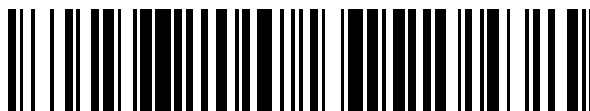


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 710**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2011** **PCT/IB2011/051476**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11125029**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011** **E 11717774 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2555790**

54 Título: **Uso terapéutico de la proteína β 2-microglobulina**

30 Prioridad:

20.05.2010 US 346617 P
08.04.2010 EP 10290188

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2016

73 Titular/es:

BETA INNOV (100.0%)
49 rue Rouelle
75015 Paris, FR

72 Inventor/es:

MERSEL, MARCEL y
RAKOTOARIVELO, CLOVIS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 588 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de la proteína β 2-microglobulina

- 5 La presente solicitud de patente atañe al campo médico, en particular al de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

La invención se refiere más particularmente al uso de la proteína beta2-microglobulina (β 2m) como ingrediente activo, en particular en composiciones farmacéuticas pretendidas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple o enfermedad de Crohn.

INTRODUCCIÓN

- 15 La proteína β 2m es una proteína que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 11,6 kDa formada generalmente por 99 aminoácidos, que entra en la constitución del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I o HLA I) [Cunningham B.A. y col. "The complete amino acid sequence of beta-2-microglobulin" (1973) Biochemistry 12: 4811-4821].

- 20 Ha de recordarse que el complejo de histocompatibilidad MHC I desempeña un papel clave en el reconocimiento de "lo propio" y "lo no propio" por el sistema inmunitario. Estos complejos están presentes sobre la superficie de la mayoría de células humanas, con la excepción de los eritrocitos. Sobre su superficie, presentan un alto número de antígenos, basándose en los cuales los linfocitos T (CD8) son capaces de discriminar las células de un individuo de las células que son extrañas al mismo, enfermas o que experimentan un proceso de transformación tumoral.

- 25 Los complejos MHC I están compuestos por una cadena pesada glicosilada (HC) de aproximadamente 44 kDa y una cadena ligera, β 2m, que se asocia no covalentemente con el dominio extracelular de la cadena pesada. La cadena α del MHC I está compuesta por tres dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) y un segmento transmembrana como se indica en la Figura 1A. La β 2m se asocia con una secuencia de aminoácidos situada en la zona donde están en proximidad el final del dominio α 1 y el inicio del dominio α 3 en la HC [Gussov, D. y col. (1987), "The human beta-2-microglobulin gene: primary structure and definition of transcriptional unit" (1987) Journal of Immunology 139: 3132-3138]. Los genes que codifican las moléculas de MHC I se han numerado en el orden de su descubrimiento y clasificado en grupos (A, B y C) y complejos (D, H y G).

- 35 Las células presentadoras de antígeno (APC) usan los complejos de tipo MHC I como presentadores de antígeno ante linfocitos T (CD8) del sistema inmunitario. Los antígenos presentados por MHC I están generalmente constituidos por una variedad de polipéptidos que tienen de 8 a 10 aminoácidos, que son el resultado de la escisión de proteínas endógenas por el proteosoma. Estos antígenos se cargan en las cavidades peptídicas presentes en la superficie de las subunidades (HC y β 2m) de los complejos MHC I durante su formación en el retículo endoplásmico. Una vez se han cargado los antígenos, se exportan los complejos MHC a la superficie de la célula. Se proporciona entonces el anclaje del complejo MHC I a la membrana plasmática por el dominio transmembrana de la cadena pesada situado en el dominio α 3.

- 40 La subunidad formada por la proteína β 2m se distingue de las cadenas pesadas en que la secuencia es prácticamente invariable y en que su cadena polipeptídica no está glicosilada.

- 45 Aunque su papel fisiológico no se ha esclarecido totalmente todavía, se ha mostrado que la proteína β 2m desempeña un papel dominante con respecto a las demás proteínas que forman los complejos MHC I, por un lado tras el ensamblaje del complejo de MHC I/antígeno [Androlewicz MJ., y col. (1994) "MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding", Nature 368, 864-867], en que la proteína β 2m se une específicamente a la proteína TAP-1, [Corr y col. 1992. "Endogenous peptides of a soluble major histocompatibility complex class I molecule H-2Ld: sequence motif, quantitative binding and molecular modeling of the complex", JEM, 176(6): 1981-92], haciendo posible asegurar que se mantiene la conformación del sitio de unión a antígeno [Ljunggren, H-G. (1990) "Empty MHC class I molecules come out in the cold". Nature. 346, 476 - 480] y, por otro lado, cuando se exporta el complejo de MHC I/antígeno a la superficie celular. La β 2m está implicada en el plegamiento de la cadena pesada y se encuentra que está también implicada en la presentación del antígeno ante los linfocitos T (CD8). La β 2m contribuye también a la estabilidad del complejo de MHC-I/antígeno [Neefjes, F.F. y col. (1993) "Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter". Science. 261 (5122): 769-771].

Los animales transgénicos que carecen de $\beta 2m$ se han probado viables, pero presentan una respuesta inmunitaria debilitada que les hace más susceptibles de infecciones víricas y parasitarias. La reducción de la respuesta inmunitaria en estos animales parece estar correlacionada con el hecho de que sus células presentan muy pocos antígenos con respecto a su complejo MHC I y que la mayoría de sus linfocitos T no son funcionales [Pereira P., y col. (1992) "Blockade of transgenic gamma delta T cell development in beta 2-microglobulin deficient mice", EMBO Journal 11: 25-31].

Se describe también que la proteína $\beta 2m$ está implicada en la glicosilación de cadenas pesadas en el aparato de Golgi [Sege y col. (1981) "Role of beta2-microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens". Biochemistry. 20 (16), pág. 4523-4530].

La proteína $\beta 2m$ está también implicada en otros fenómenos tales como la regulación de la señalización intracelular y el plegamiento correcto de proteínas clave tales como HFE (proteína de hemocromatosis humana) que regula el flujo de hierro en la célula.

Se ha establecido también desde finales de los 80 que la $\beta 2m$ puede mejorar favorablemente la respuesta antigénica y usarse como coadyuvante de vacuna para estimular la respuesta inmunitaria ligada a los linfocitos T (CD8).

Numerosos documentos indican que la $\beta 2m$ puede incorporarse por tanto a composiciones de vacuna en combinación con moléculas que tienen la tarea de inducir una reacción inmunitaria, tales como antígenos víricos o tumorales específicos.

En dichas composiciones de vacuna, la $\beta 2m$ puede estar presente en diferentes formas, purificada o recombinante. Se han descrito por tanto construcciones genéticas en que el gen que codifica la $\beta 2m$ está fusionado con secuencias genéticas que codifican péptidos inmunogénicos con el fin de expresar proteínas de fusión que se pretende que desencadenen una reacción inmunitaria específica *in vivo* [WO 99/64957].

Por sí misma, la proteína $\beta 2m$ es muy débilmente inmunogénica, puesto que no está glicosilada. Por esa razón, en las composiciones de vacuna anteriores, se usa siempre la $\beta 2m$ como coadyuvante y no como ingrediente activo.

Esto es indudablemente debido al hecho de que, hasta la fecha, no se ha observado un efecto terapéutico de la $\beta 2m$ capaz de justificar su uso en composiciones farmacéuticas.

Aparte de en vacunación, ciertos documentos de la técnica anterior indican formas inactivadas o modificadas de la proteína $\beta 2m$ en composiciones terapéuticas.

La solicitud internacional WO 02/102840 describe por tanto una $\beta 2m$ que se ha vuelto no funcional que se pretende que forme complejos MHC I inactivos, que no pueden ya activar los linfocitos T CD8. Los complejos MHC así formados se usan como "cebo" para el sistema inmunitario con el objeto de obtener un efecto inmunosupresor.

Otra solicitud internacional, WO 02/24929, describe composiciones terapéuticas en que la $\beta 2m$ está conjugada con la proteína HFE como vector para suministrar fármacos (ingredientes activos de esas composiciones) al compartimento intracelular.

Debería observarse que, en estos tipos de aplicaciones, la proteína $\beta 2m$ no se usa en su forma funcional de tipo silvestre como ingrediente activo, sino como soporte o vector farmacéutico, en presencia de ingredientes activos no dirigidos al MHC.

Además, en contraposición con cualquier aplicación terapéutica, la proteína $\beta 2m$ se usa a menudo como marcador para diferentes patologías, en particular como medio de diagnóstico.

Por tanto, el síndrome de inmunodeficiencia en la enfermedad SIDA, que puede revelarse muchos años después de la infección con VIH, está precedido por un brusco aumento de la concentración de $\beta 2m$ en la sangre.

Ciertas publicaciones [Wu C.H. y col. (2001) Oncogene 20: 7006-20] destacan que el aumento en la concentración de $\beta 2m$ se correlaciona y está quizás implicado con el desarrollo de ciertos cánceres, en particular cáncer óseo y cáncer de próstata [Gross M. y col. (2007) Clin. Cancer Res., 13: 1979-1986]. Para otros cánceres, se observan

caídas en la concentración sérica de $\beta 2m$, como en cáncer de colon [Kaklamanis L. y col. (1992) Int. J. Cancer 57: 379-385].

La valoración de $\beta 2m$ en la sangre (y más particularmente el suero sanguíneo), el líquido cefalorraquídeo o la saliva se usa frecuentemente en el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas o parasitarias pero también, principalmente, para el diagnóstico de ciertas enfermedades del riñón, del sistema linfático, reumatismo, enfermedades inflamatorias y enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Alzheimer y demencia frontotemporal [Davidsson P. y col. (2002), "Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients". Clinical Neuroscience and Pathology 13: 611-615; Hansson S.F. y col. (2004), "Validation of a prefractionation method followed by two-dimensional electrophoresis-Applied to cerebrospinal fluid protein from frontotemporal dementia patients" Proteome Science 2: 1-11].

En personas que se consideran que tienen una buena salud, la concentración media de $\beta 2m$ en la sangre permanece relativamente constante, menor o igual a 2 mg/l, lo cual no es el caso en las enfermedades anteriormente mencionadas, en que la concentración puede alcanzar valores tal altos como 4,0 mg/l.

Para ciertas patologías, el aumento de $\beta 2m$ sérica podría estar causado por una "diseminación" aumentada (liberación de proteínas de superficie celular) de $\beta 2m$ [Bellotti V., y col. (1999) Cell. Mol. Life Sci., 55-977-991].

La $\beta 2m$ plasmática en circulación en la sangre se filtra normalmente en los riñones por los glomérulos, y se reabsorbe y cataboliza entonces en los túbulos.

Los estudios han mostrado que la mitad de la $\beta 2m$ plasmática (forma libre $\beta 2m$), que se renueva cada día, proviene particularmente del reciclado de complejos MHC I. Esta renovación parece contribuir por sí misma a una alta producción de $\beta 2m$ sérica de aproximadamente 150 mg/24 h para una persona de tamaño medio. Sin embargo, el "recambio" parecería estabilizar la concentración sérica en 2 mg/l.

En pacientes bajo diálisis, de los que la $\beta 2m$ no se elimina por los riñones, la acumulación de $\beta 2m$ en los fluidos corporales tiene consecuencias dañinas. En particular, induce artropatías y neuropatías por la formación de placas amiloides en ciertos tejidos conectivos (nervioso y articular) [Ohshi K., y col. "Pathogenesis of beta2-microglobulin amyloidosis" (2001) Pathol. Int. 51:1-10].

En la osteoartritis (artrosis), se describe que la $\beta 2m$ tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de condrocitos, una consecuencia de lo cual es acentuar la destrucción de los cartílagos [documento WO 2004/020586].

En el caso de ciertas enfermedades autoinmunitarias, tales como esclerosis múltiple (EM), es común monitorizar los cambios de concentración de $\beta 2m$ en los pacientes para anticipar el inicio de episodios inflamatorios [Bagnato, F., (2003), "beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis" Neurol. Sci. 24: 51301-51304]. La concentración de $\beta 2m$ se mide entonces preferiblemente en el líquido cefalorraquídeo, puesto que la concentración de $\beta 2m$ en la sangre se considera demasiado variable [Caudie C. y col. (2005), "Valeurs usuelles et utilité diagnostique de la $\beta 2$ -microglobuline dans le liquide cephalorachidien" Ann. Biol. Clin. 63(6): 631-637; Ryu O.H., y col. (2006) Rheumatology, 45: 1077-1086].

La implicación de $\beta 2m$ en enfermedades autoinmunitaria sigue siendo poco clara y merecería más estudios.

Las enfermedades autoinmunitarias forman un gran conjunto de enfermedades cuyos síntomas pueden atribuirse a la hiperactividad del sistema inmunitario, con la presencia o ausencia de autoanticuerpos dirigidos contra sustancias o tejidos que están normalmente presentes en el cuerpo.

Es cierto que la respuesta inmunitaria contra "lo propio" en enfermedades autoinmunitarias es el resultado de la activación de linfocitos T a través del sistema de MHC y varios mecanismos pueden causar esto.

- En el sistema inmunitario:

- mediante la inducción de autoanticuerpos usando linfocitos T mediante la presentación de antígenos conocidos por dichos autoanticuerpos. Este es el caso de lupus sistémico eritematoso (LSE), tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple (EM), diabetes insulín dependiente (de tipo I), etc.

• En células:

- inducción de una respuesta autoinmunitaria por la activación de linfocitos T específicos de un antígeno vírico;
- alteración con respecto al reconocimiento de APC-MHC-I /TcR (receptor de linfocitos T) y con respecto a la cascada o cascadas de señalización del linfocito T activado;
- ensamblaje inapropiado en la APC de los componentes del sistema de MHC-I;
- defecto o defectos en la operación de las células reguladoras.

• A nivel molecular:

- mimetismo o tolerancia molecular;
- MHC I como autoantígeno.

Las enfermedades autoinmunitarias se consideran generalmente el resultado de una conjunción de predisposición genética y un episodio infeccioso durante el cual el cuerpo desarrolla una reacción inmunitaria contra sus propios antígenos. Sin embargo, las causas exactas de estas enfermedades no se han identificado con precisión.

Las enfermedades autoinmunitarias más extendidas son poliartritis reumatoide, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, lupus sistémico eritematoso, escleroderma, fibromialgia, miositis, espondilitis anquilosante, diabetes insulínica dependiente de tipo I, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple (EM).

Entre las que se hace referencia como enfermedades “huérfanas”, hay numerosos otros trastornos que se sospecha que son también enfermedades autoinmunitarias. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una de esas enfermedades, para las que no hay actualmente disponible un tratamiento efectivo.

Deberían distinguirse dos tipos de enfermedades autoinmunitarias: las enfermedades autoinmunitarias específicas y las enfermedades autoinmunitarias no específicas.

En las enfermedades no específicas, se afectan diferentes órganos, causando enfermedades sistémicas tales como artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren y escleroderma.

Las enfermedades específicas están especialmente limitadas a ciertos órganos. Las más comunes son diabetes insulínica dependiente, enfermedades tiroideas, enfermedad de Addison, unas pocas enfermedades de riñones, pulmones, sistema digestivo y especialmente esclerosis múltiple.

Las terapias actuales comprenden una serie de enfoques desde antiinflamatorios a inmunosupresores, con antimetabolitos y fármacos anticancerosos. A modo de ejemplo, se usan los siguientes: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides, antimetabolitos (metotrexato, azatioprina), ciclofosfamida, sulfasalazina, sales de oro, ciclosporina A, micofenolato y leflunomida.

Recientemente, se ha recomendado el interferón β para EM y se recomiendan derivados de cloroquina (usada contra la malaria) para el tratamiento de lupus eritematoso y de poliartritis reumatoide.

Estos tratamientos, usados para tratar otras enfermedades, no están muy bien adaptados y tienen numerosos efectos secundarios indeseables, en particular cuando se usan a largo plazo. Además, aunque pueden posibilitar atenuar al menos parcialmente los síntomas de esas enfermedades, no posibilitan obtener la remisión de las enfermedades.

Los inventores designados por la presente solicitud tomaron un interés particular por la situación de cuatro pacientes afectados por enfermedades autoinmunitarias aparentemente distintas:

- un primer paciente (P1) que padece una enfermedad autoinmunitaria no específica, es decir, que no afecta a un órgano específico, pero que padece también tiroiditis de Hashimoto y síndrome de Sjögren primario;
- un segundo paciente (P2) que padece EM originalmente, con infiltración linfocítica duodenal posterior;
- un tercer paciente (P3) que padece enfermedad celíaca;
- un cuarto paciente (P4) que padece tiroiditis de Hashimoto y enfermedad celíaca.

Para estos pacientes, los inventores buscaron establecer la relación de cantidades de HC (MHC-ABC)/ β 2m

procedentes de los linfocitos, aislados de la sangre de los pacientes usando los procedimientos convencionales indicados más adelante.

Sorprendentemente, esta relación de HC/ β 2m probó estar aumentada en estos cuatro pacientes, en comparación con la de donantes de control, mientras que la concentración sérica de β 2m era la media: aproximadamente 1,9 mg/l para P1, 1,8 mg/l para P2, 1,1 mg/l para P3 y 1,1 mg/l para P4. (véase la Tabla 1).

Tabla 1

Determinación de las diferentes formas de β 2m en pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias			
Pacientes	β 2m sérica	HC/ β 2m en proteínas (b)	HC/ β 2m en membranas (c)
P1	1,9	1,3	1,8
P2	1,8	1,1	1,7
P3	1,1	1,6	1,5
P4	1,1	1,2	2,1
HC: cadenas pesadas de MHC I			
(a) concentración de β 2m en mg/l			
(b) HC/ β 2m calculada en las proteínas linfocíticas totales			
(c) HC/ β 2m calculada en las membranas plasmáticas aisladas de una fracción linfocítica purificada			

10 Los resultados de la tabla 1 anterior muestran un desequilibrio en la relación de HC/ β 2m. Estos resultados han revelado una situación inesperada, en la que los complejos de membrana de MHC I presentes en estos cuatro pacientes aparentemente son significativamente deficientes en β 2m respecto a la concentración de HC, sin que esto aumente la concentración de β m libre en la sangre.

15 Estas observaciones han de compararse con controles con buena salud, que muestran una relación de HC/ β 2m en la cercanía de 1. En contraposición, la β 2m parece estar secuestrada en el compartimento intracelular en los pacientes afectados por enfermedades autoinmunitarias.

Estos resultados sorprendieron a los inventores y les condujeron a formular la hipótesis de que las cuatro enfermedades autoinmunitarias que afectan a los pacientes podrían tener un déficit en β 2m en los complejos MHC I de membrana como origen común. Más generalmente, el desequilibrio de HC/ β 2m en los complejos MHC parecería contribuir a la aparición de los trastornos encontrados en numerosas enfermedades autoinmunitarias.

De acuerdo con esta hipótesis expuesta más tarde, en el contexto de las patologías que padecen los cuatro pacientes, la reacción autoinmunitaria no es aparentemente la consecuencia de un aumento genérico de la β 2m libre en la sangre, sino por el contrario se origina por un déficit local de β 2m en los complejos MHC I de membrana, que es responsable de alterar la presentación de los antígenos ante los linfocitos T (CD8).

Debería observarse que esta hipótesis no excluye en modo alguno la implicación de β 2m en la activación de los linfocitos T y en los procesos inflamatorios, como puede haberse descrito en la técnica anterior.

Dadas estas primeras observaciones, los inventores llevaron a cabo el análisis de HC/ β 2m en las proteínas linfocíticas totales presentes en otros pacientes que padecen EM o enfermedad de Crohn, y pudieron encontrar que la relación de HC/ β 2m procedente de los linfocitos de estos pacientes era también mayor que la de los pacientes de control.

Basándose en estos resultados, los inventores han desarrollado composiciones farmacéuticas de las cuales el principal ingrediente activo es la proteína β 2m en forma funcional.

40 El fin de estas composiciones es mitigar el déficit de β 2m en los complejos de MHC I de membrana en pacientes afectados de enfermedades autoinmunitarias.

Figura 1: Representación diagramática de un complejo MHC de tipo I en un plano (A) y en el espacio (B). La cadena pesada (HC) está constituida por 3 dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) y un dominio transmembrana. La cadena ligera (β 2m), que es extracelular, se inserta entre la membrana y la localización donde α 1 y α 3 de la cadena pesada están en proximidad. La Figura B muestra la posición de los péptidos (antígenos) presentados por la cadena pesada.

Figura 2: Fotografía (630 aumentos) de linfocitos puestos en contacto con liposomas de acuerdo con la invención. Los liposomas se han preparado de acuerdo con el procedimiento de diálisis descrito en el Ejemplo 2. Se adsorben los liposomas (puntos claros) sobre la membrana de los linfocitos (HLA-ABC). El núcleo celular está intacto (gris).

5 **Figura 3:** Fotografía (630 aumentos) de linfocitos puestos en contacto con liposomas de acuerdo con la invención que contienen albúmina. La proteína (albúmina) se vuelve fluorescente con DAPI. Forma puntos más oscuros, detectados por inmunofluorescencia, que penetran en los linfocitos más claros (positivos de HLA-ABC).

Figura 4: Fotografía (630 aumentos) de liposomas preparados usando el procedimiento de extrusión (verde) y que
10 contienen β 2m fluorescente (TRITC). **A:** Fluorescencia emitida por el lípido fluorescente NBD-PC-oleílo contenido en los liposomas. **B:** Fluorescencia emitida por el fluoróforo (isotiocianato de rodamina B) acoplado con β 2m. **C:** Superposición de las dos fluorescencias A y B.

Figura 5: Fotografía (630 aumentos) de linfocitos purificados a partir de un paciente (P1) e incubados con liposomas
15 preparados de acuerdo con el procedimiento de extrusión y que contienen β 2m fluorescente (TRITC). **A:** Fluorescencia emitida por el marcador Hoechst 33342, que colorea los núcleos de los linfocitos en azul. **B:** Fluorescencia emitida por el fluoróforo (isotiocianato de rodamina B) acoplado con β 2m. Este marcaje muestra la incorporación de β 2m a los linfocitos, que se han vuelto de color rojo. **C:** Fluorescencia emitida por el lípido fluorescente verde NBD-PC-oleílo contenido en los liposomas. Este marcaje muestra la asociación de los liposomas
20 con los linfocitos. **D:** Superposición de los marcajes B y C (color amarillo), barra de escala: 10 μ m.

Figura 6: Examen microscópico por fluorescencia de liposomas que contienen albúmina (TRITC) después de 30 días de almacenamiento a dos temperaturas diferentes (25 y 37 °C). Mediante la observación, no pueden distinguirse diferencias importantes entre los diferentes tipos de preparación y almacenamiento. **A y B:** Lote 30 (30 mg de prot./150 ml). **C y D:** Lote 60 (60 mg de prot./150 ml). *Abajo:* Fluorescencia emitida por el lípido fluorescente NBD-PC-oleílo contenido en los liposomas. *Arriba:* Fluorescencia emitida por el fluoróforo (isotiocianato de rodamina B) acoplado con la albúmina. Barra de escala: 200 μ m. Aumentos: 630.

Figura 7: Distribución de tamaño (%) de los liposomas (<50 nm, entre 50 y 100 nm, > 100 nm) que contienen
30 albúmina de acuerdo con el tiempo (2, 30 y 60 días) y la temperatura de almacenamiento (25 y 37 °C). **A y B:** Lote 30 (30 mg de prot./150 ml), **C y D:** Lote 60 (30 mg de prot./150 ml).

Figura 8: Distribución de tamaño (%) de los liposomas (<50 nm, entre 50 y 100 nm, > 100 nm) que contienen una
35 alta concentración de β 2m (lote 80 mg de prot./150 ml) de acuerdo con el tiempo almacenado a 25 °C durante 6 y 40 días.

Figura 9: Perfiles de degradación para β 2m pura o recubierta con liposomas en los sueros de pacientes o donantes sanos con el tiempo.

A y B: β 2m pura/en preparación liposómica (suero del paciente 1: mujer de 51 años que padece la enfermedad de Hashimoto). **C y D:** β 2m pura/en preparación liposómica (suero del paciente 2: mujer de 73 años, poliartritis reumatoide).

E y F: paciente de control, hombre sano de 62 años.

Figura 10: Electroforesis en gel de proteína que muestra la asociación entre β 2m (preparación en liposoma) y las
45 cadenas pesadas de MHC I sobre la superficie celular de linfocitos purificados de pacientes. **A:** En presencia de glutaraldehído, se observan complejos de HLA- β 2m a 55 kDa y β 2m libre a 12 kDa. La banda a 12 kDa en la pista sin glutaraldehído representa la β 2m celular (carril 3). **B:** Cuantificación de la expresión en membrana de β 2m. Este control hace posible validar el uso de glutaraldehído para la preparación de complejos de HLA- β 2m. **C:** Comparación de los linfocitos de un paciente que padece esclerosis múltiple (mujer, 39 años de edad) y de un donante sano
50 (hombre, 67 años de edad) después de la incubación con una preparación liposómica de β 2m durante 90 minutos. La β 2m contenida en los liposomas se une más a los linfocitos procedentes del paciente (en presencia de glutaraldehído) que del control.

Figura 11: Ensayos de toxicidad "in vitro" de β 2m libre o en liposomas sobre células hepáticas y renales humanas.

55 **A, C y E:** ensayos en células hepáticas HH después de 24, 48 y 72 horas de exposición. **B, D y F:** células renales HREpic después de 24, 48 y 72 horas de exposición. 1. Control. 2. Control y liposomas no cargados. 3. 3 μ g de β 2m libre. 4. 3 μ g de β 2m en forma de liposoma (lote de 66 μ g/150 ml). 5. 6 μ g de β 2m libre. 6. 6 μ g de β 2m en forma de liposoma (lote de 132 μ g/150 ml). Se estimó el contenido total de proteína mediante el procedimiento de BCA.

Figura 12: Ensayos de toxicidad "*in vitro*" de $\beta 2m$ libre o en liposomas sobre células hepáticas y renales humanas. Las mismas etiquetas que en el la Figura 11. Resultado de los ensayos de MTT de viabilidad.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere por tanto a un producto farmacéutico que consiste en $\beta 2$ -microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína $\beta 2$ -microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma.

La invención se refiere también a un producto farmacéutico que consiste en $\beta 2$ -microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína $\beta 2$ -microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

La proteína $\beta 2m$ es preferiblemente la forma humana de la proteína, purificada o recombinante, de la cual se describe una secuencia polipeptídica de referencia así como los determinantes genéticos en la base de datos GENE BANK, con el número de acceso CAG33347.

Si se purifica, la $\beta 2m$ puede obtenerse de los sueros de donantes sanos.

Puede concebirse también recurrir a la síntesis química, puesto que la proteína puede usarse en forma no glicosilada.

El presente uso terapéutico de $\beta 2m$ se extiende a las variantes funcionales de esa proteína, es decir, a sus isoformas, a copias mutadas o a fragmentos de esa proteína, caracterizados porque tienen la misma funcionalidad que la proteína de tipo silvestre, es decir, el mismo efecto terapéutico que se describe en la presente solicitud, siendo posible sin embargo reducir o aumentar la intensidad de ese efecto respecto a dicha proteína de tipo silvestre.

Variante funcional designa más particularmente un polipéptido capaz de asociarse con los complejos MHC presentes sobre la superficie de células cuya secuencia polipeptídica es al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y aún más preferiblemente al menos un 95 %, idéntica a la secuencia polipeptídica de la proteína $\beta 2m$ humana (haciéndose la comparación de la secuencia, por ejemplo, usando la aplicación de software ClustalW).

Una variante funcional de $\beta 2m$ consiste preferiblemente en un fragmento de la proteína $\beta 2m$ que presente el mismo efecto terapéutico, o incluso la misma actividad biológica.

Dichas variantes funcionales pueden ser también el resultado de la expresión de secuencias nucleotídicas clonadas en un vector de expresión o en un vector de terapia génica.

Numerosas publicaciones describen, por ejemplo, la presencia de isoformas de $\beta 2m$ en roedores [Goding J.W. y Walker I.D. "Allelic forms of $\beta 2$ -microglobulin in mouse" (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7395-7399] y en el hombre [Davidsson P. y col., "Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients" (2002) Clinical Neuroscience and Pathology 13: 611-615; Hansson S.F. y col., "Validation of a prefractionation method followed by two-dimensional electrophoresis-Applied to cerebrospinal fluid protein from frontotemporal dementia patients" (2004) Proteome Science 2: 1-11]. Estas isoformas, que se distinguen más particularmente por un punto isoelectrónico diferente (pI), se consideran variantes funcionales de $\beta 2m$.

Dichas variantes funcionales pueden tener ciertas ventajas en términos de efectividad del producto o su formulación respecto a la proteína humana purificada (solubilidad, mayor estabilidad, degradación proteolítica reducida).

La presente invención atañe a productos farmacéuticos que consisten en $\beta 2$ -microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína $\beta 2$ -microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma.

La invención se refiere también a una composición que comprende un producto farmacéutico como se describe anteriormente.

- 5 La $\beta 2m$ o su variante funcional forma el único ingrediente activo de dichas composiciones.

Dentro del significado de la presente invención, un ingrediente activo es una sustancia que entra en la composición de un medicamento y que es responsable de las propiedades farmacodinámicas o terapéuticas del mismo. Un coadyuvante no se considera un ingrediente activo dentro del significado de la presente invención.

10

La invención se refiere a una composición farmacéutica consistente en $\beta 2m$ o una variante funcional de $\beta 2m$ contenido en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, siendo dicho portador o vehículo farmacéuticamente aceptable un liposoma.

- 15 De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, la $\beta 2m$ se administra sola con dicho portador farmacéuticamente aceptable, o una solución fisiológica, de acuerdo con las recomendaciones y requisitos regulatorios.

De acuerdo con la invención, la $\beta 2m$ se usa más particularmente por su capacidad de restaurar una relación de

- 20 HC/ $\beta 2m$ normal dentro de los complejos MHC-I de membrana en un paciente.

Se trata de la relación de HC/ $\beta 2m$ preferiblemente en relación con linfocitos, en particular linfocitos B. La relación de HC/ $\beta 2m$ corresponde a la relación molar de subunidades HC y $\beta 2m$ en los complejos MHC I purificados.

- 25 Preferiblemente, esta relación se devuelve a un nivel comparable al de un paciente que no padece la enfermedad. Más preferiblemente, se usa la $\beta 2m$ con el fin de reducir la relación de HC/ $\beta 2m$ en un paciente para alcanzar una relación molar cercana a 1.

La presente invención está dirigida más particularmente a prevenir que aparezca un déficit de $\beta 2m$ en los complejos

- 30 MHC-I en pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias.

El uso de la $\beta 2m$ de acuerdo con la invención es por tanto más particularmente pretendido para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

- 35 La invención se refiere por tanto a un producto farmacéutico que consiste en $\beta 2$ -microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína $\beta 2$ -microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

- 40 Los inventores han podido determinar que un déficit de $\beta 2m$ intracelular o de membrana podría dar lugar a una relación de HC/ $\beta 2m$ mayor de 1 o incluso 2 en ciertos pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias. La invención está por tanto dirigida a devolver dicha HC/ $\beta 2m$ a un valor cercano a los valores fisiológicos, concretamente preferiblemente menos de 2, preferiblemente menos de 1,5 y aún más preferiblemente menos de 1,2.

- 45 La divulgación puede aplicarse por supuesto a cualquier enfermedad ligada a un desequilibrio de la relación de HC/ $\beta 2m$ en los complejos de MHC I distinta de enfermedades autoinmunitarias.

Dentro del significado de la presente invención, las patologías ligadas a trasplantes de órganos o rechazo de trasplante no se consideran enfermedades autoinmunitarias, ni enfermedades causadas por un defecto en el reconocimiento de lo "no propio" por el sistema inmunitario. Para ser preciso, el rechazo de trasplante se considera aquí como resultante de un reconocimiento de lo "no propio" por el sistema inmunitario, y no como un defecto en el reconocimiento de lo "propio".

- 50 Los análisis llevados a cabo por los inventores en diferentes pacientes indican que puede observarse una relación de HC/ $\beta 2m$, calculada basándose en la proteína linfocítica total, mayor de 1,2 al menos para las siguientes enfermedades: poliartritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, escleroderma, fibromialgia, miositis, espondilitis anquilosante, diabetes insulino dependiente de tipo I, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (EM).

Aunque la cuestión sigue bajo debate en la comunidad científica, la ELA se asimila a una enfermedad autoinmunitaria en vista de los resultados obtenidos.

La invención atañe más particularmente al desarrollo de un medicamento para aumentar la concentración de $\beta 2m$ sanguínea a una concentración comprendida entre 2,5 y 12 mg/l, preferiblemente entre 3 y 8 mg/l, más preferiblemente entre 3 y 5 mg/l, para mitigar el déficit de HC/ $\beta 2m$ del complejo MHC I de membrana.

Como se describe a continuación en la parte experimental de la presente invención, el medicamento de acuerdo con la invención puede consistir en una preparación liposómica que comprende $\beta 2m$ o una variante funcional de la misma. Los liposomas pueden fabricarse usando diferentes técnicas conocidas por el especialista en la materia, tales como aquellas ilustradas en los ejemplos de la presente solicitud. Pueden usarse diferentes lípidos que constituyen los liposomas ["Medical Application of Liposomes" (1986) editado por Kunio Yagi, Japan Scientific Societies Press, Tokio, Karger].

Un medicamento preferido de la invención a este respecto consiste en un liposoma cargado con $\beta 2m$.

Preferiblemente, la $\beta 2m$, o una variante funcional de esa proteína, constituye el único ingrediente activo contenido en dicha preparación liposómica.

Es ventajoso usar un liposoma de acuerdo con la invención como medicamento, porque posibilita que la $\beta 2m$ esté protegida de los ataques proteolíticos que pueden tener lugar y porque posibilita suministrar la $\beta 2m$ de manera orientada a los complejos MHC I, en particular mediante fusión del liposoma con los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares.

De acuerdo con un aspecto de la invención, un paciente puede tratarse por perfusión con una solución de liposomas que contienen $\beta 2m$ o por transfusión de linfocitos de pacientes puestos en contacto previamente con la $\beta 2m$. Esta puesta en contacto puede llevarse a cabo mediante incubación "ex vivo" de linfocitos extraídos de una muestra de sangre tomada anteriormente del mismo paciente.

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el medicamento que comprende la $\beta 2m$ se prepara en forma salina. Un proceso preferido para preparar el medicamento consiste en incubar la $\beta 2m$ en forma salina *ex vivo* en contacto con el suero del paciente para el que se pretende el medicamento.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención descritas anteriormente pueden tomar cualquier forma apropiada conocida por el especialista en la materia para su administración oral, por inyección, perfusión o inhalación.

Otro aspecto de la invención atañe al diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, más particularmente el diagnóstico de las enfermedades citadas anteriormente, mediante la determinación *in vivo* o *in vitro* de la relación de HC/ $\beta 2m$ de los complejos MHC I.

El procedimiento de diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con la invención comprende una etapa consistente en determinar la relación de HC/ $\beta 2m$ -microglobulina intracelular o de membrana de los complejos de MHC I en células de un paciente.

El procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención comprende:

- i) extraer los complejos MHC I de células, preferiblemente linfocitos, de un paciente en que se va a cribar una enfermedad autoinmunitaria;
- ii) determinar las cantidades respectivas de HC y $\beta 2m$ contenidas en dichos complejos;
- iii) establecer la relación molar de HC/ $\beta 2m$; y
- iv) comparar la relación de HC/ $\beta 2m$ obtenida con los resultados obtenidos anteriormente de otros pacientes.

La relación de HC/ $\beta 2m$ puede establecerse para el conjunto de la célula (relación celular de HC/ $\beta 2m$) o, preferiblemente, para la membrana (relación de HC/ $\beta 2m$ de los complejos de MHC I de membrana). Preferiblemente, el procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención comprende una etapa de comparación de la relación de HC/ $\beta 2m$ con la de un control, o si no, en el contexto de monitorización de un paciente, con otras relaciones determinadas anteriormente.

Las cantidades respectivas de las proteínas HC y $\beta 2m$ pueden determinarse de manera estándar de acuerdo con procedimientos conocidos por el especialista en la materia, por ejemplo mediante inmunodetección cuantitativa (p.ej. ELISA, Immunodot, "transferencia Western", micromatrices de autoantígeno, etc.). La extracción de los complejos MHC I se efectúa de acuerdo con los protocolos conocidos de extracción de proteínas de célula y membrana.

El procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención puede ponerse en marcha en el contexto de la monitorización terapéutica de pacientes que padecen diversas enfermedades autoinmunitarias.

10 Los siguientes ejemplos pretenden suplementar la descripción de la invención sin limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

1 – Análisis de los componentes del complejo de membrana HLA-I de los linfocitos de pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias

Sin ligarse a teoría alguna, los inventores han desarrollado la hipótesis de trabajo de que un aumento en la relación de HC/ $\beta 2m$ puede dar como resultado reacciones de tipo autoinmunitario. En particular, los inventores han considerado que un exceso de HC y una reducción de $\beta 2m$, al nivel de los complejos MHC I, o ambas al mismo tiempo, podían dar lugar a un fenómeno de "sobreexposición" de "lo propio" ante los TcR. Obsérvese que la $\beta 2m$ protege a ciertas regiones de las HC y determina específicamente la presentación de lo "no propio" ante los linfocitos T CD 8 [Hill, D.M. y col. (2003), "A dominant negative mutant $\beta 2$ -microglobulin blocks the extracellular folding of major histocompatibility complex class I heavy chain". *JBC*. 278: 5630-5638].

25 Para verificar esta hipótesis, se realizó un primer análisis para determinar las cantidades molares de HC y $\beta 2m$ en los complejos MHC I extraídos de linfocitos de cuatro pacientes. Se presentan los resultados de estos análisis en la Tabla 1, comentada anteriormente.

Se aislaron los linfocitos de la sangre de donantes sanos y de pacientes de acuerdo con el procedimiento de Lightbody J. ["Manual of Clinical Immunology", Rose NR., Friedman H. Editors American Society for Microbiology Washington (DC), 1976, páginas 851-857] modificado por Hofman F.M. y col. [*Ann. J. Clin. Pathol.* (1982) 77: 710-716]. Se detectan los complejos MHC I en los linfocitos enteros o en las membranas plasmáticas preparadas de acuerdo con el procedimiento de Warley A. y col. [*Biochim. Biophys-Acta* (1973), 323: 55-66] con unas pocas modificaciones. La detección de los componentes proteicos de los MHC I se llevó a cabo por electroforesis (sistema PAGE-SDS) de acuerdo con Laemmli U.K. [*Nature* (1970) 227: 680-685] y entonces por electrotransferencia a membranas de PVDF e inmunotinción de acuerdo con el procedimiento de Towbin H. y col. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 4350-4354]. Se realizaron los revelados por anticuerpos secundarios acoplados con fosfatasa alcalina usando una mezcla de NBT-DCIP.

40 Se verificó que el exceso de cadenas pesadas era realmente de origen de membrana mediante el aislamiento de las membranas plasmáticas y el uso del procedimiento de unión a glutaraldehído descrito más adelante.

Como se indica anteriormente, otros cuatro casos de EM y dos casos de enfermedad de Crohn muestran una relación celular de HC/ $\beta 2m$ > 1. Estas observaciones incitaron al solicitante a desarrollar un enfoque experimental que posibilitara restaurar el equilibrio de HC/ $\beta 2m$ (MHC I), en particular mediante el uso de liposomas.

2 – Preparación de liposomas cargados con $\beta 2m$:

2.1 – Evaluación de la cantidad de $\beta 2m$ para suministrar a los pacientes

50

Para llevar al exceso la $\beta 2m$ sobre la superficie de los linfocitos, su concentración en la sangre debería aumentarse dentro de límites "razonables" para no desencadenar los canales de señalización en las células que tienen potencial de multiplicación.

55 Dada la facilidad con que la $\beta 2m$ se desprende de las membranas y circula por la sangre y el sistema renal, la concentración sanguínea de $\beta 2m$ debería llevarse a entre 3 mg/l y 8 mg/l (la concentración normal varía a aproximadamente 2 mg/l de sangre). Este aumento conduce a la adsorción de la $\beta 2m$ en la superficie de las células.

Obsérvese que los complejos mayores de histocompatibilidad de tipo I están compuestos, mol/mol, por cadenas pesadas (PM $\approx$ 43 kDa) y β 2m (PM $\approx$ 12k Da). Un complejo (PM $\approx$ 55 kDa) está por tanto compuesto, en peso, por 79 % de cadena pesada y 21 % de cadena ligera.

- 5 El contenido medio de proteína de un linfocito es de 650×10^{-12} g y el contenido proteico de su membrana plasmática representa solo un 1 % de su contenido total, concretamente $6,5 \times 10^{-12}$ g. Si se considera que el MHC I representa solo un 1 % como máximo del contenido total de proteínas de membrana de un linfocito quiescente, el contenido de β 2m es por tanto de aproximadamente $1,4 \times 10^{-14}$ g por linfocito.
- 10 Al tomar los parámetros fisiológicos promedio de 2×10^6 linfocitos/ml de sangre y 5 litros de sangre por individuo, el intervalo en “peso” del MHC I total/individual (referente a los linfocitos) sería de $1,4 \times 10^{-6}$ g a $1,8 \times 10^{-6}$ g de β 2m linfocítica. Estas cifras son cifras máximas, mostrándose las primeras estimaciones valores preferiblemente en el intervalo de $0,2 \times 10^{-9}$ a 500×10^{-9} g de media en los pacientes. Como la cantidad promedio en la sangre es de 10 mg de β 2m por individuo, concretamente una cantidad muy sustancialmente mayor que la presente sobre la
- 15 superficie de los linfocitos, parece que, en condiciones normales, existe ya una relación sustancialmente menor de 1 entre la β 2m de membrana y la β 2m sérica. Por tanto, no es irrazonable aumentar la relación de β 2m en la circulación sanguínea (aumentar su presión parcial oncótica) para completar el déficit de β 2m en membrana.

La administración de β 2m puede llevarse a cabo de dos modos:

- 20 (1) Administración de liposomas cargados con β 2m. Este tipo de portador farmacéutico es corriente para la administración de péptidos, anticuerpos, material genético, etc. El uso de liposomas (“artificiales” o membranas sintéticas) promueve el contacto entre la superficie celular y el ingrediente activo;
- (2) incubación del ingrediente activo en forma salina con el suero de pacientes antes de la administración. El objeto
- 25 de esta incubación es que las lipoproteínas del suero actúen como vector a la manera de liposomas.

El grado de incorporación de la β 2m a los linfocitos, además de la administración mediante el procedimiento 1 o 2, puede compararse con una administración de control; en el último caso, se administra la perfusión salina de β 2m a 0,10 mg/ml (volumen total 150 ml), lo que proporciona 3 mg de β 2m por litro de sangre (lote con 15 mg de β 2m/150 ml de solución liposómica designado “lote 15”).

30

2.2 – Formulación de los liposomas

Para la preparación de los liposomas (para 1 ml): después de la evaporación del diclorometano (CH_2Cl_2) que

35 contiene los constituyentes hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno, se constituye una película que contiene fosfatidilcolina, con o sin adición de colesterol, con o sin adición de esfingomielina o con adición de colesterol y esfingomielina. Para los tres compuestos (fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina), las proporciones son respectivamente de 10 M, 2 M y 1 M, concretamente para 1 ml de solución final, 7,60 mg, 0,76 mg y 0,38 mg. Se añade a esta película 1 ml de solución salina (PBS 10 mM, pH= 7.4; HANKS, Tris/glicina o DMEM) que contiene 2

40 mg de β 2m. La molaridad permanece igual para cada uno de los compuestos si se producen liposomas preparados a partir de fosfatidilcolina (10 M), de fosfatidilcolina (10 M) y colesterol (2 M), de fosfatidilcolina (10 M) y de esfingomielina (1 M). Sin embargo, pueden usarse otras molaridades referentes a los componentes lipídicos. Las cantidades de proteínas pueden ser diferentes y el pH puede ser mayor de 7,4 dependiendo del caso. Se lleva a cabo la dispersión de la película lipídica agitando durante 3 horas a una temperatura entre 20 y 37 °C.

45 Los liposomas se muestran mediante el denominado procedimiento de “detergente/diálisis”, o si no mediante el denominado procedimiento de “extrusión”. Para el último, se pasa la solución (Lipofast®, Sodexim S.A., 51140 Muizon, Francia) 41 veces a través de membranas de filtro de 100 nm de policarbonato bajo una presión de 69 bar. Los liposomas obtenidos son de tamaño homogéneo. Los liposomas, en este caso, se mantienen durante 2 días a

50 4 °C y se añaden a la suspensión linfocítica (diámetro < 100 nm; Figura 4). A mayor escala, se pasa entonces la solución (3 l/h; sodexim 2770; emulsiflex c3; Sodexim s.a.) 4 veces a una presión de 450 bar, obteniendo VUP (vesículas unilamelares pequeñas).

En ensayos “piloto”, para mostrar la incorporación de β 2m a liposomas, la adsorción de los liposomas sobre la

55 superficie celular y la transferencia de la proteína del liposoma al interior de las células, se produjeron liposomas fluorescentes. De acuerdo con los ensayos, se prepararon liposomas que fluorescen a 520 nm o 572 nm. Para esto, se añadieron NBD-PC (1-oleil-2-(6-(((7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino)hexanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina) 0,5 M (excitación a 490 nm y emisión a 520 nm) o Liss Rhod PE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-

(lisaminarodamina B-sulfonilo) (sal de amonio) 0,5 M (excitación a 541 nm y emisión a 572 nm) a la mezcla lipídica antes de la evaporación y obtención de la película lipídica (véase anteriormente).

A escala prepiloto, se produjeron los liposomas mediante el procedimiento de detergente/diálisis. Mediante esta técnica, se obtuvieron también VUP bien calibradas y estables.

Brevemente, después de agitar durante 3 horas a una temperatura de entre 20 y 37 °C, se dializa la suspensión micelar frente a una solución salina que contiene $\beta 2m$ así como n-hexil- βD -glucopiranosido 4 μM (0,8 mg/ml) durante 12 h a 4 °C en un aparato de microdiálisis. Las membranas de diálisis tienen un corte de 3,5 kDa y el n-hexil- βD -glucopiranosido (detergente) se diluye al menos a 1 ppm en las soluciones finales.

Los liposomas obtenidos tienen un tamaño de aproximadamente 200 nm de diámetro. Son estables durante 3 meses al menos a temperatura ambiente y contienen al menos 0,1 mg de $\beta 2m$ /ml de solución inicial.

Como alternativa, se producen liposomas fluorescentes verdes de acuerdo con el procedimiento de extrusión (Lipofast) y contienen $\beta 2m$ humana purificada de orina (Sigma, EE.UU.) a una concentración de 0,6 mg/ml. La $\beta 2m$ está marcada con isotiocianato de rodamina B, que fluoresce en rojo (excitación de TRITC a 540 nm, emisión a 625 nm). Se lleva a cabo el acoplamiento entre $\beta 2m$ y rodamina de acuerdo con Riggs, JL, Seiwald, JH, Bruckhalter, JH, Downs, CM y Metcalf TG [*Am. J. Pathol.* 1958, 34: 1081-1097]. Después del acoplamiento, se purifica la proteína en una columna Sephadex (Pharmacia, Suecia; G-10, volumen de perla 9 ml, diámetro interno de columna 0,7 mm). Se hincha la columna con PBS (Biorad, 10 ml de fosfatos, NaCl 150 mM, pH 8,3) y se eluye la proteína (4,5-7,0 ml) en PBS diluido con agua MilliQ (1:1). Se purifican los liposomas (Fig. 4A) en una columna idéntica (2,5-6,5 ml) y se concentran dos veces con un rotavapor (Buchi, Suiza). Se incuban los linfocitos aislados del paciente P1 como se describe anteriormente durante 90 minutos y se observan bajo microscopio de fluorescencia (Fig. 4B). Los resultados muestran que un 89 % de los linfocitos incorporan $\beta 2m$ (Fig. 4 y 5).

2.3 – Aplicación de liposomas de prueba a linfocitos mantenidos "ex vivo" en cultivo

Para mostrar la relevancia de formular la proteína $\beta 2m$ con fines de orientar a los complejos MHC de los linfocitos en forma de suspensiones liposómicas, se incubaron los linfocitos con liposomas cargados con albúmina, una proteína que es posible detectar por fluorescencia usando una técnica relativamente sencilla.

Se ensayaron *ex vivo* la incorporación de la proteína a los liposomas y la aplicación de los liposomas producidos de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente basándose en fosfatidilcolina con Liss Rhod PE.

Se volvió fluorescente la proteína marcando con fluorescamina, un compuesto cuya fluorescencia es comparable con la de DAPI (diaminofenilindol, excitación a 372 nm y emisión de 456 nm). La albúmina cristalizada de suero bovino se volvió fluorescente usando la unión covalente de la fluorescamina con el extremo N-terminal de la proteína, usando el procedimiento descrito por Hames B.D. et al. ["Gel Electrophoresis of Proteins, a practical approach", Hames BD. and Rickwood D. eds. "The practical Approach Series", 2ª edición. IRL Press, Oxford, Nueva York, Tokio. pág. 67], excepto porque el marcaje se lleva a cabo en tampón de Tris-HCl (25 mM)/glicina (192 mM) (pH= 8,3) que no contiene detergente (SDS). Los liposomas formados, como se describe anteriormente, contienen 2 mg de albúmina fluorescente por ml de solución liposómica.

A continuación, se incubaron 0,2 ml de una suspensión de linfocitos (solución de Hank/EDTA 0,5 mM, pH= 7,4) que contiene 250.000 linfocitos con 0,2 ml de los liposomas así formados que contienen albúmina (tampón de Tris-HCl 25 mM/glicina 192 mM, pH= 8,3) durante 1 hora a 37 °C en atmósfera húmeda saturada con CO₂ (al 5 %).

Finalmente, se sedimentaron liposomas de control (200 μl), linfocitos de control (200 μl) y linfocitos tratados con liposomas cargados con proteína (200 μl) sobre cubreobjetos tratados y cubiertos con polilisina y laminina usando un procedimiento descrito por Rakotoarivelo C y col. ["Receptors to steroid hormones and aromatase are expressed by cultured motoneurons but not by glial cells derived from rat embryo spinal cord" (2004) *Neuroendocrinology* 80: 284-297].

Las preparaciones se observaron directamente mediante microscopio de epifluorescencia (Axiovert; Zeiss, Alemania) o se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % (p/v) en agua durante 30 minutos, aclarándose los cubreobjetos 3 veces con PBS (160 mM, pH= 7,2). Se permeabilizaron suavemente las preparaciones con Triton X-100 al 0,1 % (v/v), preparado en PBS, durante 5 min.

Se marcaron las células con anticuerpos primarios anti-HLA-ABC. En ciertos casos, se marcaron los núcleos celulares con Hoechst (fluorescencia 450 nm, emisión azul, DAPI). Los anticuerpos primarios, producidos en conejos, son los mismos que los usados para la "transferencia Western". Se diluyen los anticuerpos primarios a 1/50 y se diluyen a 1/160 los anticuerpos secundarios unidos a FITC (fluorescencia verde) producidos en cabra. Se llevaron a cabo las incubaciones de los anticuerpos en PBS que contiene seroalbúmina bovina al 2 %. Para la lente de 63 aumentos, se montaron los cubreobjetos con Fluorsave (Calbiochem, EE.UU.).

Las fotografías de las Figuras 2 y 3 muestran que los liposomas se adsorben sobre la superficie de los linfocitos y que la proteína marcada, contenida en los liposomas, se deposita sobre la superficie de membrana de dichos linfocitos.

Los resultados demuestran claramente la viabilidad del enfoque experimental que se propone para restaurar el equilibrio de membrana de HC/ β 2m.

15 2.4 – Estabilidad de liposomas (Figuras 6 a 8)

Se ensayaron los liposomas "de prueba" obtenidos anteriormente que contienen albúmina en diversas condiciones para evaluar su estabilidad con el tiempo.

20 Se ensayó la estabilidad en los lotes 30 (correspondiente a 30 mg de albúmina para 150 ml de liposoma) y 60 (correspondiente a 60 mg de albúmina por 150 ml de liposoma) frente al tiempo y la temperatura de incubación.

Los lípidos constituyentes de los liposomas estaban compuestos por 636 nmol de PC y 31,8 nmol de NBD-PC-oleílo. Después de evaporación hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno, se solubiliza la mezcla de lípidos gota a gota con agitación fuerte con 1 ml de PBS (pH ajustado a 7,2) que contiene 200 o 400 μ g de albúmina (Sigma, EE.UU.) (lotes 30 y 60, respectivamente). A continuación, se obtuvieron los liposomas por extrusión mecánica con el sistema Liposofast-basic (Sodexim, Francia). Se purificó entonces cada lote en una columna Sephadex G10. A un tiempo fijado, se depositaron 50 μ l de cada lote sobre un cubreobjetos recubierto con poli-D-lisina/laminina y se incubaron a 37 °C durante 12 h. A continuación, se unió el material biológico usando glutaraldehído durante 30 a 4 °C. Se tomaron imágenes (estabilidad a 1 mes de almacenamiento, Figura 6) usando el microscopio de epifluorescencia Axiovert 200 (Zeiss) y se registraron con la aplicación de software de visión Axion. Respecto a los estudios estadísticos (Figura 7), se midió el diámetro de los liposomas usando el software Serf (<http://www.org/serf>). Para el estudio de cada lote, se dividió la población liposómica en tres clases: < 50 nm, entre 50 y 100 nm y >100 nm de diámetro. Las alturas de los gráficos de barras representan el porcentaje de cada subpoblación de tamaño. El lote 60 mantenido a 37 °C muestra la mayor estabilidad durante 60 días de almacenamiento: 95 % de los liposomas tienen un diámetro <100 nm, que es un diámetro ideal para la transferencia de proteína a la superficie celular.

En cuanto al lote 80 (80 mg de β 2m; Figura 8), se ensayó en este el almacenamiento a 25 °C para minimizar la contaminación y evaporación durante 6 y 40 días. El procedimiento de preparación fue el mismo que el anterior para los lotes 30 y 60 (albúmina), excepto porque se usó β 2m no fluorescente (533 μ g/ml de PBS) y la purificación se llevó a cabo mediante un módulo de diálisis (membrana con un corte de 20 kDa, Thermo Scientific, EE.UU.). El gráfico de barras de la Figura 8 muestra claramente que, en esta etapa de almacenamiento, un 98 % de los liposomas mantienen el tamaño ideal, y esto durante hasta 40 días, para la transferencia de β 2m a linfocitos (concretamente, diámetro <100 nm).

45 2.5 – Protección de la β 2m exógena conferida por los liposomas frente a la degradación proteolítica por sueros humanos (Figuras 9)

Se tomaron sueros de donantes sanos y de donantes que padecen enfermedades autoinmunitarias (tiroiditis de Hashimoto, poliartritis reumatoide). Se incubaron estos sueros (90 μ l) durante 15 días a 25 °C en presencia de 2 μ g de β 2m pura (Sigma-Aldrich, EE.UU.) o en forma de liposoma (liposomas del lote 30 correspondientes a 30 mg de β 2m por 150 ml de liposomas). El volumen de reacción total era de 130 μ l, completado si es necesario con PBS (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH= 7,2). Se retiraron sucesivamente 10 μ l de ese medio de reacción (correspondiente a 150 ng), completados a 30 μ l con tampón de desnaturalización (PAGE-SDS, Laemmli) que contiene urea 6 M, a los 0, 1, 2, 3, 6, 10 y 15 días. Se mantuvieron estas muestras a -20 °C hasta el análisis.

Después de recoger todas las muestras, se incubaron estas durante 1 h a 50 °C. A continuación, se separaron las proteínas por PAGE-SDS en gel de acrilamida al 12 % (% de T= 12, % de C= 2,6) que contiene urea 4 M.

Después de electroelución en una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), se detectó la presencia de $\beta 2m$ mediante inmunotransferencia y se cuantificó la intensidad de la banda correspondiente con ImageJ (NIH, EE.UU.). Mediante el uso de una curva patrón, se convirtió el número de píxeles así obtenidos en pmoles de $\beta 2m$ (10^{-12} moles). Las gráficas presentadas en las Figuras 9A a F representan un ejemplo de los resultados obtenidos y expresan la cantidad de $\beta 2m$ (en pmoles) con el tiempo. Puede observarse que, en personas que padecen enfermedades autoinmunitarias, la $\beta 2m$ libre añadida al suero se degrada con el tiempo, lo que no es el caso en el control.

En conclusión, hay una degradación progresiva y significativa de la $\beta 2m$ libre por el suero de pacientes autoinmunitarios que no se encuentra en el control. Por otro lado, esta degradación no se observa cuando se encapsula $\beta 2m$ en liposomas. Para ser precisos, los liposomas parecen proteger a $\beta 2m$ frente a la degradación por suero, puesto que no se observó una reducción significativa de la cantidad.

En conclusión, los liposomas protegen a $\beta 2m$ de la degradación por suero.

2.6 – Asociación de la $\beta 2m$ contenida en los liposomas con las cadenas pesadas de HLA I localizadas en la superficie de membrana (Figuras 10).

En una persona sana y en condiciones fisiológicas, las moléculas de $\beta 2m$ expresadas sobre la superficie linfocítica están unidas no covalentemente con las cadenas pesadas de HLA a una relación de 1:1.

Para ver y cuantificar estas asociaciones proteicas, se desarrolló una técnica que posibilita ligar covalentemente entre sí estas proteínas, entre ellas los dímeros de HLA- $\beta 2m$.

El desarrollo de esta técnica era necesario para calcular la relación de HC/ $\beta 2m$ de membrana exacta y para mostrar que la adición de $\beta 2m$ en forma de liposoma se asocia específicamente con las cadenas pesadas de HLA I.

Para esto, se explotó la capacidad de un dialdehído, el glutaraldehído, de unirse a los grupos amina de las proteínas mediante sus dos grupos aldehído. Estos grupos aldehído se ligan entre sí por una cadena flexible de tres metilenos que posibilita que el glutaraldehído reticule estadísticamente dos grupos amina procedentes de dos proteínas que interaccionan (Sun, T.T., y col. (1974) "Protein-protein proximity in the association of ribosomal subunits of *Escherichia coli*: crosslinking of 30S protein S16 to 50S proteins by glutaraldehyde or formaldehyde". *J. Mol. Biol.* 87(3): 509-22).

De acuerdo con este procedimiento, se lavaron 5 millones de linfocitos purificados por MSL una vez con PBS (pH= 7,2) para eliminar las posibles trazas de aminas libres, se sedimentaron entonces por centrifugación a 10.000 g durante 10 min y se eliminó el líquido sobrenadante. Se incubaron entonces las células durante 5 minutos a temperatura ambiente en 1 ml de PBS que contiene 0,25 % de glutaraldehído. Durante esta incubación, se invirtió el tubo varias veces.

Se obtuvo la terminación de la reacción mediante la adición de 100 μ l de Tris 1 M (pH= 7,2), neutralizando el glutaraldehído el exceso de grupos amina proporcionado por el tampón. Se recuperaron los linfocitos por centrifugación a 10.000 g durante 10 min y se lavaron entonces en 1 ml de PBS para eliminar las trazas de glutaraldehído. Después de la centrifugación, se recuperó el sedimento en 400 μ l de tampón de Laemmli que contiene urea 4 M y que comprende antiproteasas (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y 5 % de β -mercaptoetanol y se mantuvo entonces a -20 °C hasta el análisis.

Para asegurar la lisis de las células, la muestra experimentó 3 ciclos de congelación-descongelación y se agitó con vórtex extensamente. Se incubaron entonces las muestras durante 5 min a 95 °C y se centrifugaron durante 10 min a 4.000 g para eliminar cualquier residuo insoluble. Se separaron las proteínas (10 μ l de homogeneizado correspondiente a 125.000 linfocitos) por PAGE-SDS en geles de acrilamida al 10 % (% de T= 10, % de C= 2,6) que contienen urea 4 M a voltaje constante (120 V). Se transfirieron las proteínas así separadas semisecas durante 40 min a 13 V en presencia de tampón de tris-glicina con metanol al 10 % sobre una membrana de PVDF activada previamente con metanol.

Se llevó a cabo la detección de la $\beta 2m$ mediante incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con un anticuerpo primario anti- $\beta 2m$ diluido a 1/600 (DakoCytomation, Dinamarca) y de nuevo 1 hora con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con fosfatasa alcalina y diluido a 1/20.000 (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Se efectuó la

cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas con la aplicación de software ImageJ (NIH, EE.UU.).

La Figura 10A muestra una fotografía del gel obtenido. En presencia de glutaraldehído, es visible una banda a 55 kDa además de la banda habitual a 12 kDa. Esta banda a 55 kDa corresponde al complejo de HLA- β 2m, correspondiendo el peso molecular a la adición de los pesos moleculares de una molécula de β 2m y de una cadena pesada: $12+43 \text{ kDa} = 55 \text{ kDa}$. En el mismo carril, la banda a 12 kDa corresponde a la β 2m libre no complejada. Después de cuantificar la intensidad de cada banda, se comprobó que la intensidad acumulada de estas dos bandas a 12 y 55 kDa corresponde a la intensidad de la banda de 12 kDa en el carril “sin glutaraldehído” y que corresponde a la β 2m total. En ambos carriles, con y sin glutaraldehído, se depositó la misma cantidad de proteínas totales correspondiente al mismo número de linfocitos.

Para proporcionar evidencias de que la cuantificación de la banda a 55 kDa da realmente la cantidad de complejo de HLA- β 2m presente en la superficie linfocítica, se usó una técnica en paralelo para purificar membranas plasmáticas de linfocitos. Esta técnica permitía específicamente estudiar las proteínas de la membrana plasmática linfocítica. Se determinó la presencia de β 2m de membrana y se cuantificó (véase la Figura 10B). El resultado obtenido es comparable a la cuantificación de la banda a 55 kDa, lo que confirma que esta banda corresponde realmente con el complejo de HLA- β 2m de membrana. Además, la proporción de β 2m de membrana respecto a la β 2m total (Figura 10B) es igual a la relación de intensidades de la banda a 55 kDa/banda a 12 kDa de β 2m total (Figura 10A).

Se usó la técnica de glutaraldehído, así validada, para ver y cuantificar el grado de incorporación a los linfocitos aislados de sangre humana de la β 2m transportada por los liposomas.

Se seleccionaron dos donantes, uno sano usado como control y el otro que padece esclerosis múltiple. Se eligió el segundo donante debido a su déficit de β 2m de membrana respecto a las cadenas pesadas de HLA I. Este paciente tiene una relación de HC/ β 2m de membrana igual a 1,7, lo que significa que la membrana linfocítica contiene un 69 % más cadenas pesadas que β 2m.

Se separaron los linfocitos de los dos donantes (25 ml de sangre) en dos lotes de 4 ml cada uno; se añadieron 2 ml de liposomas que contienen β 2m una concentración de 40 mg para 150 ml (lote 40) a los 4 ml de linfocitos. Se recogieron inmediatamente los linfocitos a T_0 y se lavaron con PBS. Se incubaron los linfocitos muestreados a T_{90} con los liposomas durante 90 min a 37 °C, antes de recoger y lavar con PBS para eliminar los liposomas en exceso que no han reaccionado.

En cada una de las dos condiciones, se analizaron dos poblaciones de linfocitos que se habían tratado o no con glutaraldehído (véase el protocolo anterior).

Se separaron las proteínas totales en cada condición por PAGE-SDS, y se revelaron entonces por transferencia Western. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 10C y se encontró que, después de la cuantificación, al contrario que el control y en presencia de glutaraldehído, la intensidad de la banda de 55 kDa (que representa el complejo de HLA- β 2m) había aumentado un 55 % a T_{90} respecto a T_0 .

Este aumento es consistente con el déficit de β 2m en ese paciente, que causa la presencia de cadenas de HLA-1 libres sobre la superficie linfocítica. Por tanto, las cadenas pesadas no se asocian realmente con la β 2m exógena proporcionada por los liposomas.

El enfoque experimental puesto en marcha posibilitaba la prueba para proporcionar para el concepto terapéutico de la invención, concretamente, que:

- es posible restablecer el equilibrio de HLA- β 2m mediante la adición a la superficie linfocítica de β 2m exógena en forma de liposomas;
- un paciente que tiene un déficit de β 2m puede incorporar más β 2m que un control que no tiene necesidad de ello;
- la β 2m incorporada se asocia realmente con las moléculas de HLA libres formando dímeros de HLA- β 2m.

En resumen, los datos experimentales obtenidos confirman que es posible, usando preparaciones liposómicas de β 2m, orientar a linfocitos presentadores de cadenas pesadas libres ($\text{HC}/\beta\text{2m} > 1$) con el fin de restablecer una relación de HC/ β 2m cercana a la norma fisiológica, concretamente que se acerca a 1.

3 – Análisis de toxicidad de composiciones liposómicas de β 2m

Se ensayó “*in vitro*” en β 2m en forma liposómica su posible toxicidad en cultivos de hígado, riñón, músculo esquelético y células de corazón de origen humano.

5 3.1 – Tipos de células ensayados

Se adquirieron las células ensayadas y los medios de cultivo en Sciencell Research Laboratories (6076 Corte Del Cedro, Carlsbad, California).

- 10 **a. HCF:** Células de fibroblasto cardiaco humanas primarias, lote nº 2136, medio de cultivo: FM (medio de fibroblastos), lote nº 5673 + solución de crecimiento de fibroblastos, lote nº 5863 + FBS al 10 % + solución de penicilina (100 U/ml)-estreptomicina (100 µg/ml), lote nº 5917
 - b. HREpiC:** Células epiteliales renales humanas primarias, lote nº 0546, medio de cultivo: medio de células epiteliales, lote nº 5967 + solución de crecimiento de células epiteliales, lote nº 5855 + FBS al 10 % + PS
 - 15 **c. HH:** Células hepatocíticas humanas primarias, lote nº 4607, medio de cultivo: HM (medio hepatocítico), lote nº 5933 + solución de crecimiento de hepatocitos, lote nº 5722 + FBS al 10 % + PS
 - d. HSkMC:** Células de músculo esquelético humanas primarias, lote nº 5606, medio de cultivo: medio de células de músculo esquelético + SkMGS + FBS al 10 % + PS.
- 20 Se dispusieron los matraces o discos de cultivo en una incubadora (Sanyo) a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad saturada (baño que contiene agua ultrapura filtrada con 0,22 µm, Nanopure, Thermo-Fisher).

El sustrato de cultivo para las células humanas primarias es plástico tratado con cultivo celular (TPP, Suiza) incubado con poli-L-lisina a 2 µg/cm² (Clinisciences; Sciencell Research Laboratories, nº de lote 5826, solución: 10 mg/ml) durante 1 noche en la incubadora y aclarado dos veces con agua estéril ultrapura antes de la inoculación.

- 25

3.2 – Desprendimiento y disociación de la capa celular

- Se llevó a cabo entonces el desprendimiento de la capa celular eliminando el medio preparado del matraz de cultivo y aclarando la capa con PBS estéril (SIGMA, nº de lote 088K2356) entonces, tratándola con una solución de tripsina al 0,05 % (SIGMA Trypsin Ref T-1426, lote nº 020M7354), EDTA 0,2 g, NaCl 8 g, KCl 0,4 g, NaHCO₃ 0,58 g, glucosa 1 g (SIGMA), cs de 1 litro de agua ultrapura, solución esterilizada por filtración de membrana (PES) de 0,22 µm de porosidad, lote CML nº 668919), se ajustó el volumen de la solución de tripsina al tipo de matraz (p.ej., 1 ml para un matraz de 25 cm²) y se dispuso entonces el matraz de cultivo a 37 °C (incubadora Sanyo) durante 3 a 4 minutos.

- 35
- Cuando se desprendieron las células de su sustrato, se puso en marcha la disociación en presencia de medio de cultivo con suero (inhibición de la acción enzimática de la tripsina) enviado de un lado a otro con una pipeta (de 5 a 10 ml de acuerdo con el tipo celular).

- 40

3.3 Prueba de toxicidad

- Se contaron las células usando un Thoma cell (Thermo Fisher) bajo microscopio óptico (Nikon) y se sembraron en una cantidad de 5.000 células por pocillo en 200 µl de su medio de cultivo respectivo en un disco de cultivo de fondo plano con 96 pocillos de plástico tratado con cultivo celular (NUNC, nº de lote 114754), después de la preparación se dispusieron entonces los discos en una incubadora durante 24 h. Se concentraron las diversas diluciones de las sustancias para ensayar tres veces a 100 µl de medio sin antibióticos, que se añadieron a 200 µl de cada pocillo para tratar (volumen total: 300 µl). A las 24 h, a las 48 h y a las 72 h, se examinaron los pocillos tratados y los pocillos de control de acuerdo con los protocolos de MTT (azul de bromuro de tiazoliltetrazolio) [Liu Y. y col. (1997) “Mechanism of cellular MTT reduction”. *J. Neurochem.* 69: 581-593] y la valoración de proteínas (Ref 23227, kit de ensayo de proteínas BCA; Pierce) para evaluar la toxicidad celular:

- Adición de solución de MTT para una concentración final de 25 µg/ml
- Incubación durante 1 h a 37 °C
- 55 • Aspiración del medio
- Adición de 100 µl de DMSO (200 µl si es DO de saturación)
- Lectura del disco (Biorad) a 490 nm
- Procesamiento informático con Excel.

- Resta del ruido de fondo usando pocillos vacíos (blancos)
- Determinación de la relación de DO de pocillos X/DO de pocillos de control
- Trazada de la curva de esa relación frente a la concentración de fármaco

5 Se midió la toxicidad a las 24 h y 48 h de tratamiento, concretamente $t_0 + 48$ h y $t_0 + 72$ h.

Las Figuras 11 y 12 muestran claramente que, incluso a dosis alta (lote 132), la $\beta 2m$ recubierta con liposoma no afecta a la viabilidad de los hepatocitos y células renales, que son sin embargo sensibles a $\beta 2m$. Lo mismo se aplica a las células de origen cardíaco y células de músculo esquelético (resultados no mostrados).

10

REIVINDICACIONES

1. Un producto farmacéutico, caracterizado porque consiste en β 2-microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína β 2-microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma.
2. Un producto farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho ingrediente activo es la proteína β 2-microglobulina humana.
3. Un producto farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho ingrediente activo es una variante funcional de la proteína β 2-microglobulina que presenta al menos un 80 %, y preferiblemente un 90 %, de identidad con la proteína β 2-microglobulina humana.
4. Un producto farmacéutico **caracterizado porque** consiste en β 2-microglobulina, o una variante funcional de esa proteína que presenta al menos un 70 % de identidad con la proteína β 2-microglobulina humana, como ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
5. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho ingrediente activo es la proteína β 2-microglobulina humana.
6. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde dicho ingrediente activo es una variante funcional de la proteína β 2-microglobulina que presenta al menos un 80 %, y preferiblemente un 90 %, de identidad con la proteína β 2-microglobulina humana.
7. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6, **caracterizado porque** la enfermedad autoinmunitaria tratada es poliartritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, escleroderma, fibromialgia, miositis, espondilitis anquilosante, diabetes insulino dependiente de tipo I, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica.
8. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
9. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el tratamiento de esclerosis múltiple.
10. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el tratamiento de enfermedad de Crohn.
11. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el tratamiento de poliartritis reumatoide.
12. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el tratamiento de diabetes insulino dependiente de tipo I.
13. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en el aumento de la concentración de β 2-microglobulina sanguínea a una concentración comprendida entre 2,5 y 12 mg/l, preferiblemente entre 3 y 8 mg/l, más preferiblemente entre 3 y 5 mg/l en un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria.
14. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en la restauración de una relación molar de HC/ β 2-microglobulina normal en los complejos MHC I de membrana en un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria.
15. Un producto farmacéutico para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 o 6 en la prevención de que aparezca un déficit de β 2-microglobulina en los complejos MHC I en un paciente que padece una

enfermedad autoinmunitaria.

16. Un producto farmacéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** consiste en un liposoma cargado con β 2-microglobulina o con una variante funcional de esa proteína.
- 5 17. Un producto farmacéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se prepara β 2-microglobulina en forma salina y se incuba previamente *ex vivo* en contacto con la sangre, el suero o los linfocitos del paciente para tratar.
- 10 18. Una composición que comprende un producto farmacéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
19. Un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, **caracterizado porque** comprende una etapa consistente en determinar la relación de HC/ β 2-microglobulina intracelular o de membrana de
15 los complejos MHC I de un paciente.
20. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado porque** la relación de HC/ β 2-microglobulina de los complejos MHC I es una relación de membrana.
- 20 21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, **caracterizado porque** comprende las etapas de:
- i) extraer los complejos MHC I de células, preferiblemente linfocitos, de un paciente en que se va a cribar una enfermedad autoinmunitaria;
- 25 ii) determinar las cantidades respectivas de HC y β 2-microglobulina contenidas en dichos complejos MHC I;
- iii) establecer la relación molar de HC/ β 2-microglobulina de dichos complejos MHC I;
- iv) comparar la relación de HC/ β 2-microglobulina obtenida con la de una muestra de control.

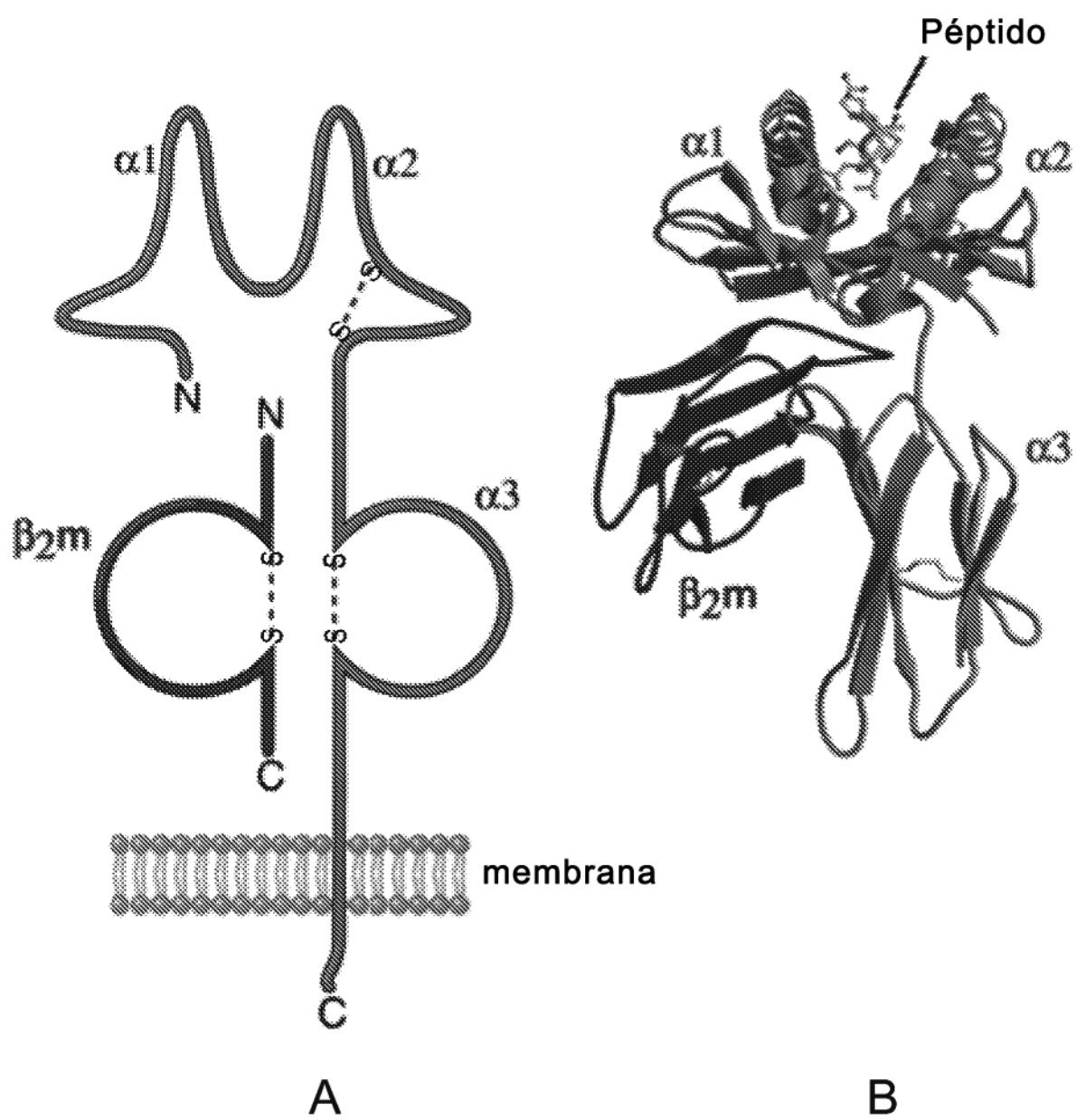


Fig. 1

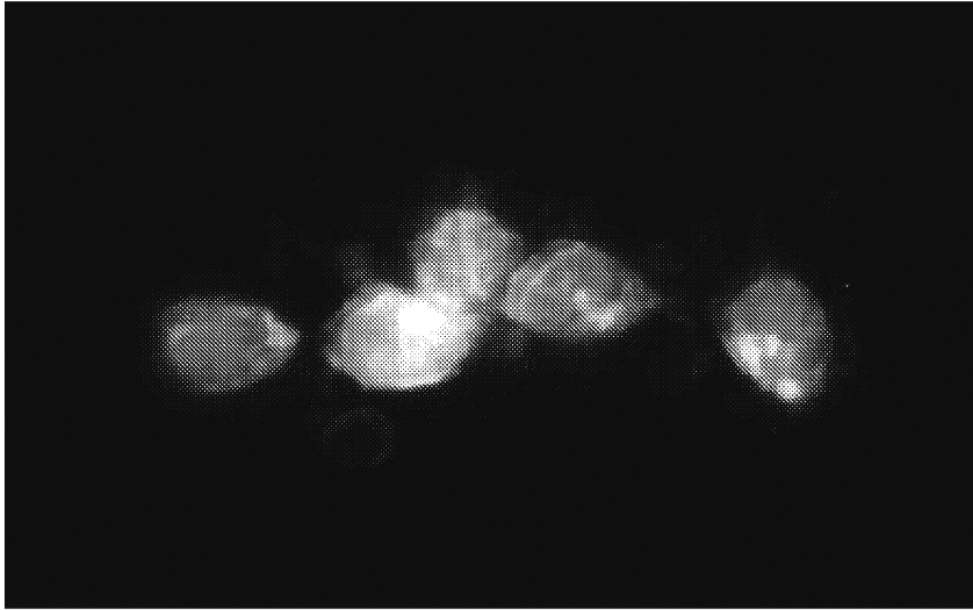


Fig. 2

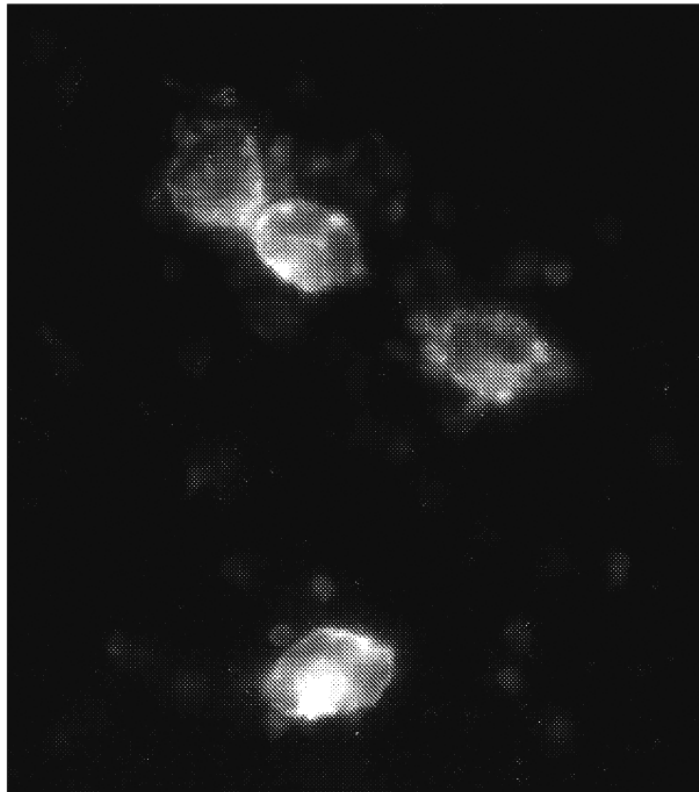


Fig. 3

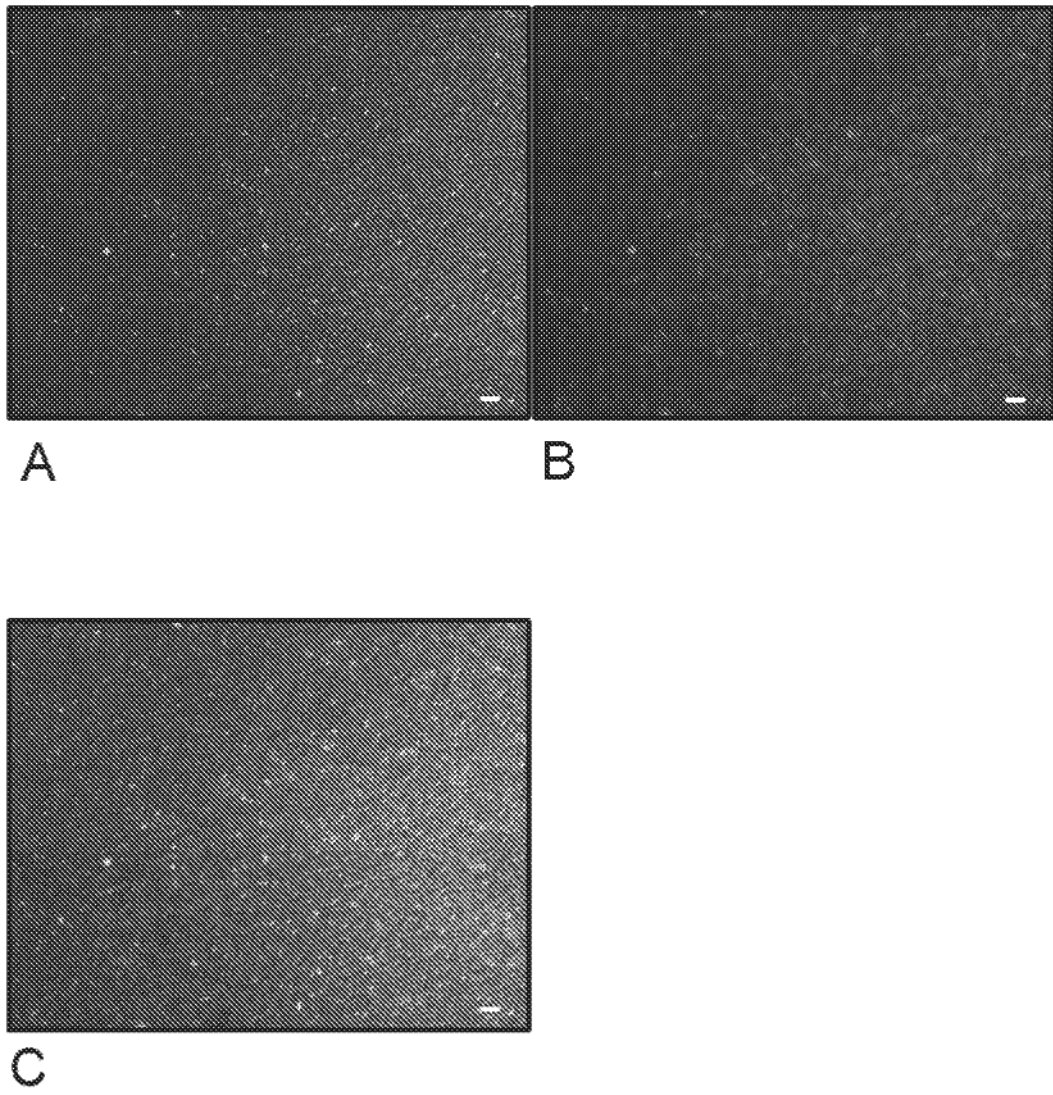


Fig. 4

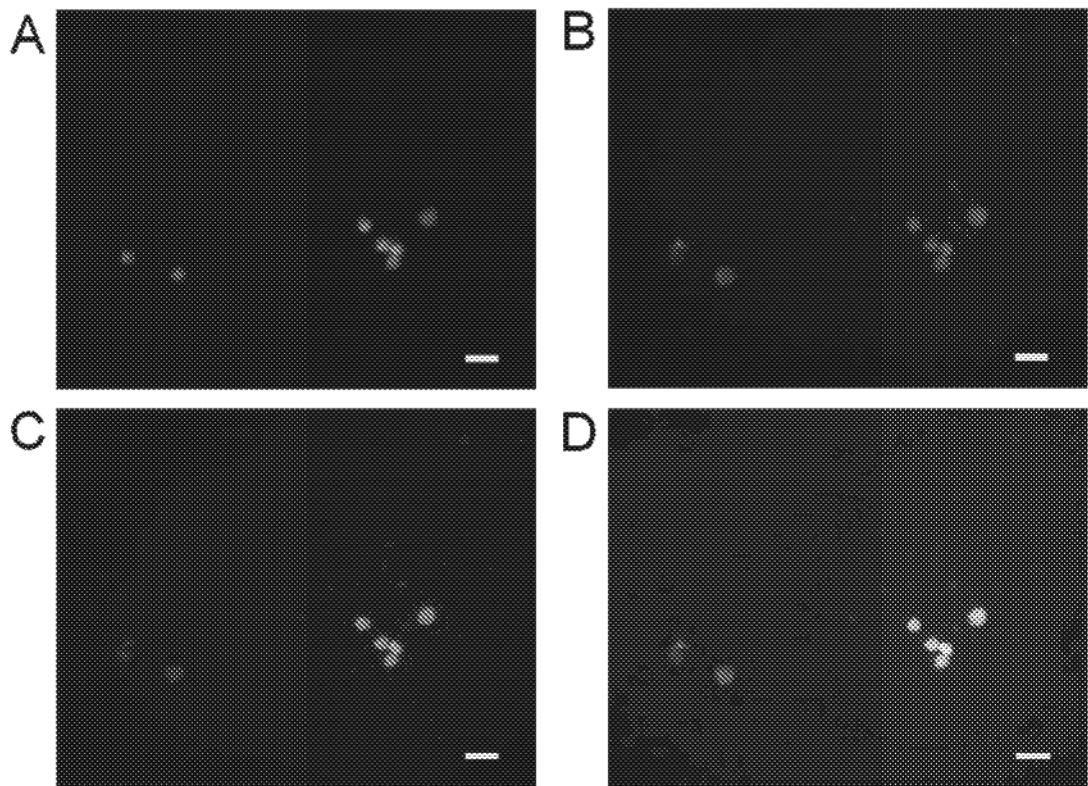


Fig. 5

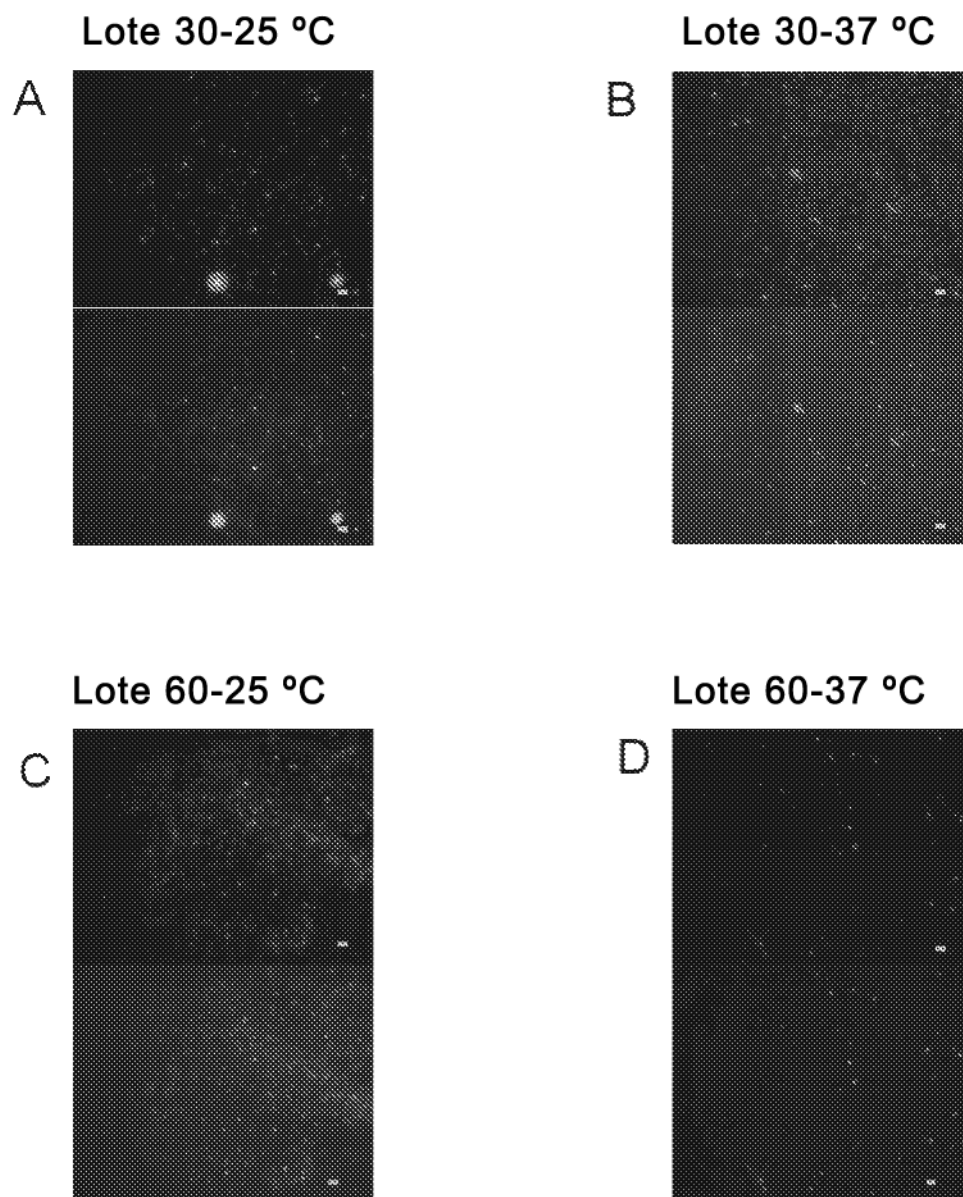
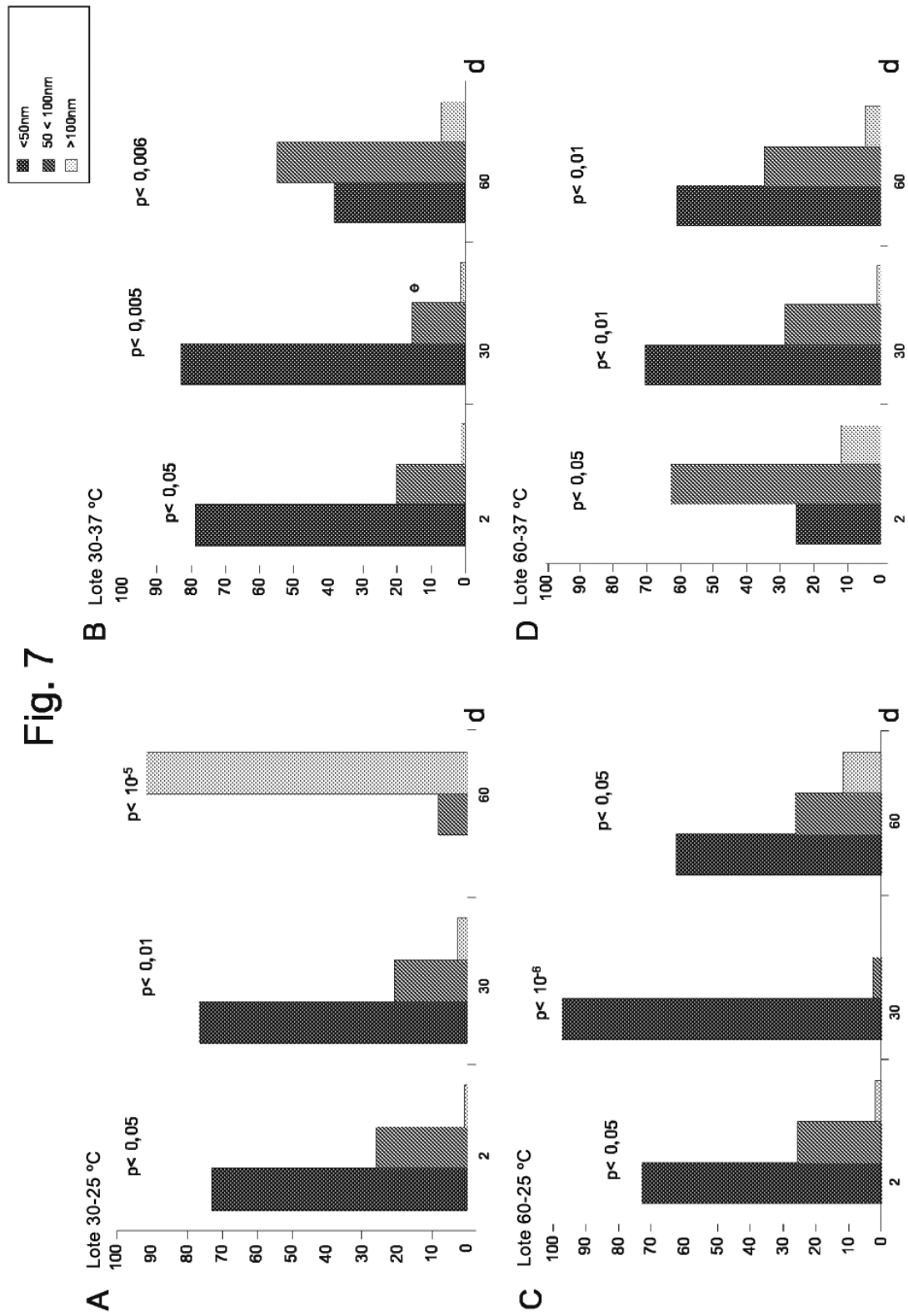


Fig. 6



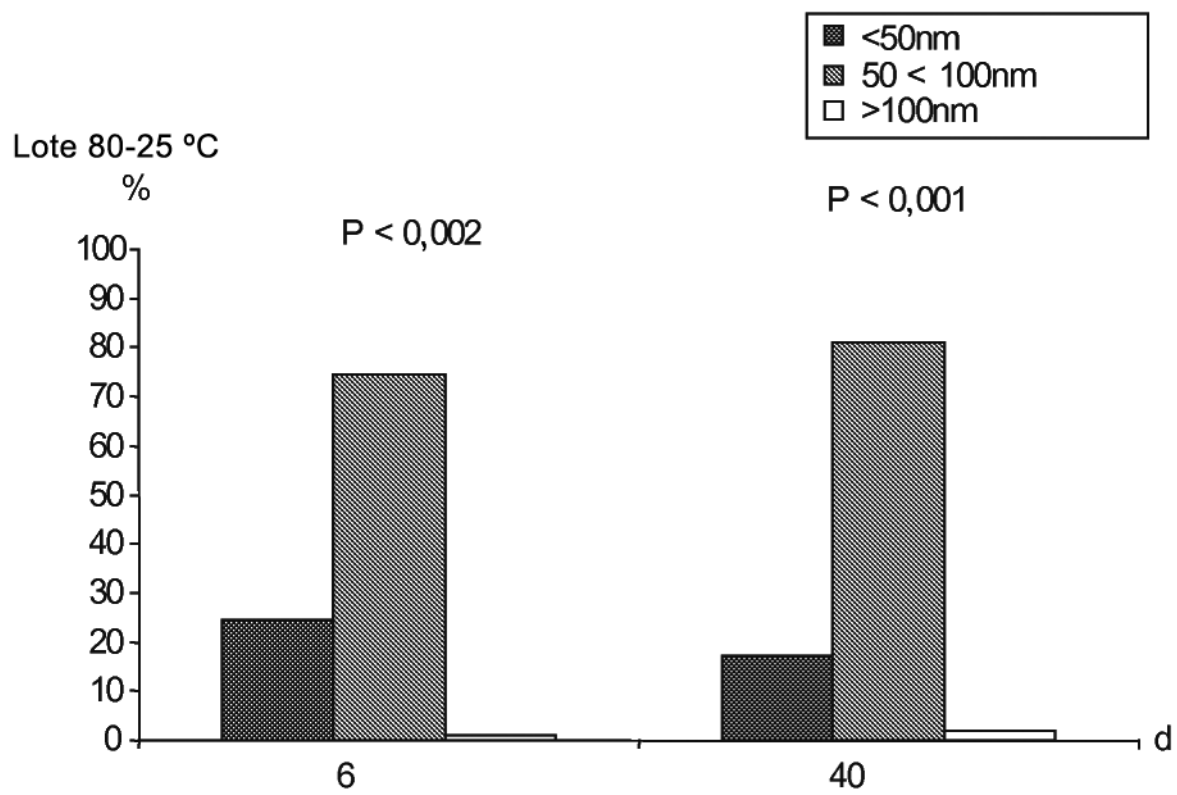


Fig. 8

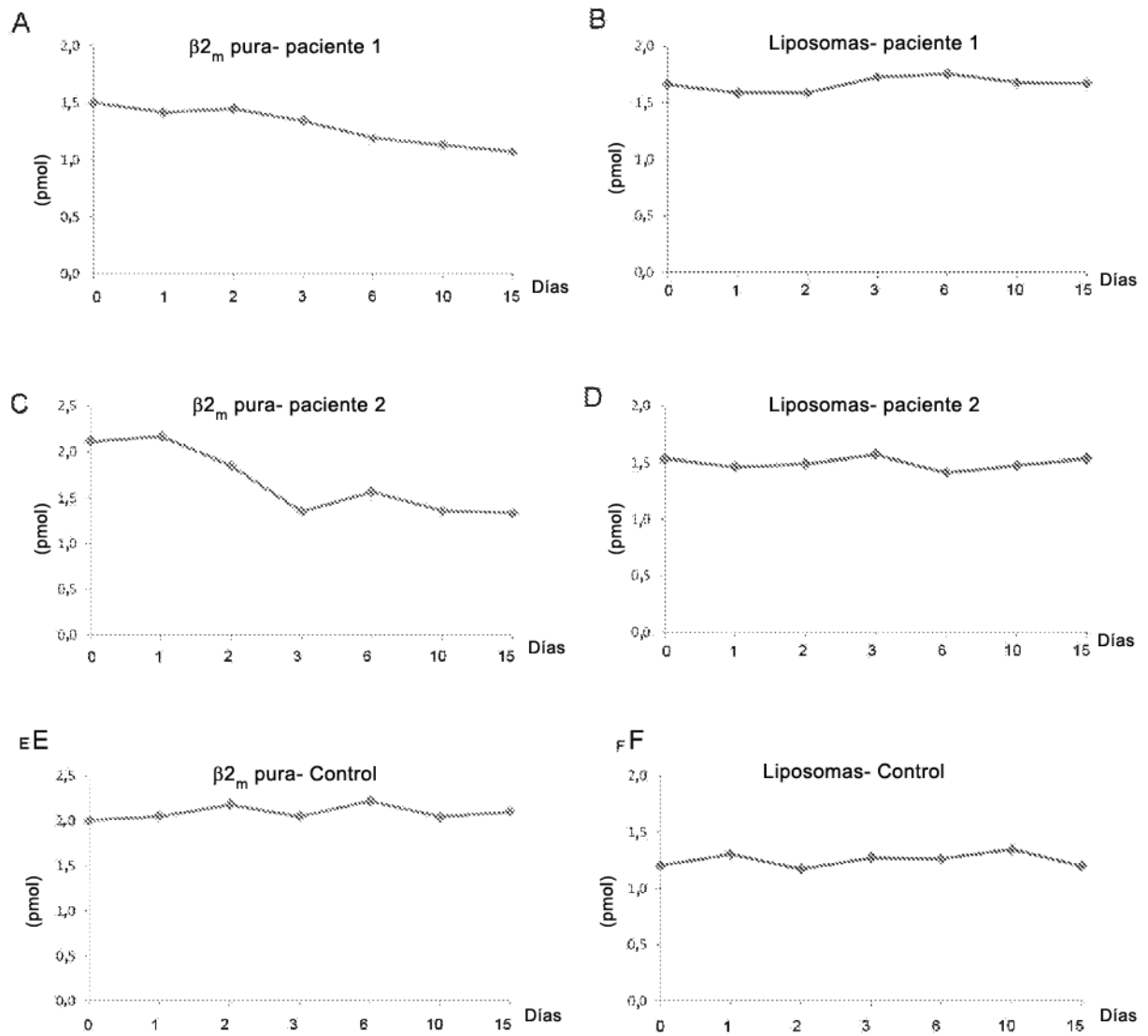


Fig. 9

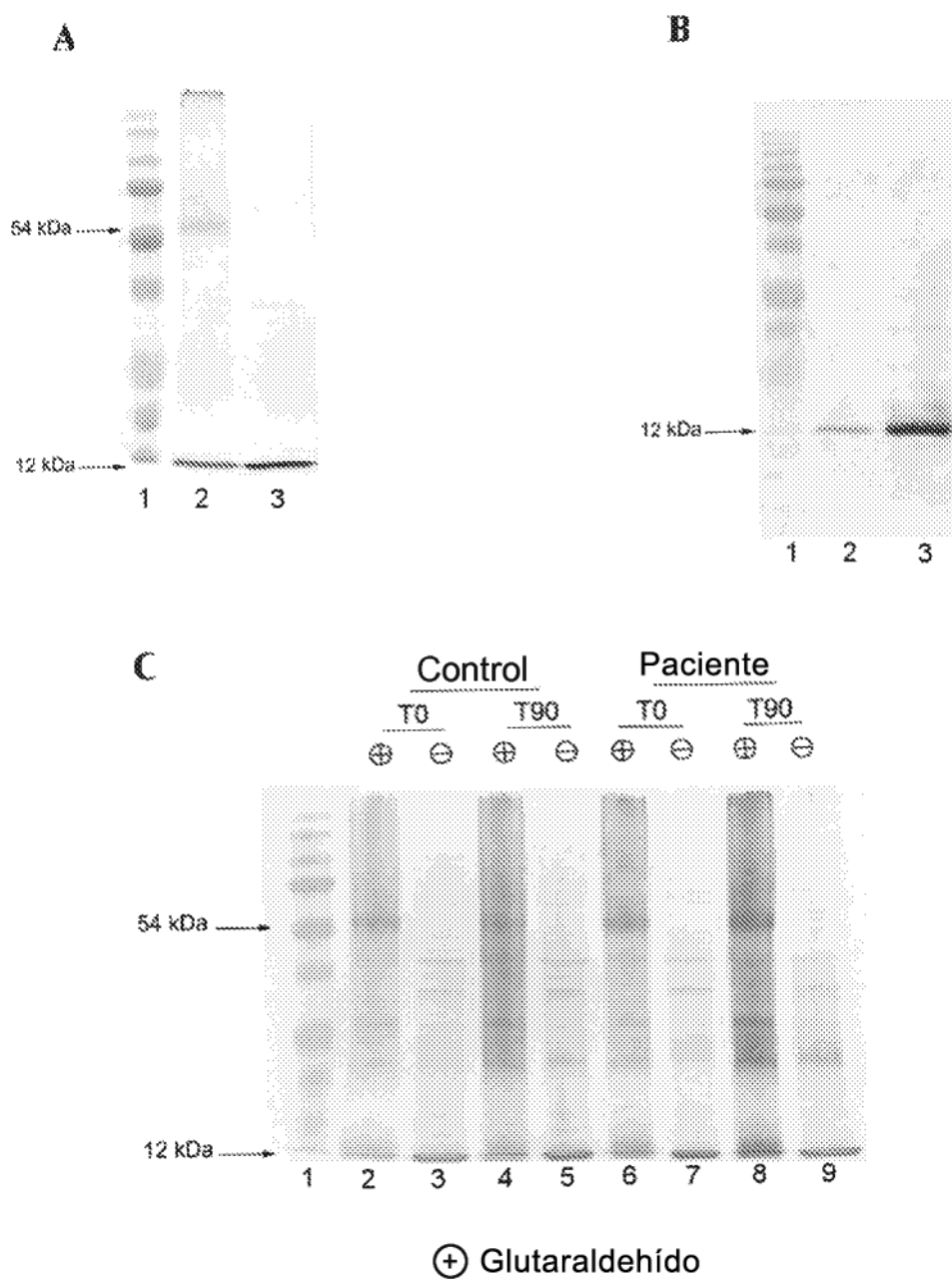


Fig. 10

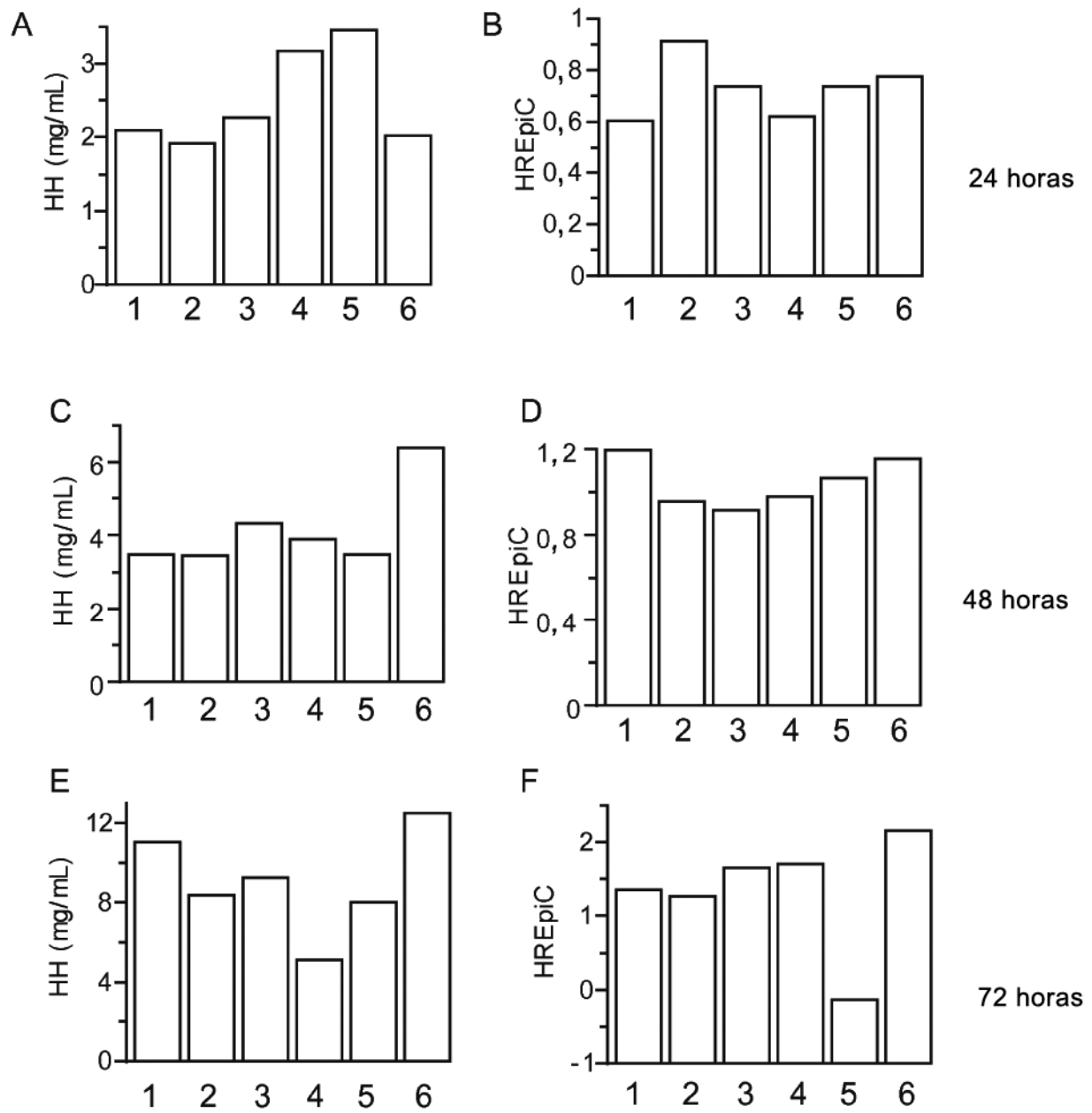


Fig. 11

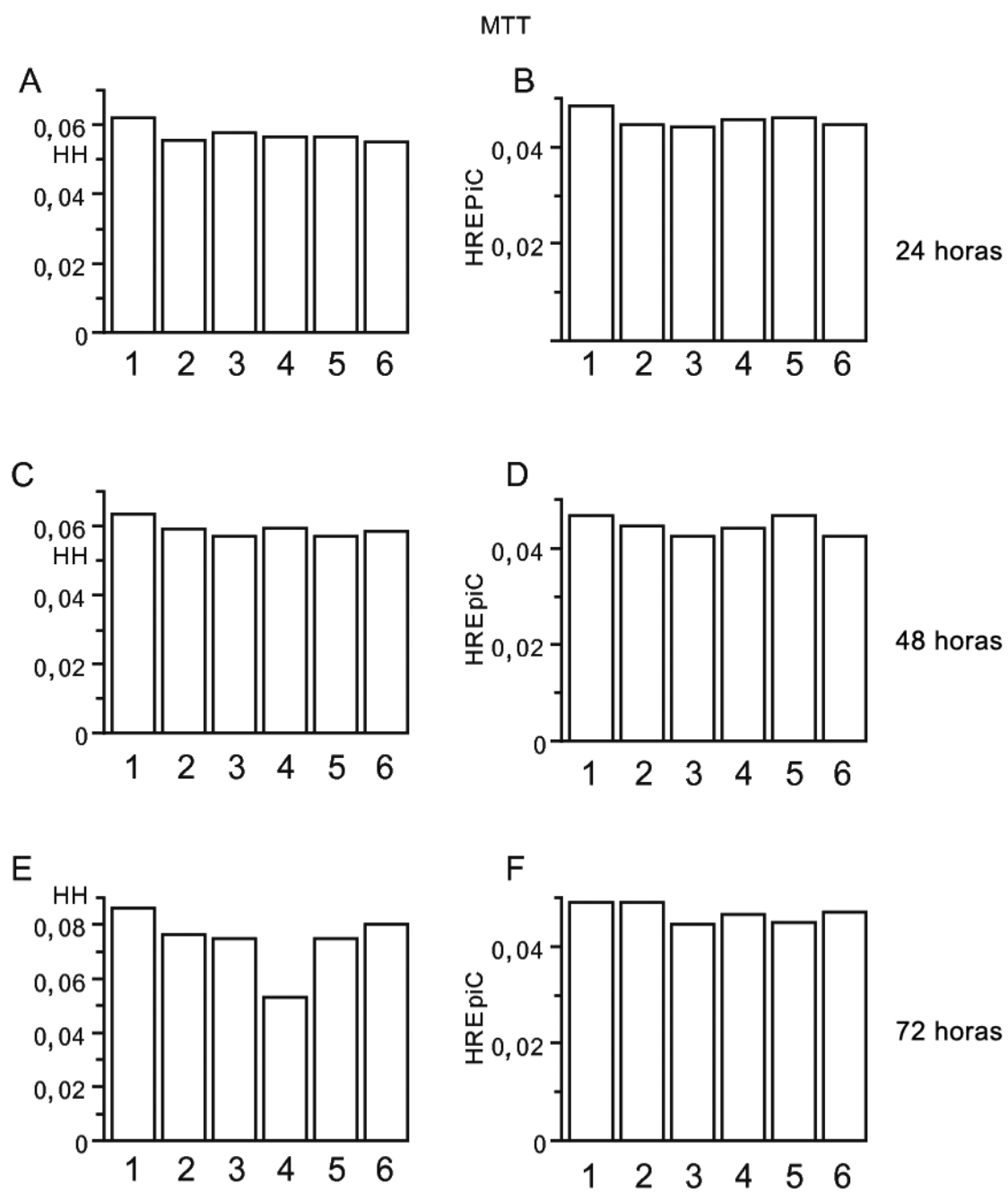


Fig. 12