de rata Pacific Blue™ (BioLegend, San Diego, CA). Finalmente, se lavaron las células tres veces y se fijaron durante 15 minutos con una solución de 2% de paraformaldehído en PBS. Se incluyeron siempre controles de fluorescencia menos uno (FMO) en los ensayos para el ajuste de compensación fluorescente. Se introdujeron las muestras en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II) y se analizaron los datos con el programa informático FACSDiva (BD Biosciences). Los monocitos se identificaron por sus propiedades de dispersión lateral/directa, excluyendo el residuo y se seleccionaron como CD3-/CD45R/B220-/Ly-6G-/NK1,1-(Linaje)/células CD11b+. La frecuencia de monocitos CD11b+ se registró como porcentaje del total de células excluyendo el residuo.

Ejemplo 11 (Figura 19)

Se utilizaron diferentes composiciones para determinar por ensayo la estimulación de monocitos periféricos.

AS01 B es mejor que 3D MPL en solitario para regular a la alza monocitos.

Ejemplo 12 Figura 20

Se tomaron muestras al cabo de 24 horas tras la inyección intramuscular de cada componente por separado, tal como se muestra en la figura 20.

24 horas después de la inyección de cada inmunomodulador o adyuvante, se extrajo sangre periférica de los ratones C57BL/6 por punción cardíaca con litio-heparina como anticoagulante. Se realizó la lisis de glóbulos rojos dos veces en sangre de estásis con tampón a base de cloruro de amonio (Sigma, Steinheim, Alemania) y se hizo el recuento con un sistema EasyCount™ (Immunicon). Después de una etapa de lavado, se incubaron 500.000 células con CD16/CD32 anti-ratón de rata (BD Fc Block™ de BD Biosciences) durante 10 minutos sobre hielo y se siguieron incubando las células durante 30 minutos más con una combinación de los siguientes anticuerpos directamente conjugados a su concentración óptima determinada previamente tal como describe Mildner y col., 2007): estreptavidina marcada con PerCP, PE- CD3 anti-ratón hámster, CD45R/B220 anti-ratón de rata, Ly-6G anti-ratón de rata, CD11b anti-ratón de rata conjugado con NK1.1 APC anti-ratón de ratón, CD11c anti-Ratón de Hámster conjugado con PE-Cy7, Ly-6C anti-ratón de rata FITC (todos ellos de BD Biosciences) y CD62L anti-Ratón de rata Pacific Blue™ (BioLegend, San Diego, CA). Finalmente, se lavaron las células tres veces y se fijaron durante 15 minutos con una solución 2% paraformaldehído en PBS. Se incluyeron siempre controles de fluorescencia menos uno (FMO) en los ensayos para el ajuste de compensación fluorescente. Se introdujeron las muestras en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II) y se analizaron los datos con el programa informático FACSDiva (BD Biosciences). Los monocitos se identificaron por sus propiedades de dispersión lateral/directa, excluyendo el residuo y se seleccionaron como CD3-/CD45R/B220-/Ly-6G-/NK1,1-(Linaje)/células CD11b+. La frecuencia de monocitos

CD11b+ se registró como porcentaje del total de células excluyendo el residuo.

AS01 B y QS21 + liposoma presentan un aumento del número de monocitos muy significativo (panel A) y el estado de activación de monocitos (Ly6C alto) (panel B) al cabo de 24 horas en la sangre periférica de ratón C57BL/6 tras una única inyección.

5 **Ejemplo 13 Figura 21**

Los inventores examinaron la capacidad de los monocitos de absorber A β 42 en un tubo de ensayo. Para medir la actividad fagocítica, se utilizó fluorescente HiLyteFluo para A β 42 (Anaspec Inc). El análisis de citometría de flujo demostró que la inyección intramuscular de DQ (QS21 + liposoma) accionó los monocitos para que fueran capaces de absorber una mayor cantidad de A β 42 en comparación con los ratones a los que se les inyectó PBS o QS21 (5 μ g) o MPL liposomal (5 mg de SUV MPL) o el propio MPL a una dosis de 5 μ g utilizado en este punto. Esto indica que QS21 no promueve la absorción de A β y es necesario liposoma + QS21 para promover el efecto que se ha acaba de describir.

15 Todos los experimentos y ensayos fueron realizados en conformidad con las directrices del Comité Canadiense sobre Cuidado de Animales (CCAC) para experimentación con animales. Los ratones C57BL/6 hembra de ocho semanas fueron obtenidos de los laboratorios Charles-Rivers (St-Constant, Quebec). Se obtuvo el modelo de ratón PPA-PS1 de los laboratorios Jackson, reserva 5866 (Savonenko y col., 2005). Se realizaron las inyecciones intramusculares en los ratones en el gastrocnemio anterior en 50 o 25 μ l dependiendo de los experimentos. Se realizaron las inyecciones intravenosas (100 μ l) en la cola caudal. La composición adyuvante fue la siguiente:

Composición de adyuvante:

20 Para AS01B, AS03 y AS15. La dosis para ratón equivale a 1/10 de la dosis para ser humano.

AS01 B se compone de liposomas que contienen 3D-MPL y QS21 La dosis para ratón de AS01 B contiene 5 μ g de MPL 3D formulado conjuntamente con liposoma neutro, 5 μ g de QS21. Estas dosis son para ratón y fueron inyectadas utilizando la ruta intramuscular (i.m.) 25 μ l por ratón de AS01 B + 25 μ l de PBS (solución salina tamponada con fosfato) o 25 μ l del péptido apropiado.

25 Ensayo de absorción de Ab42 *ex vivo*

Preparación de células: Se extrajo sangre periférica de ratones C57BL/6 por punción cardíaca con litio-heparina como anticoagulante, 24 horas después de la inyección de los adyuvantes utilizados en el presente documento. Se realizó la lisis de glóbulos rojos dos veces en sangre estancada con tampón a base de cloruro de amonio (Sigma, Steinheim, Alemania) y se hizo el recuento de las células utilizando el sistema EasyCount™ (Immunicon).

30 Estimulación de células /fagocitosis A β : se sembraron células a 10⁶ células/ml en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos y se estimularon durante 2 o 24 h en presencia o ausencia de 1 μ g/ml de A β 1-42 HiLyte Fluor™488 (Anaspec, Fremont, CA), que se pre-incubó o no durante 1 h con 1 μ g/ml de anticuerpos anti-amiloide β (p.ej. anti-A β 1-17 IgG1, clon 6E10, Laboratorios Signet, Dedham, MA) o con IgG purificado de suero de ratón (Sigma), como control.

35 Análisis FACS: se recogieron las células tras la incubación con péptido A β fluorescente con Trypsin/EDTA y PBS frío y se lavaron tres veces. Se incubaron 500.000 células en una placa de 96 pocillos durante 10 minutos sobre hielo en presencia de CD16/CD32 anti-ratón de rata (clon 2,4G2 - BD Fc Block™) y se siguieron tiñendo 30 minutos con una combinación de los siguientes anticuerpos directamente conjugados a su concentración óptima pre-determinada: CD3 anti-ratón de hámster PE (clon 145-2C11), CD45R/B220 anti-ratón de rata (clon RA3-6B2), Ly-6G anti-ratón de rata (clon 1A8), NK1.1 anti-ratón de ratón (clon PK136), CD11b anti-ratón de rata conjugado con APC (clon M1/70), CD11c anti-ratón de hámster conjugado con PE-Cy7 (clon HL3), (todos ellos de BD PharMingen). Finalmente, se lavaron las células dos veces y se fijaron durante 15 minutos con solución al 2% paraformaldehído en PBS. Se incluyeron siempre controles FMO en los ensayos.

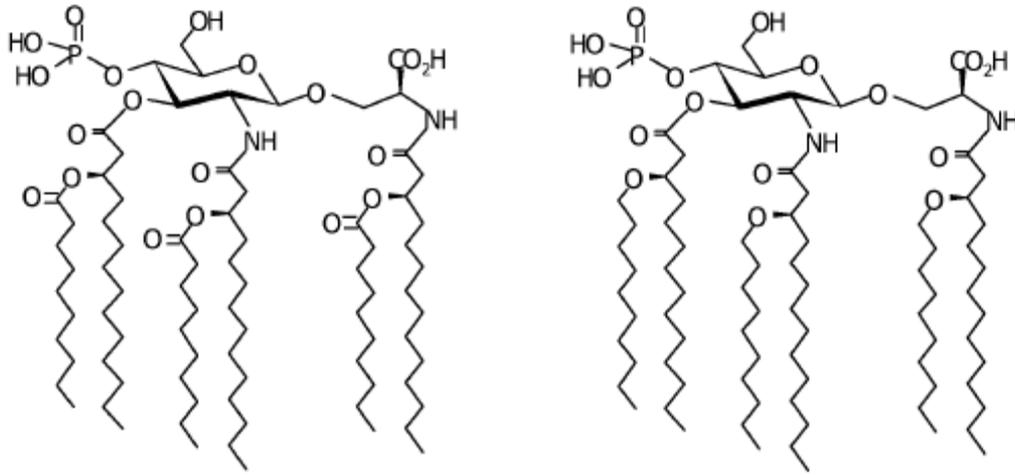
45 Las muestras se introdujeron en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II) y los datos se analizaron con un programa informático FACSDiva (BD Biosciences).

Los monocitos se identificaron por sus propiedades de dispersión lateral/directa, excluyendo el residuo y se seleccionaron como CD3-/CD45R/B220-/Ly-6G-/NK1.1-(linaje-)/CD11b+ células. Se valoró la absorción de A β registrando el porcentaje y la intensidad de fluorescencia media (Media geométrica) de células A β 1-42 luor488 de HiLyte f positivas entre los monocitos seleccionados.

50

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un fosfato de aminoalquil glucosaminida agonista de TLR4, que es



5

CRX527

o

CRX601

desprovisto de endotoxina, para su uso en la prevención y/o reducción de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, tal como se evalúa por la mejora de la memoria espacial en dicho paciente.

10

2. Uso de un fosfato de aminoalquil glucosaminida agonista de TLR4 que es CRX527 o CRX601 desprovisto de endotoxina, en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o reducir la enfermedad de Alzheimer en un paciente, tal como se evalúa por la mejora de la memoria espacial en dicho paciente.

3. Una composición para su uso, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición consiste en CRX527 o CRX601 en combinación con una emulsión de aceite en agua.

Figura 1

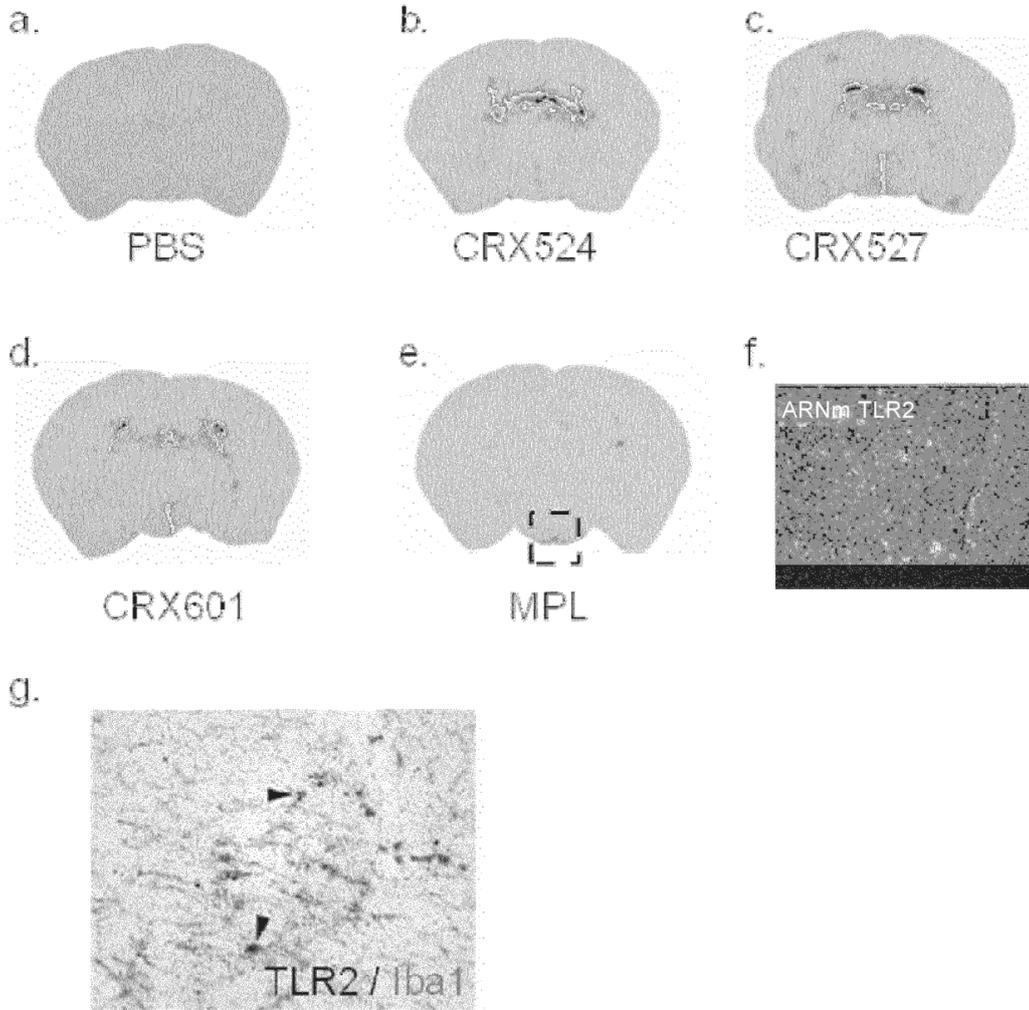


Figura 2

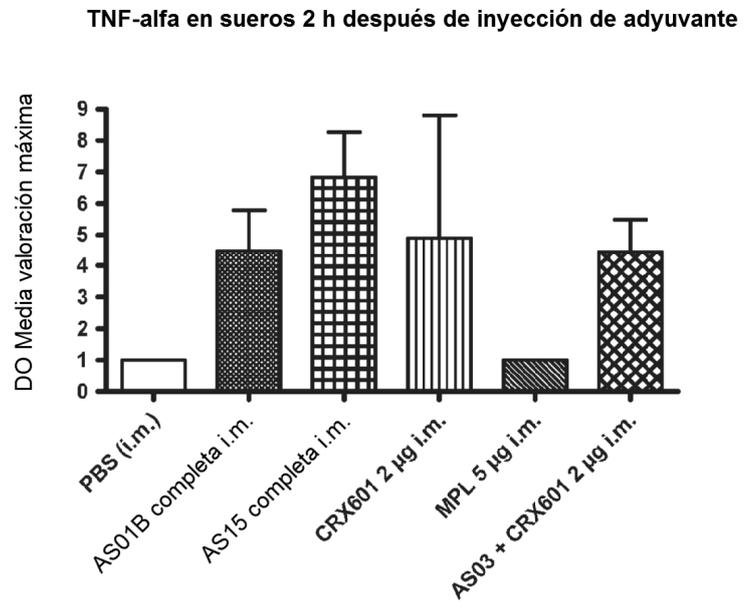


Figura 3

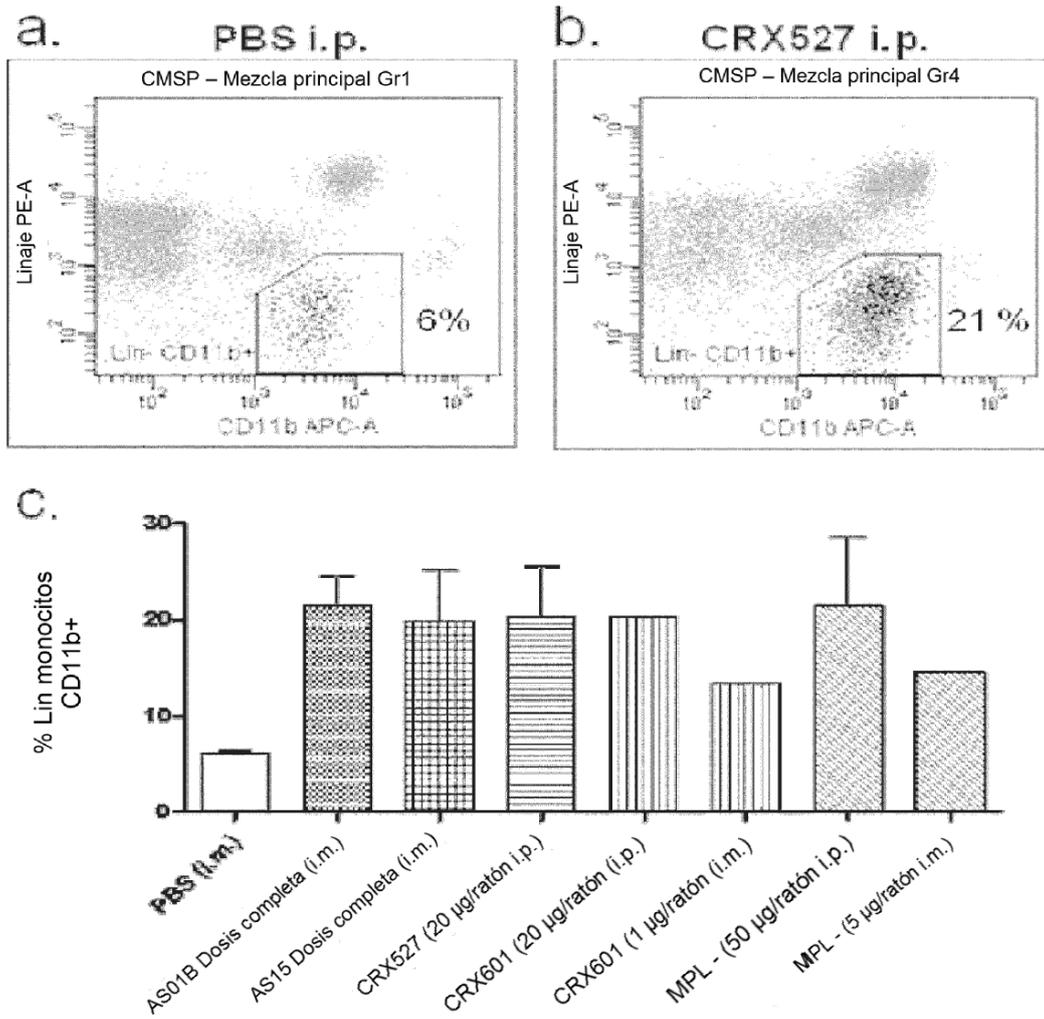


Figura 4

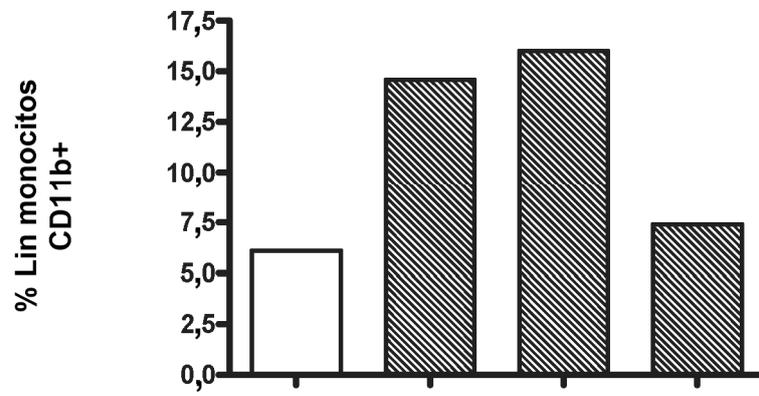


Figura 5

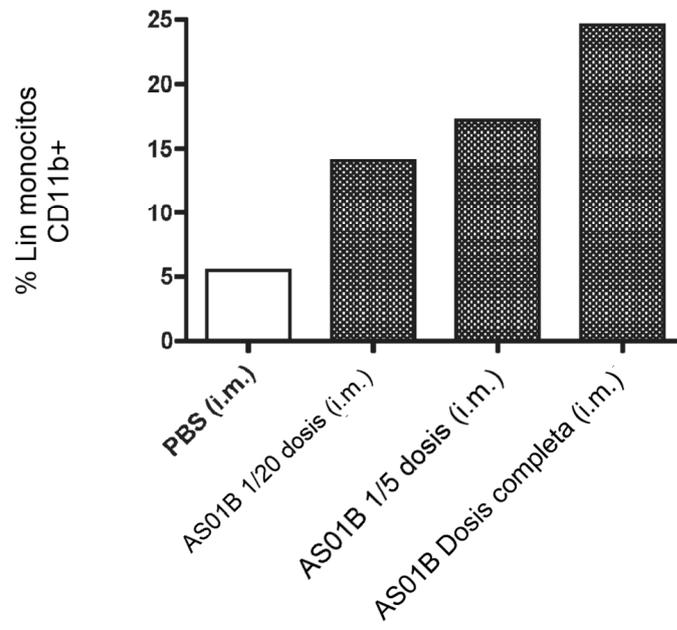


Figura 6

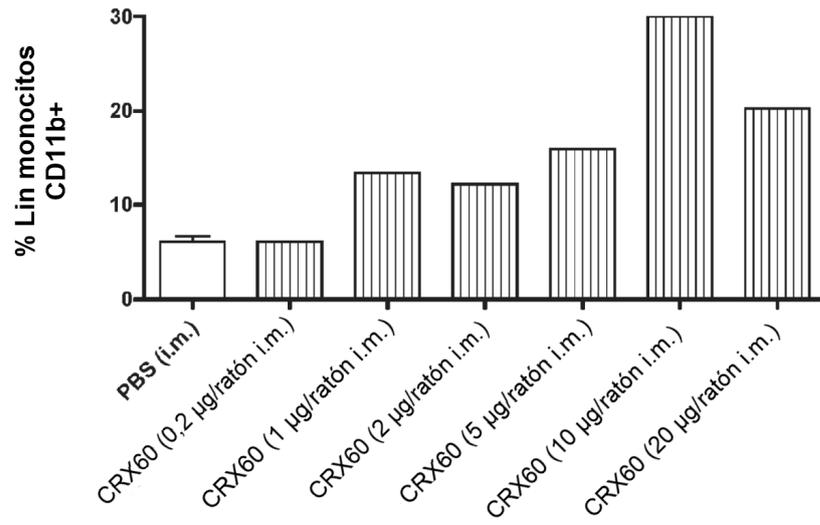


Figura 7

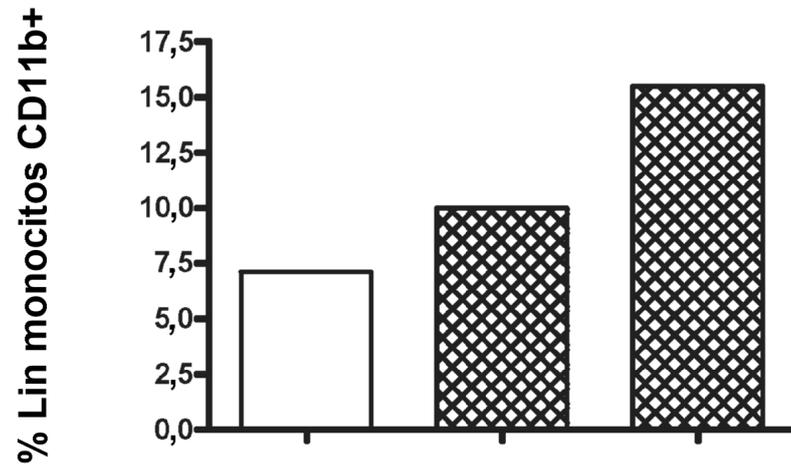


Figura 8

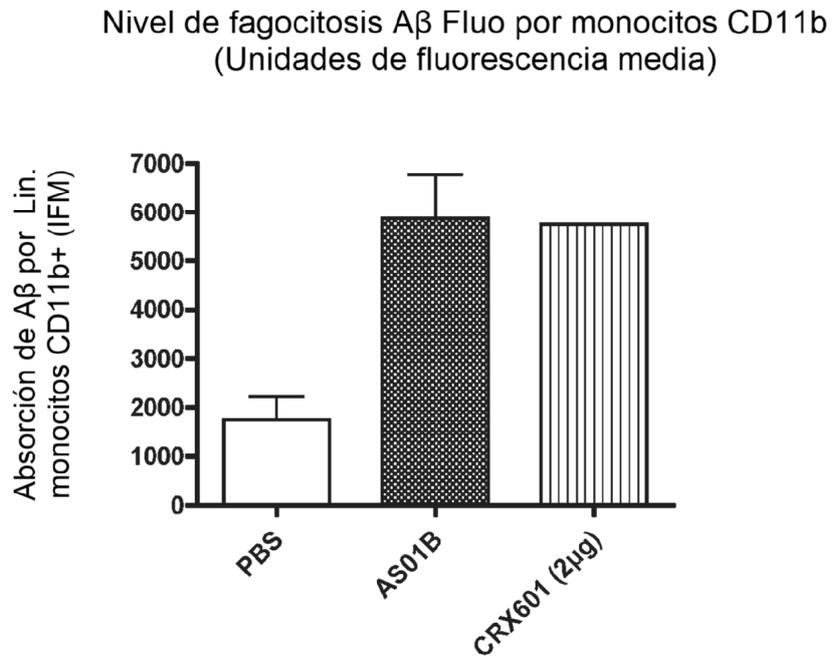


Figura 9

Número de placas A β tras 12 inyecciones semanales

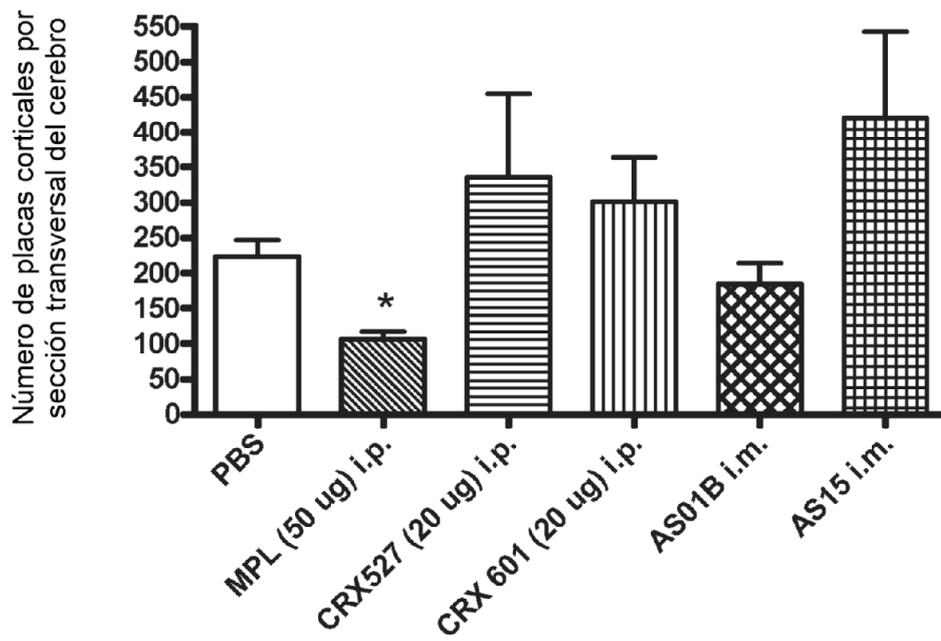


Figura 10

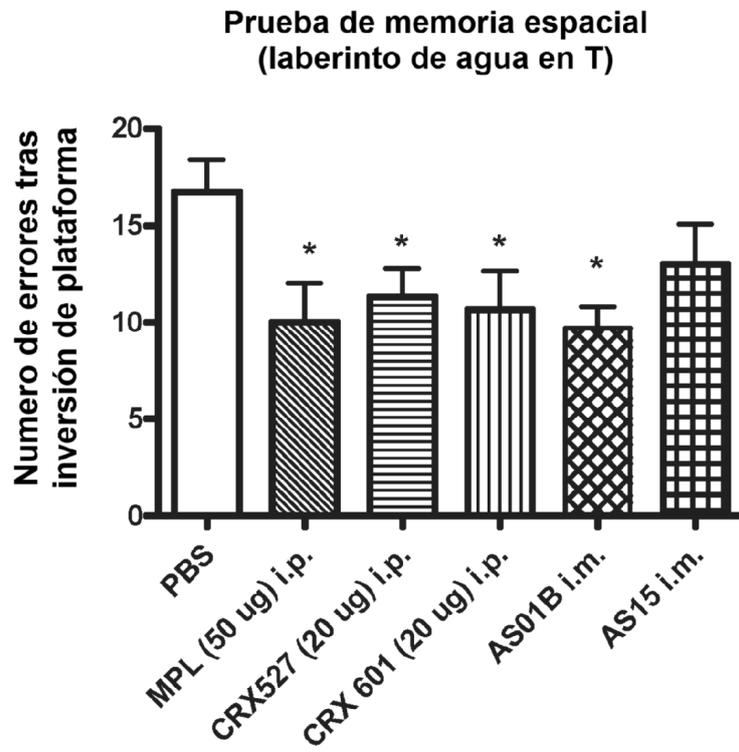


Figura 11

Prueba de retención de evitación pasiva

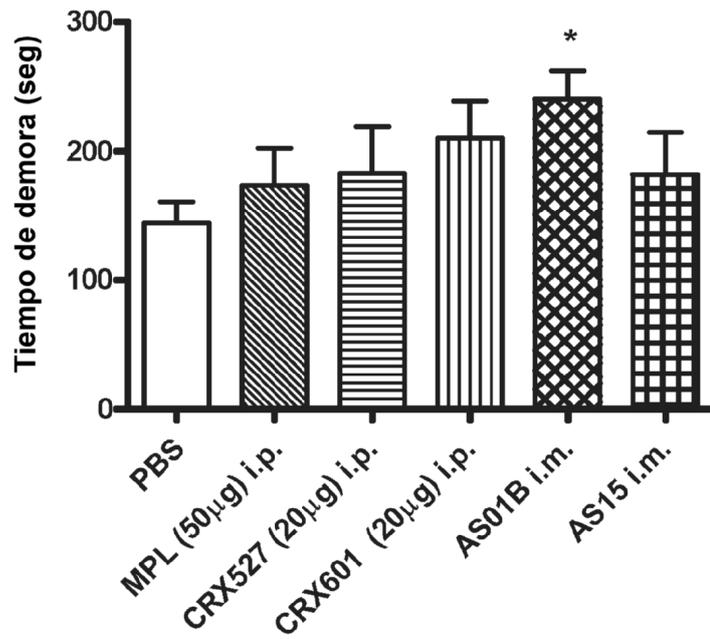


Fig 12:

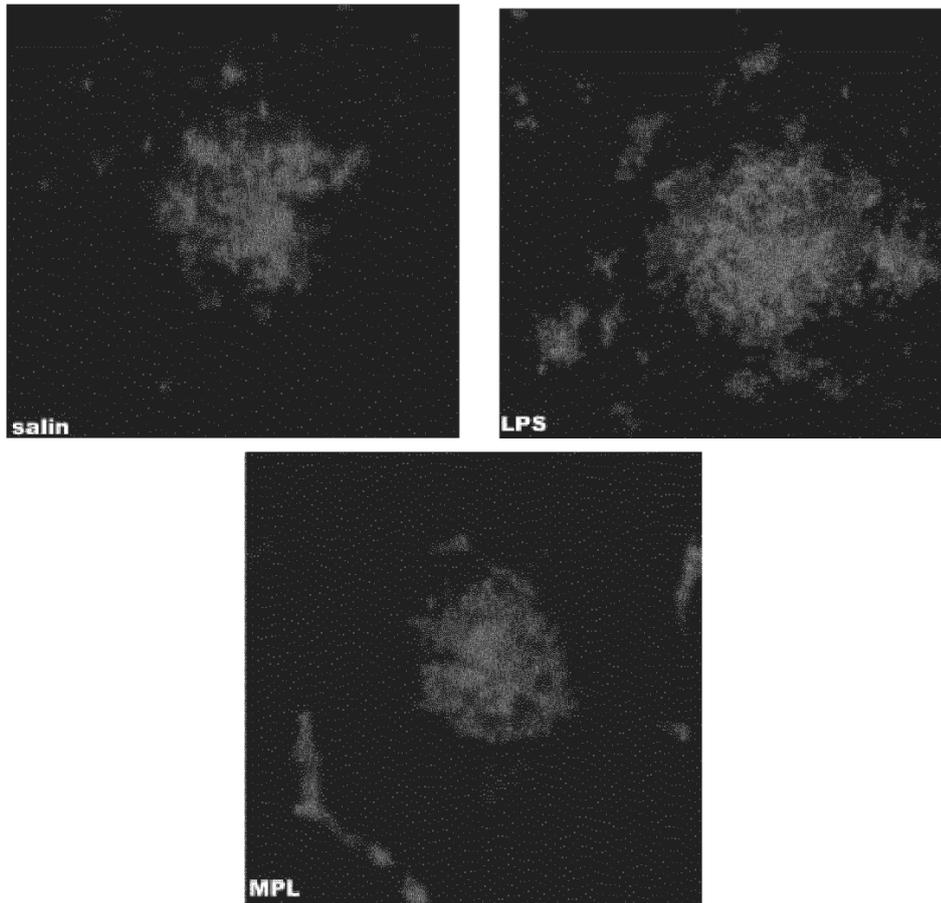


Figura 13

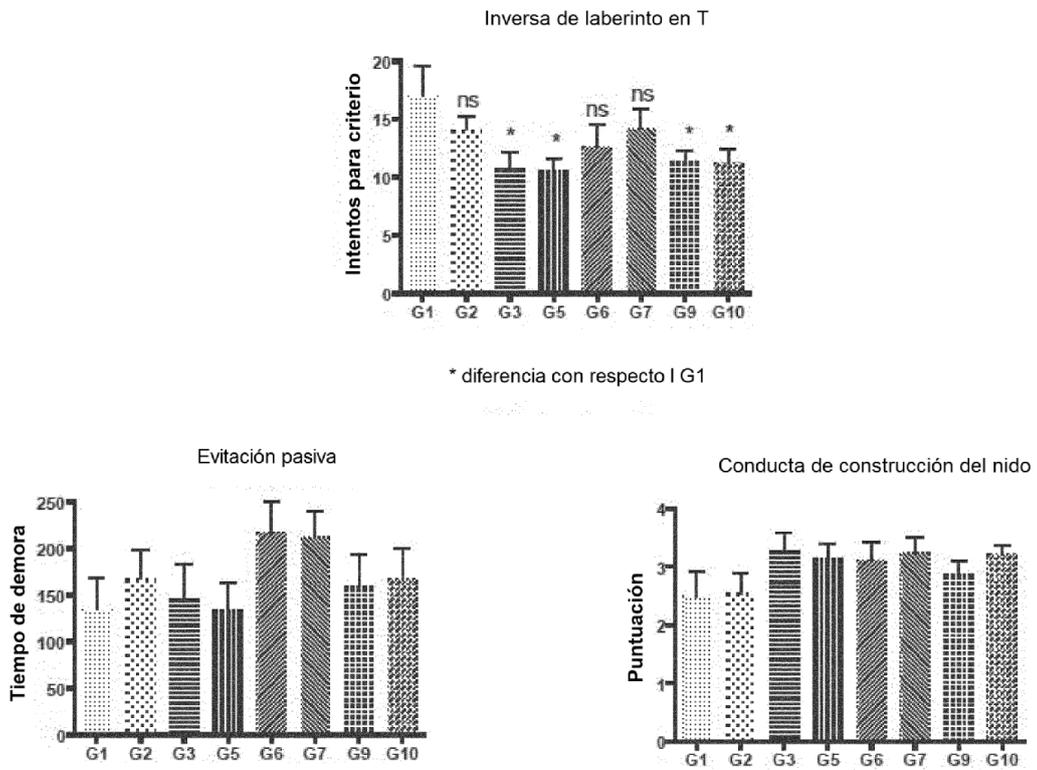


Fig 14.

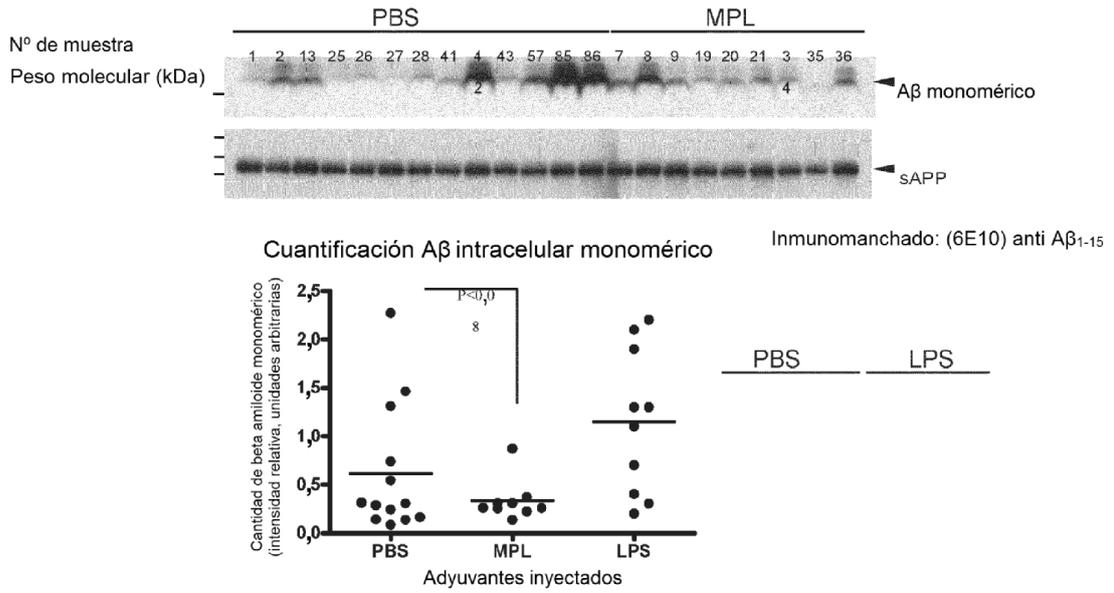


Fig 15

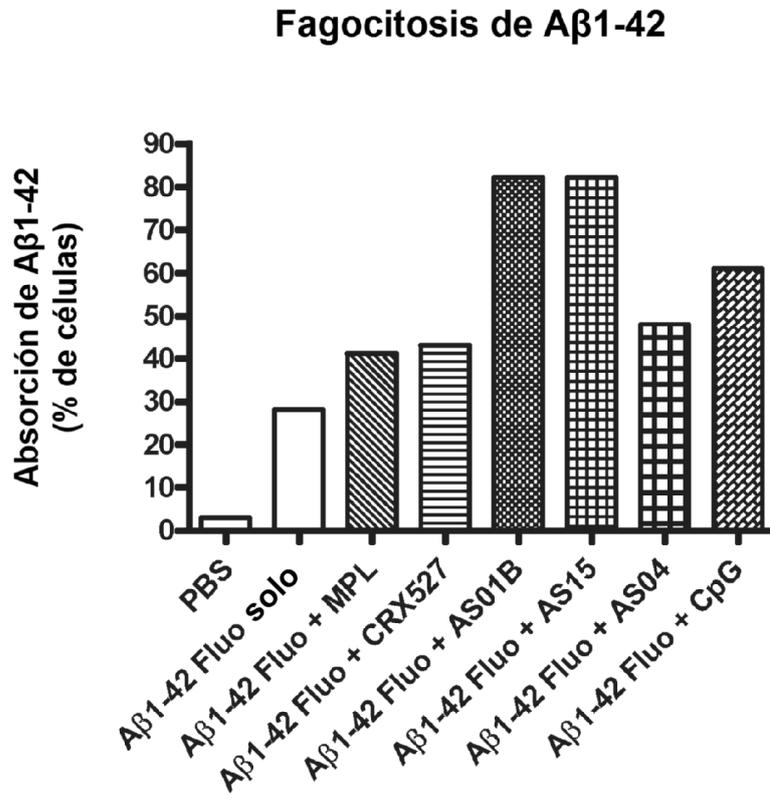


Fig 16

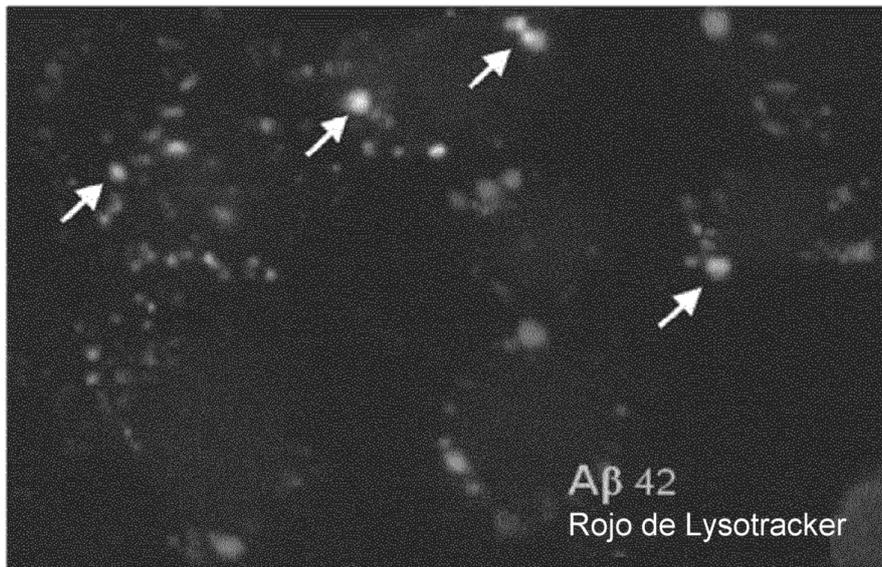


Fig. 17

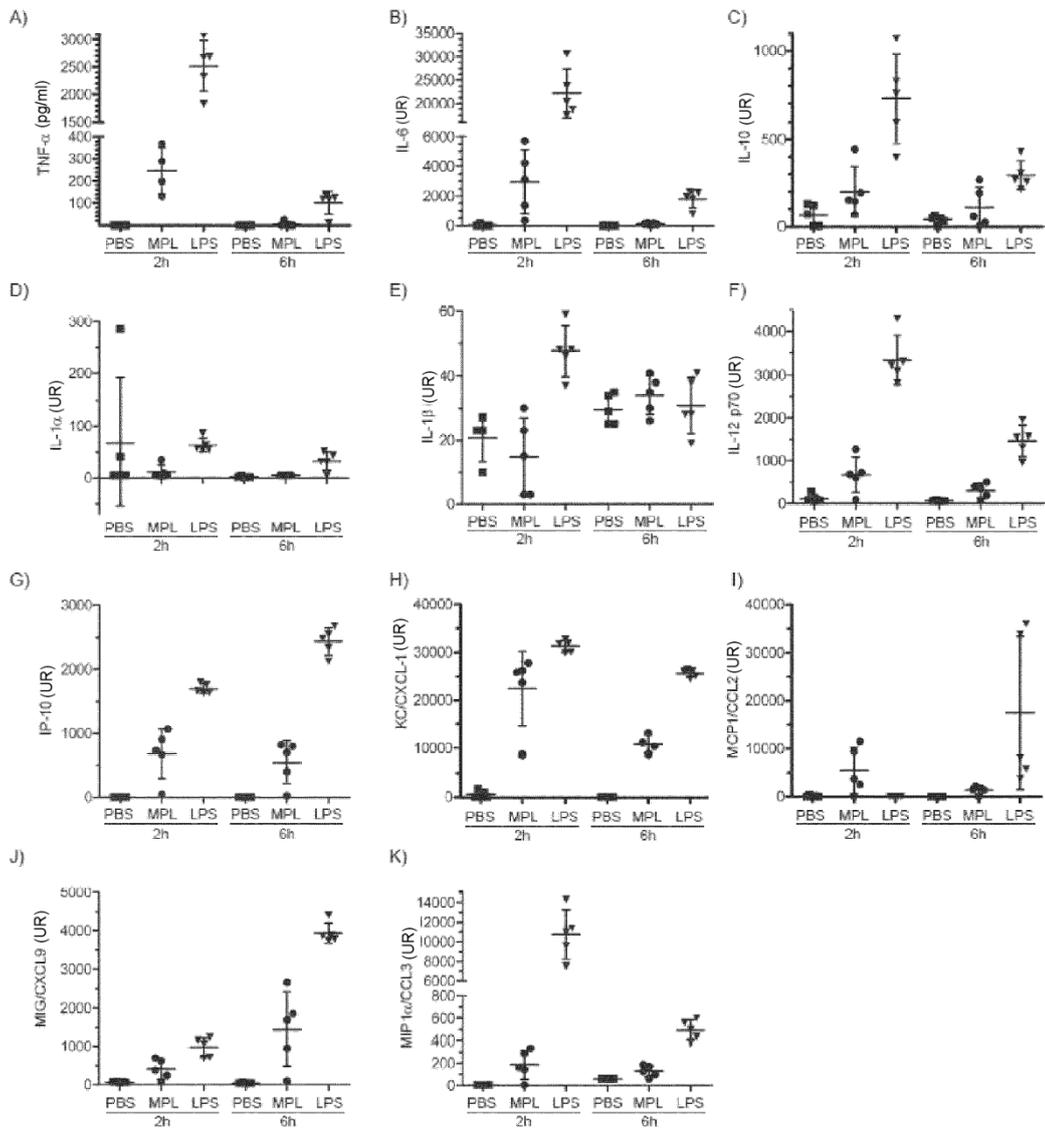


Fig 18

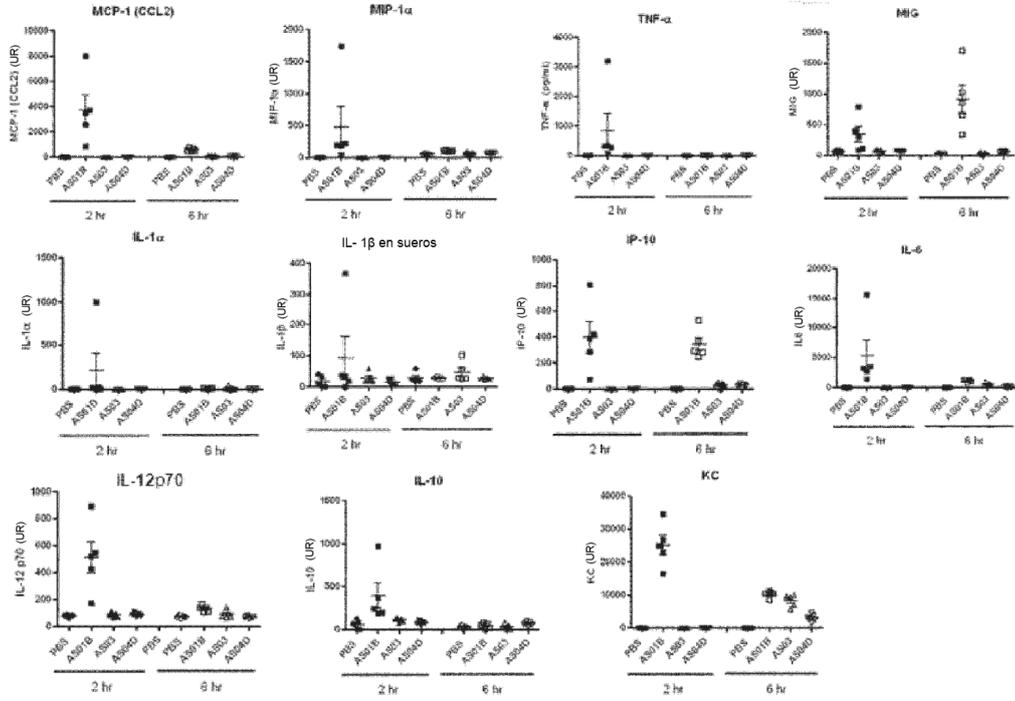


Figura 19

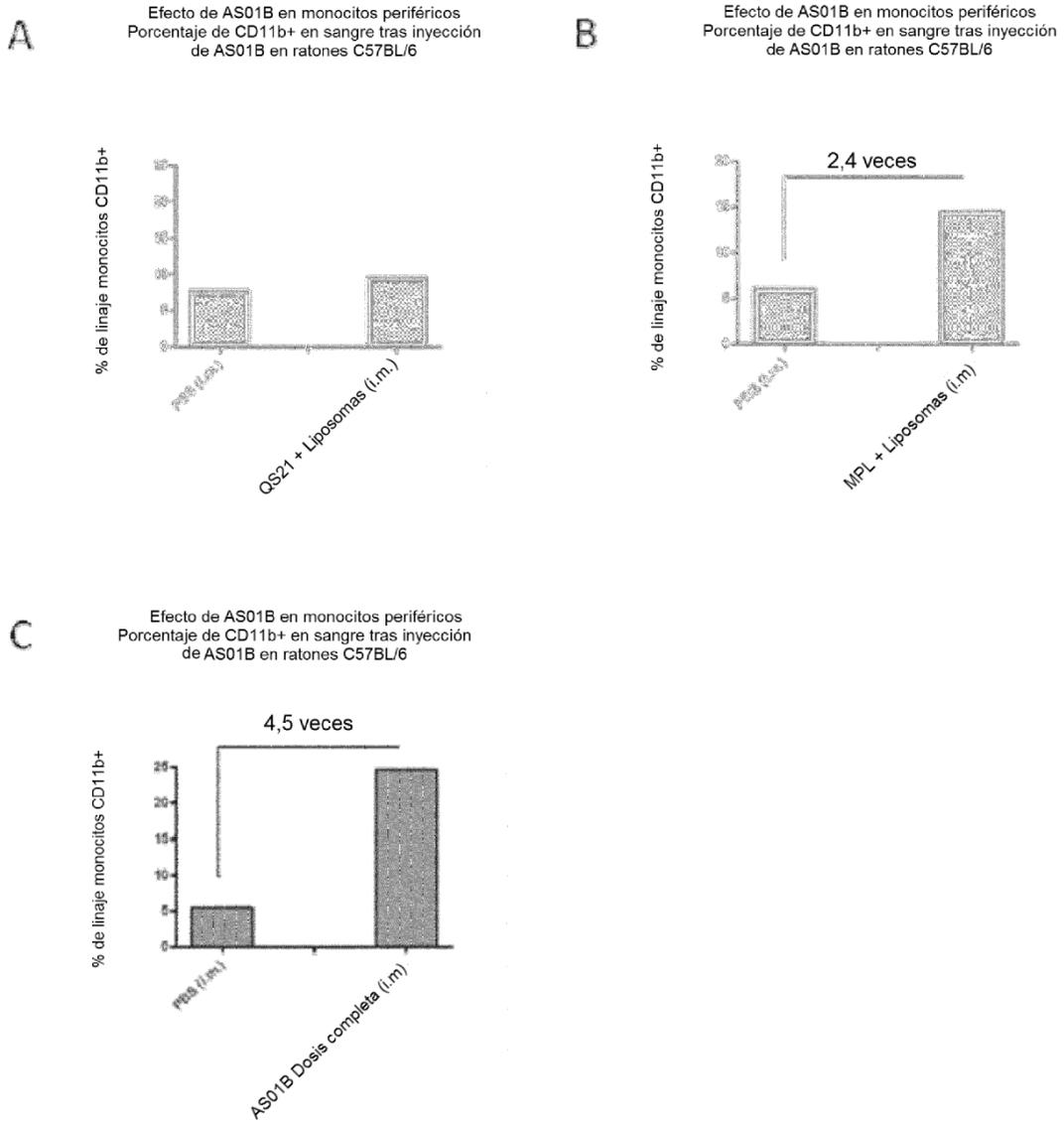


Figura 20

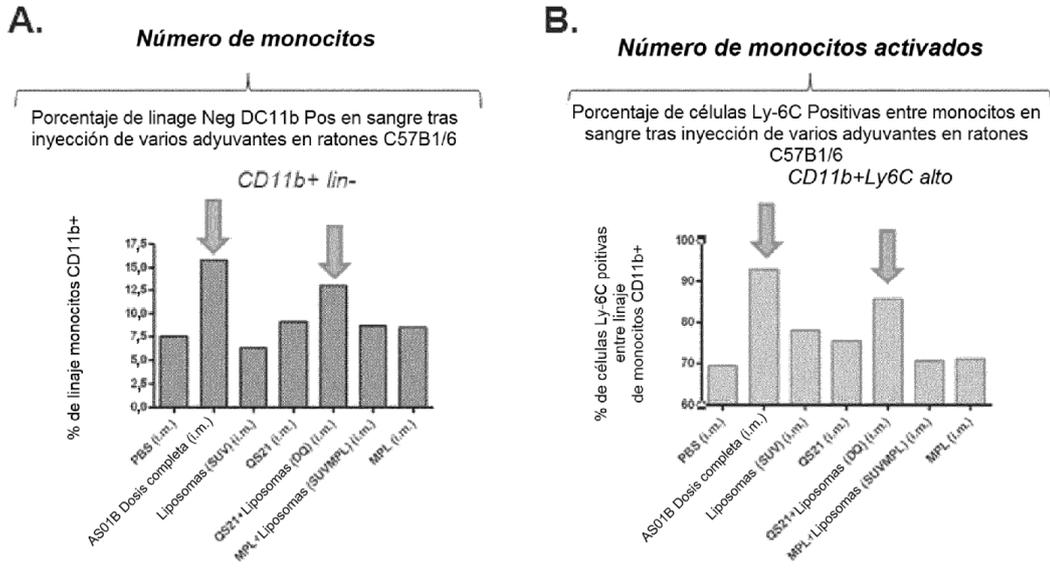


Figura 21

Endocitosis *ex vivo* de A β 1-42 HILyFluor 488 por monocitos tras inyección de varios componentes adyuvantes a ratones C57BL/6 (2 horas de incubación con A β)

