

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 326**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/40</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2011 PCT/IB2011/050623**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11098990**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11711655 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2536419**

54 Título: **Transferrina para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

**15.02.2010 IT FI20100020**

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

**28.06.2018**

73 Titular/es:

**KEDRION S.P.A. (100.0%)  
Localita' ai Conti 5  
55051 Castelvecchio Pascoli - Barga, IT**

72 Inventor/es:

**FARINA, CLAUDIO;  
ASCIONE, ESTER;  
GIOVACCHINI, PIERANGELO y  
NICOLETTI, FERDINANDO**

74 Agente/Representante:

**RUO , Alessandro**

**ES 2 674 326 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

Transferrina para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se define en las reivindicaciones 1-10 y se refiere al campo de composiciones farmacéuticas que contienen transferrina, útiles en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades autoinmunes.

10 **Estado de la técnica**

[0002] Las enfermedades autoinmunes constituyen un grupo de enfermedades causadas por una deficiencia del sistema inmune que provoca su reacción contra los propios tejidos del organismo.

15 [0003] La modificación de los mecanismos de reconocimiento de células que normalmente permiten que el organismo distinga entre "propios" y "ajenos", es decir, entre elementos que pertenecen al cuerpo y elementos que son extraños, da lugar a la producción de anticuerpos que pueden dirigirse a órganos en solitario (enfermedades específicas de órganos) o desencadenar trastornos sistémicos, dañando las funciones del individuo en conjunto.

20 [0004] Brevemente, los linfocitos T colaboradores, que constituyen un componente esencial de la respuesta inmune, pueden dividirse en dos tipos sobre la base de la combinación de citoquinas secretadas como respuesta a la estimulación antigénica. Los clones de linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) secretan interleuquina 2 (IL2), interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) y linfoxina, mientras que los clones de linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) expresan interleuquinas 4, 5 y 6 (IL4, IL5, IL6). Las diferencias en el patrón de secreción de citoquina de Th1 y Th2 dan lugar a  
25 funciones celulares muy diferenciadas. Th1 y Th2 producen citoquinas que son capaces de inhibirse mutuamente entre sí: El IFN $\gamma$  producido por Th1 inhibe la proliferación de clones Th2 *in vitro*, mientras que la citoquina denominada CSIF (factor de inhibición de síntesis de citoquina) puede inhibir la proliferación de clones Th1. Estos efectos de mutua inhibición pueden ser importantes en una respuesta inmune temprana.

30 [0005] El predominio de una respuesta Th2 es típico de estados de tolerancia inmune (p.ej., embarazo fisiológico y tolerancia de trasplantes), mientras que un aumento de la respuesta Th1 es característico de estados de intolerancia inmunológica.

35 [0006] En particular, la activación de linfocitos Th1 es una característica del desarrollo de enfermedades autoinmunes específicas de varios órganos (p.ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, tiroiditis y enfermedad de Crohn).

40 [0007] La capacidad de las citoquinas de tipo 1 (Tc1) de estimular células efectoras de la respuesta inmune indica que su producción en exceso, asociada a una reducción de citoquinas de tipo 2 (Tc2), pueda ser una de las principales causas relacionadas con la patogénesis de enfermedades autoinmunes. En particular, según las pruebas de experimentos clínicos, se ha demostrado una mayor producción de citoquinas de tipo 1 en diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto (Parish NM 1995), enfermedades autoinmunes del hígado y artritis reumatoide.

45 [0008] Teniendo todo esto en cuenta, se puede deducir fácilmente que uno de los objetivos de la inmunología es lograr regular el equilibrio Th1/Th2-Tc1/Tc2 para controlar el inicio y progresión de las enfermedades mencionadas. Esto significa que los fármacos con capacidad para modular la producción de citoquinas como para inhibir la respuesta de citoquina de tipo 1 y estimular la respuesta de la de tipo 2 puedan tener cualidades  
50 inmunofarmacológicas que pudieran hacerlos idóneos para el tratamiento de las enfermedades mencionadas. Es decir, el bloqueo de citoquinas Th1 y/o la inducción de una respuesta Th2 podrían tener un papel protector en tales casos.

[0009] Actualmente, es posible perseguir este objetivo mediante la administración de citoquinas recombinantes, antagonistas de citoquina o cortisona, sin embargo, la administración de estas moléculas suele ir acompañada de  
55 efectos tóxicos para diversos sistemas del organismo.

[0010] La transferrina humana forma parte de una gran familia de glucoproteínas que constituyen importantes componentes del sistema inmune innato, que se encuentran en diversos fluidos de secreción, como el suero o la  
60 leche materna.

[0011] La transferrina humana (Tf) consiste en una cadena simple de polipéptidos con 670-690 restos de aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. La transferrina se une a dos iones Fe<sup>3+</sup> con una alta afinidad ( $K_d \approx 10$ -20 M) junto con dos aniones asociados sinérgicamente. Esto significa que en el plasma coexisten cuatro isoformas de transferrina diferentes, que difieren en cuanto al contenido en hierro; mediante técnicas de  
65 electroforesis, es posible separar y aislar estas formas en:

- 1) Apotransferrina (APOTf, sin iones de hierro)
- 2) transferrina monoférrica (con hierro en el dominio C-terminal)
- 3) transferrina monoférrica (con hierro en el dominio N-terminal)
- 4) transferrina diférrica (con hierro en los dos sitios de unión)

5

**[0012]** En condiciones fisiológicas, un 30 % de la transferrina en plasma está saturada con iones de hierro.

**[0013]** Existen diversas aplicaciones médicas conocidas para preparaciones farmacéuticas que contienen Tf humana para el tratamiento de diversas enfermedades.

10

**[0014]** Tf puede disolver la unión de insulina con su receptor en células de mamífero, de manera que se ha utilizado para tratar hipoglucemia para inhibir la producción de insulina y reducir los niveles de insulina en suero en mamíferos (Vargas L.A. et al., patente estadounidense US 6.069.193).

15

**[0015]** Se ha utilizado la aplicación local de apotransferrina (APOTf) como un potente inhibidor de la adhesión bacteriana en implantes médicos y para reducir las infecciones asociadas con el implante (Ardehali R. et al., patente estadounidense US 6.126.955).

20

**[0016]** Se han utilizado preparaciones farmacéuticas de Tf como adyuvantes con antibióticos para tratar infecciones bacterianas de biopelículas en implantes prostéticos (Kedrion S.p.A., patente internacional WO2008/142102).

25

**[0017]** Se ha utilizado APOTf para reducir la alta cantidad de hierro libre en el suero de pacientes con enfermedades neoplásicas malignas (p.ej., leucemia) o pacientes que están recibiendo tratamientos citotóxicos contra el cáncer (las altas concentraciones de hierro no unido a Tf, NTBI, causan daños tisulares graves en dichos pacientes) (Parkkinen J. et al., patente estadounidense US 6.326.473 B1).

30

**[0018]** Se ha utilizado Tf también para combatir los efectos perjudiciales de sustancias citotóxicas, sustancias antiinflamatorias, en particular antibióticos agresivos y agentes antineoplásicos (Pierpaoli W., patente estadounidense US 6.328.966 B1).

35

**[0019]** Finalmente, se ha propuesto el uso de Tf en solitario o en combinación con eritropoyetina para el tratamiento de anemia y, en particular, la anemia asociada con infecciones crónicas, estados inflamatorios graves o cáncer (Thomas L., patente estadounidense US 2003/0229012 A1).

40

**[0020]** En los últimos años, diversos estudios han demostrado que Tf también posee propiedades inmunomoduladoras.

45

**[0021]** Los experimentos realizados de cultivos de linfocitos mixtos, inducidos para proliferar como respuesta a la estimulación con aloantígenos, han demostrado que Tf y glucanos derivados de Tf influyen en la proliferación de estas células (Lesnikova M, et al. J Hematother Stem Cell Res 2000, 9(3):381-92). A través del análisis de las variaciones del patrón de citoquinas producidas como respuesta a la estimulación con Tf, se ha demostrado que esta proteína y sus derivados, glucano en particular, inducen una regulación a la alza de interleuquina-10 (IL-10) y una regulación a la baja de interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , IL-2 y IL-12. Esto ha llevado a deducir que Tf puede ser activo para establecer una tolerancia inmune en receptores de trasplante alogénico; de hecho, se han utilizado preparaciones farmacéuticas que contienen agrupaciones de transferrina humana en combinación con trasplantes de células o tejidos extraños en mamíferos para inducir un estado de tolerancia inmune suficiente como para reducir al mínimo los riesgos de la llamada enfermedad injerto contra huésped (GvHD) (Pierpaoli W., patente estadounidense US 6.255.278 B1).

50

**[0022]** Por lo tanto, existe una evidente necesidad de proporcionar una alternativa válida a los tratamientos inmunosupresores utilizados actualmente en individuos con sistemas inmunes hiperactivados, es decir, en pacientes que padecen enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales y hepatitis autoinmune. Otro problema sin resolver en relación con estas enfermedades concierne a la escasez de fármacos eficaces para su prevención, que puedan al menos retrasar su inicio.

55

### Definición y abreviaturas

60

**[0023]**

- APOTf: apotransferrina
- CmE: células mononucleares esplénicas
- ConA: Concanavalina A
- TNF- $\alpha$ : factor alfa de necrosis tumoral
- LPS: lipopolisacárido
- PBS: solución salina tamponada con fosfato

65

DNB: dinitrobencono  
 PLP: proteína proteolípida  
 Tf: transferrina

5 **Sumario de la invención**

10 **[0024]** La presente invención se refiere al uso de APOTf para el tratamiento y/o prevención de enfermedades caracterizadas por una hiperactivación del sistema inmune (un estado típico de las enfermedades autoinmunes). Se ha descubierto y demostrado que la administración de APOTf es eficaz para inducir la transición desde un perfil inmunológico de linfocitos T colaboradores 1, característico de pacientes con cuadros de hiperactivación inmune, a un perfil inmunológico de linfocitos T colaboradores 2, típico de estados de tolerancia inmune.

15 **[0025]** El objeto de la presente invención consiste por consiguiente en composiciones farmacéuticas que contienen APOTf para su uso en la prevención (o retraso del inicio) y tratamiento de enfermedades autoinmunes. Sobre la base de los datos obtenidos, la molécula tiene una sorprendente capacidad para modificar favorablemente el perfil de respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, es viable el uso de APOTf para la preparación de composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento, prevención y/o retraso del inicio de enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales y hepatitis autoinmune. Al caracterizarse por una buena tolerancia y disponibilidad, así como por un coste relativamente bajo, APOTf es en consecuencia una alternativa válida a las terapias inmunosupresoras utilizadas actualmente.

20 **[0026]** De acuerdo con la invención, son preferentes las administraciones diarias de APOTf en el intervalo de 1 a 10 mg/kg de peso corporal y son incluso más preferentes en el intervalo de 1 a 5 mg/kg de peso corporal.

25 **Breve descripción de las figuras**

**[0027]**

30 FIG. 1: Proliferación de CmE de ratones C57Bl estimulados con ConA y tratados con APOTf;  
 FIG. 2: Proliferación de CmE de ratones CBA estimulados con ConA, y tratados con APOTf;  
 FIG. 3:

35 (a) Concentraciones de TNF- $\alpha$  en CmE tratadas con APOTf;  
 (b) Concentraciones de IL-2 en CmE tratadas con APOTf;

FIG. 4: Concentraciones de NO ( $\mu$ M/ml) en CmE tratadas con APOTf;  
 FIG. 5:

40 (a) Concentraciones medias de IL-1 $\beta$  en PC tratadas con APOTf;  
 (b) Concentraciones medias de TNF- $\alpha$  en PC tratadas con APOTf;

45 FIG. 6: (a)-(b) Puntuación media en función del tiempo en encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) inducida con PLP en ratones SJL, tratados con APOTf;

FIG. 7:

50 (a) Efectos de profilaxis con APOTf en la progresión de puntuación de artritis en artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis;  
 (b) Efectos de APOTf administrado con fines terapéuticos sobre la progresión de la puntuación de artritis en artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis;  
 (c) Efectos de profilaxis con APOTf sobre el desarrollo de edema en la pata en artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis;  
 (d) Efectos de tratamiento con APOTf en el desarrollo de edema en la pata en artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis;

FIG. 8:

60 (a) Efectos de profilaxis con APOTf en progresión de la puntuación de artritis en artritis inducida con colágeno en ratones DBA/1j;  
 (b) Efectos de tratamiento con APOTf en progresión de la puntuación de artritis en artritis inducida con colágeno en ratones DBA/1j;  
 (c) Efectos de profilaxis con APOTf en el desarrollo de edema de la pata en artritis inducida con colágeno en ratones DBA/1j;  
 (d) Efectos de tratamiento con APOTf en el desarrollo de edema de la pata en artritis inducida con colágeno en ratones DBA/1j;

FIG. 9:

- 5 (a) Efectos de APOTf en el peso del colon, área de necrosis y puntuación macroscópica en colitis inducida por DNB;  
 (b) Efectos de APOTf en el peso del colon, área de necrosis y puntuación macroscópica en colitis inducida por DNB;

FIG. 10:

- 10 (a): Puntuación media histológica en islotes pancreáticos de ratones NOD de 16 semanas de vida tratados i.p. con APOTf a una dosis de 2,5 mg/kg/día o con vehículo (PBS estéril) durante 12 semanas consecutivas seis veces a la semana;  
 15 (b) Porcentaje de incidencia de diabetes en ratones NOD de 8 a 9 semanas de vida tratados durante 12 semanas consecutivas con APOTf a dosis de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg y PBS estéril;  
 (c) Efectos de APOTf en el desarrollo de diabetes inducida por transferencia de células en ratones NOD;  
 (d) Efecto de tratamiento profiláctico con APOTf en el desarrollo de diabetes inducida por ciclofosfamida;  
 (e) Efectos de tratamiento temprano con APOTf en el desarrollo de diabetes inducida por ciclofosfamida;  
 20 (f) Incidencia de diabetes en ratas BB de 36 a 45 días de vida tratadas durante 7 semanas consecutivas con APOTf a una dosis de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y con PBS; el gráfico presenta la supervivencia acumulativa en función de los días de vida;  
 (g) Inicio de diabetes en ratas BB de 36 a 45 días de vida tratadas durante 7 semanas consecutivas con APOTf a una dosis de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y con PBS;  
 25 (h) Variaciones de peso corporal de ratas BB de 36 a 45 días de vida tratadas durante 7 semanas consecutivas con APOTf a una dosis de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y con PBS;

FIG. 11: Valores en suero medios en hepatitis experimental inducida con ConA en ratones NMRI tratados con APOTf.

### 30 Descripción detallada de la invención

[0028] En particular, en cuanto se refiere a la enfermedad autoinmune simple antes mencionada y a los resultados de los experimentos *in vitro* e *in vivo* notificados en el presente documento más adelante, la administración diaria de APOTf preferente consiste en:

- 35
- esclerosis múltiple: posología terapéutica de  $\geq 2,5$  mg/kg peso corporal;
  - artritis reumatoide: posología profiláctica y terapéutica de  $\geq 1$  mg/kg peso corporal;
  - enfermedad inflamatoria intestinal: posología profiláctica y terapéutica de  $\geq 5$  mg/kg peso corporal;
  - diabetes mellitus tipo 1: posología terapéutica de  $\geq 1$  mg/kg peso corporal;
  - 40 ▪ hepatitis autoinmune: posología profiláctica y terapéutica de  $\geq 2,5$  mg/kg peso corporal.

[0029] La presente invención se comprenderá mejor a la luz de los siguientes ejemplos de realizaciones.

#### 45 Ejemplo 1: Evaluación *in vitro* de actividad inmunomoduladora

[0030] Se evaluó la capacidad de APOTf de modificar ciertos parámetros funcionales *in vitro* de linfomonocitos de distintos tipos y orígenes, como por ejemplo su respuesta proliferativa a mitógenos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y nitritos.

50 [0031] Para la evaluación de la proliferación linfomonocítica, se desarrolló un método para separar los linfomonocitos obtenidos de bazos de ratones CBA y C57BL. Se homogeneizaron los bazos pasándolos a través de un tamiz de malla fina y a continuación se sometieron a centrifugación a 350 g durante 5 minutos. Se resuspendió el aglomerado de células resultante en RPMI con 5 % de FCS, se colocó en un tubo de ensayo, se cubrió con solución Ficoll y se centrifugó a 550g durante 18 minutos. Se recogió el anillo resultante de linfomonocitos desde el medio Ficoll, se lavó dos veces para eliminar el Ficoll residual, se resuspendió en medio de crecimiento (una mezcla de RPMI 1664, antibióticos y antimicóticos y 5 % de FCS) y se transfirió a placas de 96 pocillos a una concentración de 500.000 células/pocillo. Se cultivó cada línea de células con o sin estimulación mitogénica con ConA, 25  $\mu$ g/ml, sin el fármaco o con una de las tres concentraciones de APOTf diferentes (6,25  $\mu$ g, 125  $\mu$ g, 25  $\mu$ g por ml). Se prolongó el período de incubación 3 días, tras lo cual se añadió 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada a las células. Se consideró la radioactividad residual al cabo de 18 horas, establecida a partir de una contra lectura beta, como indicador de la respuesta proliferativa.

55

60

[0032] En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos de diferentes grupos de experimentos, expresados como pulsaciones por minuto (bpm).

65 [0033] Para evaluar la secreción de TNF- $\alpha$  y IL-2, se colocaron células mononucleares esplénicas de ratones CBA,

BALB/C y C57BL, obtenidas tal como se ha descrito, en un medio de crecimiento normal a concentraciones de  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células/pocillo durante un período de 48 horas, con o sin estimulación mitogénica (ConA 2,5 µg/ml) y con transferrina o sin ella (12,5 µg/ml). Se midieron TNF-α y IL-2 utilizando ensayo ELISA. El límite de sensibilidad de estos ensayos fue 15 pg/ml.

5 **[0034]** En las Figuras 3A y 3B se muestran los resultados obtenidos.

10 **[0035]** Para evaluar los efectos del fármaco en cuestión a la producción de nitritos, se colocaron células mononucleares esplénicas de los ratones BALB/c, obtenidas tal como se ha descrito, en un medio normal a concentraciones de  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células/pocillo, con estimulación mitogénica o sin ella (ConA 25 µg/ml) y sin el fármaco o de una a tres concentraciones diferentes de APOTf (6,25, 12,5, 25 µg/ml) durante un período de incubación de 48 horas.

15 **[0036]** Se identificaron las concentraciones de NO en los cultivos de células mononucleares esplénicas por ensayo de colorimetría explotando la reacción de Griess, con la que se puede determinar el cociente de nitritos en el sobrenadante de células, con estimulación mitogénica o sin ella (ConA 2,5 mg/ml). Para este propósito, en particular, se añadieron 50 ml de reactivo Griess a 50 ml del sobrenadante y, al cabo de 10 minutos, se midió la consiguiente reacción colorimétrica con un lector ELISA a 570 nm.

20 **[0037]** El límite de sensibilidad para este ensayo fue en torno a 0,5 mM/ml.

**[0038]** En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos.

25 **[0039]** Se analizó también la capacidad inmunomoduladora de la molécula en linfomonocitos peritoneales de ratones CBA, BALB/C y C57BL. Brevemente, se aislaron células peritoneales de la cavidad abdominal de ratones CBA, BALB/c, C57BL por inyección intraperitoneal de 1 ml de PBS, seguido de la recogida por aspiración de toda la cantidad de PBS, que incluía las células peritoneales, que se colocó en un tubo de ensayo y se centrifugó a 350 g durante 5 minutos. A continuación, se realizó el recuento de las células y se colocaron en un medio de crecimiento completo (RPMI 1640 [Gibco], con 200 mM de 1% L-glutamina, 10000 U/m de 1% penicilina- estreptomycinina y 5 % FCS) en placas de 24 pocillos.

**[0040]** Se prepararon dos grupos de cultivos de células diferentes para determinar los niveles de TNF-α:

- 35 - se colocaron células peritoneales de ratones CBA en un cultivo a una concentración media de  $1 \times 10^6$  células/pocillo y se estimularon simultáneamente con LPS (5 µg/ml) durante 48 horas con APOTf (12,5 µg/ml) y sin él;
- 40 - se colocaron células peritoneales de ratones BALB/c y ratones C57BL en un cultivo a una concentración media de  $5 \times 10^6$  células/pocillo y se incubó durante 24 horas con LPS (5 µg/ml) y sin él y con APOTf (12,5 µg/ml) y sin él.

**[0041]** Se estableció la concentración de TNF-α aplicando ensayo ELISA con un límite de sensibilidad de 15 pg/ml.

45 **[0042]** Para evaluar la producción de interleuquina-1β (IL-1β), se dividieron células peritoneales de ratón CBA en dos grupos, se colocaron en cultivo a una concentración media de 1.000.000 células/pocillo y se estimularon simultáneamente con LPS (5 µg/ml) durante un período de 5 o 24 horas, con APOTf (12,5 µg/ml) o sin él.

**[0043]** Se determinaron las concentraciones de IL-1β por ELISA.

50 **[0044]** En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos.

**[0045]** El análisis de los efectos de APOTf en los parámetros funcionales de los linfomonocitos en cuestión demostró que la molécula tiene actividad inmunomoduladora biológica pleiotrópica en todos los tipos de células cuando se utilizaron en el intervalo de concentraciones examinadas.

55 **[0046]** De hecho, APOTf es eficaz para modificar la respuesta proliferativa, la secreción de citoquinas y la producción de nitrato de linfomonocitos de distintos orígenes *in vitro*.

60 **[0047]** En particular, los datos de los que disponen los autores de la invención sugieren que un aumento en el número absoluto de linfomonocitos coincidió no con un aumento paralelo de su actividad funcional, sino con una reducción, tal como lo demuestran los bajos niveles de TNF-α e IL-2 detectados en los cultivos considerados.

**Ejemplo 2:** Evaluación de la eficacia en un modelo animal de esclerosis múltiple

65 **[0048]** Se evaluaron los efectos de administrar APOTf *in vivo* a un modelo murino de EAE en ratones SJL, considerados el modelo que más se asemeja a la esclerosis múltiple humana, que reproduce fielmente muchos de sus aspectos inmunobiológicos, clínicos e histopatológicos.

**[0049]** Brevemente, se indujo la enfermedad en ratones SJL hembra, de 6 a 7 semanas de vida, a los que se inoculó por vía subcutánea (s.c.), después de pasar un período de una semana de adaptación a las condiciones de enjaulado, que implicó condiciones de laboratorio normales con libre acceso a alimento y agua y unas condiciones controladas de temperatura y humedad, con anestesia, en dos sitios de drenaje de ganglios linfáticos axilares diferentes con 75 µg/ratón de PLP (Genemed Synthesis San Francisco, CA) disuelto en solución salina y emulsionado en una relación 1:1 con adyuvante completo de Freund (FCA) que contenía 0,6 mg de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. El día 0 y el día 2 tras la inmunización, se inoculó también a los animales por vía intraperitoneal (i.p.) con 200 ng/ratón de toxina pertussis. A continuación, se dividieron a través de un proceso de aleatorización en grupos y se trataron i.p. con APOTf a una dosis de 0,1, 1 y 2,5 mg/kg, así como con el correspondiente vehículo (PBS estéril) una vez al día a partir del 7<sup>o</sup> día tras la inducción y hasta el día 30<sup>o</sup>. Un observador ignorante del tratamiento examinó diariamente a los animales, registró el peso y evaluó sus parámetros patológicos clínicos de acuerdo con los siguientes criterios: 0 = sin síntomas clínicamente evidentes; 1 = cola flácida y/o debilidad de las extremidades traseras suave; 2 = cola flácida con debilidad de las extremidades traseras moderada; 3 = debilidad de las extremidades traseras grave y debilidad de las extremidades delanteras suave; 4 = parálisis de las extremidades traseras con debilidad de las extremidades delanteras moderada; 5 = tetraplejía y/o muerte del animal. Los parámetros significativos para evaluar los efectos del fármaco fueron: puntuación acumulativa media, índice de mortalidad; tiempo de inicio de la enfermedad; duración de la enfermedad. En la Figura 6 se muestra el curso de la enfermedad registrado en dos experimentos diferentes que se llevaron a cabo aplicando los mismos procedimientos experimentales. El análisis de los efectos de APOTf en los parámetros patológicos clínicos en cuestión, en particular, cuando se administró a una dosis diaria de 2,5 mg/kg a partir del 7<sup>o</sup> día después de inducir la enfermedad y, por tanto, de acuerdo con un régimen terapéutico, demostró que la molécula tenía la capacidad de influir favorablemente en el curso de encefalomielitis alérgica experimental, reduciendo tanto la puntuación acumulativa media como la duración de la enfermedad en los animales en cuestión. Asimismo, se toleró perfectamente el tratamiento, ya que no hubo ninguna diferencia significativa en las tasas de mortalidad entre los grupos.

**[0050]** Por tanto, se pueden emplear preparaciones farmacéuticas con contenido en APOTf para el tratamiento de esclerosis múltiple.

30

### **Ejemplo 3:** Evaluación de la eficacia de modelos animales de artritis reumatoide

**[0051]** Se evaluaron los efectos de la administración de APOTf *in vivo* en modelos animales de artritis reumatoide, por ejemplo artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis y artritis inducida por colágeno tipo 2 en ratones C57BL/6.

35

**[0052]** En lo que concierne al primer caso, las alteraciones de las articulaciones microscópicas tienden a hacerse clínicamente evidentes transcurridos 14 días de la inducción. La gravedad de la enfermedad aumenta normalmente en las dos primeras semanas y después disminuye gradualmente a lo largo de 1-3 semanas. La inflamación y deformación de las articulaciones puede persistir también a más largo plazo, en particular, en relación con el tobillo. Este modelo de enfermedad comparte importantes características con la artritis reumatoide humana: de hecho, AIA es una enfermedad inflamatoria mediada inmunológicamente por linfocitos T y macrófagos.

40

**[0053]** Brevemente, se indujo la enfermedad en ratas Lewis macho de 8 a 12 semanas de vida y con un peso comprendido entre 170 g y 215 g, a las cuales se les inoculó por vía intradérmica (i.d.) en la base de la cola después de pasar un período de adaptación de una semana a las condiciones del enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales con libre acceso al alimento y el agua, y condiciones controladas de temperatura y humedad, una emulsión que comprendió un volumen total de 100 µl con un contenido de 0,3 mg de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra eliminada por calor y adyuvante incompleto de Freund.

45

**[0054]** A continuación, se dividió a los animales a través de un proceso de aleatorización en grupos y se trataron de acuerdo con un régimen profiláctico seis veces a la semana, a partir del primer día tras la inducción de la enfermedad y hasta que transcurrieron 30 días desde la inducción, con APOTf i.p. a una dosis de 1 y 2,5 mg/kg, con el correspondiente vehículo (PBS estéril) y con dexametasona a una dosis de 0,3 mg/kg, o de acuerdo con un régimen terapéutico adoptando el mismo diseño experimental pero a partir del 10<sup>o</sup> día tras la inducción y hasta el día 30<sup>o</sup>. Un observador ignorante del tratamiento examinó a los animales en días alternos y registró su peso y evaluó los parámetros de enfermedad clínicos de acuerdo con los siguientes criterios:

50

- 0 = sin signos clínicamente evidentes de artritis;
- 1 = inflamación y/o rojez en una pata o en dígito;
- 2 = afectadas dos articulaciones;
- 3 = afectadas más de dos articulaciones;
- 4 = artritis grave de toda la pata y los dígitos.

60

**[0055]** Se calculó el índice de artritis clínica para cada animal combinando las cuatro puntuaciones de cada pata.

65

**[0056]** Se estableció la gravedad clínica cuantificando la variación semanal en el volumen de la pata por

pletismometría (modelo 7140; Ugo Basile). En las Figuras 7A, 7B, 7C y 7D se muestran los resultados.

**[0057]** A continuación, se evaluó la actividad de APOTf en artritis inducida por colágeno tipo 2. Una ventaja de este modelo de artritis con respecto a otros modelos de artritis, como por ejemplo el inducido por adyuvante, radica en el desarrollo de una respuesta generada por la artritis a un antígeno claramente definido (colágeno tipo II) que también permite el estudio de fenómenos inmunológicos inducidos por antígeno y sus modificaciones selectivas inducidas por tratamientos farmacológicos.

**[0058]** Brevemente, se indujo la enfermedad en ratones DBAJ/1 macho de 8 a 9 semanas de vida, a los que se inoculó intradérmicamente (i.d.) en la base de la cola, después de pasar por un período de adaptación de una semana a las condiciones de enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales con libre acceso a alimento y agua y en condiciones controladas de temperatura y humedad, una emulsión que comprendió un volumen de 100 µl con un contenido de 100 µg de colágeno bovino de tipo II emulsionado en adyuvante completo de Freund. El día 20 después de la inmunización, los animales recibieron una segunda inoculación i.d. de 100 µg de colágeno de tipo II disueltos en PBS para un volumen total de 100 µl.

**[0059]** A continuación, se dividieron en grupos a través de un proceso de aleatorización y se trataron i.p. de acuerdo con un régimen profiláctico seis veces a la semana, a partir del primer día tras la inducción de la enfermedad y hasta el día 30 después de la inducción, con APOTf, a una dosis de 1 y 2,5 mg/kg, con el correspondiente vehículo (PBS estéril) y con dexametasona, a una dosis de 0,3 mg/kg, o de acuerdo con un régimen terapéutico adoptando el mismo diseño experimental pero a partir del 22<sup>o</sup> día tras la inducción y continuando hasta el día 30<sup>o</sup>.

**[0060]** Se aplicaron los mismos criterios de evaluación de la enfermedad que los descritos anteriormente para la artritis inducida por adyuvante.

**[0061]** En las Figuras 8A, 8B, 8C y 8D se muestran los resultados.

**[0062]** El análisis de los efectos de APOTf en los parámetros examinados demostró que es eficaz para reducir tanto la puntuación clínica para la enfermedad como el volumen medio de la pata en ambos modelos animales de artritis reumatoide y con ambos regímenes de administración de fármaco considerados, especialmente a la dosis de 2,5 mg/kg. De hecho, los resultados fueron similares a los obtenidos con la medicación utilizada como control positivo, es decir, dexametasona. Se toleró perfectamente el tratamiento también, tal como lo demuestra la ausencia de cualquier diferencia significativa en los pesos corporales de los animales o el número de eventos letales registrados en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

**[0063]** Por tanto, las preparaciones farmacéuticas con contenido en APOTf pudieron utilizarse para el tratamiento de artritis reumatoide humana y, en general, enfermedades que implican una lesión de las articulaciones con una patogénesis inmunoinflamatoria.

#### **Ejemplo 4:** Evaluación de la eficacia en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal

**[0064]** Se evaluaron los efectos de la administración de APOTf *in vivo* en colitis inducida con ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNBS) en ratas Lewis. En este modelo, una sola administración intracolónica de DNBS desencadena a los 4 días el inicio de un estado patológico con características clínicas e inmunohistológicas completamente similar al observado en enfermedades inflamatorias intestinales humanas, como enfermedad de Crohn o recto-colitis ulcerosa. Entre ellas, se incluyen daño del colon extendido con áreas de hiperemia, edema y ulceración, así como un aumento del peso del colon, que se caracteriza microscópicamente por la presencia de necrosis, inflamación y fibrosis. Al igual que en su equivalente humano, parece ser que la activación de los linfocitos T y los macrófagos, acompañado de la superproducción de citoquinas pro-inflamatorias de tipo 1, como por ejemplo TNF-α, es el principal mecanismo patogénico que se esconde tras la afección.

**[0065]** Brevemente, se indujo la enfermedad en ratas Wistar macho, con pesos comprendidos entre 200 y 250 g, a las que se administró por vía intracolónica (i.c.), después de pasar por un período de adaptación de una semana a las condiciones del enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales con libre acceso a alimento y agua, y condiciones controladas de temperatura y humedad, el día 0, después de 24 horas de ayuno y con anestesia suave, una solución que contenía 0,25 ml de etanol al 50 % con 30 mg de DNBS a través de un catéter con un diámetro exterior de 0,3 mm colocado proximalmente a aproximadamente 7 cm del ano. Después de la administración de DNBS, se insuflaron 0,5 ml de aire y se extrajo el catéter. A continuación, se mantuvo a los animales durante aproximadamente 30 segundos en posición de Trendelenburg.

**[0066]** Se dividió a los animales en grupos a través de un proceso de aleatorización y se trataron i.p. con APOTf a una dosis diaria de 2,5 y 5 mg/kg con el correspondiente vehículo (PBS estéril) y con dexametasona a una dosis de 1 mg/kg, durante cinco días consecutivos, a partir de un día antes de la inducción (días -1, 0, 1, 2 y 3). Se sacrificó a los animales el cuarto día tras la inducción (día 4) por inhalación de CO<sub>2</sub> y se recogió el segmento de colon correspondiente a una distancia de 10 cm desde el extremo. Se vació el colon con respecto a cualquier material entérico contenido en la cavidad, después se pesó, se cortó longitudinalmente y se abrió para pesarlo y valorar el

5 área de mucosa dañada (ADM), que correspondió al área de necrosis macroscópicamente visible, con la ayuda de un calibre y para evaluar la puntuación de daño microscópico (MDS) de acuerdo con los siguientes criterios: 0 = sin daños; 1 = hiperemia y/o edema localizados; 2 = úlcera lineal < la mitad de la circunferencia del colon; 3 = úlcera lineal > la mitad de la circunferencia del colon; 4 = úlcera circular < 1 cm; 5 = úlcera circular entre 1 y 2 cm de longitud; 6 = úlcera circular > 2 cm de longitud.

[0067] Se registró también el peso corporal de los animales, tanto el día de la inducción como el día de la muerte.

10 [0068] En las Figuras 9A y 9B se muestran los resultados de dos experimentos ilustrativos, realizados empleando el mismo diseño experimental.

15 [0069] El análisis de los efectos de APOTf sobre los parámetros considerados demostró que, administrando a 5 mg/kg, es eficaz para reducir tanto el área de necrosis como la puntuación del daño microscópico asociado con la enfermedad. De hecho, los resultados fueron comparables y, en algunos casos, incluso mejor que los obtenidos con la medicación utilizada como control positivo, es decir, dexametasona, que solamente demostró ser capaz de reducir el peso del colon.

20 [0070] Por estas razones, pudieron utilizarse preparaciones farmacéuticas que contenían APOTf para el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias humanas.

#### 20 Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia de modelos animales de diabetes mellitus tipo I

25 [0071] Se evaluó la capacidad de APOTf de influir en el inicio y el curso de diabetes mellitus tipo 1 en varios modelos animales, de manera espontánea, acelerada con la transferencia de células esplénicas de animales con enfermedad singénica, o se indujo por administración de ciclofosfamida en ratones NOD, y diabetes espontánea en ratas BB.

30 [0072] Ratones NOD desarrollaron espontáneamente una diabetes mellitus mediada por mecanismos autoinmunes dependiente de linfocitos T a los 80 – 200 días de vida, con una incidencia de 80 % en hembras y 10-20 % en machos. El inicio manifiesto clínicamente de diabetes va precedido de una infiltración inflamatoria de islotes pancreáticos (insulitis), que puede identificarse generalmente por examen histológico a partir de las 4-6 semanas de vida. En algunas cepas de ratón, es posible inducir una forma acelerada de diabetes autoinmune mediada por células por transferencia de células esplénicas de ratones NOD diabéticos a animales euglucémicos singénicos o por medio de una o más inyecciones (200-300 mg/kg) de ciclofosfamida administrada con un intervalo de dos semanas entre una y otra.

40 [0073] Para evaluar los efectos de APOTf en diabetes espontánea en ratones NOD, de 4 u 8-9 semanas de vida, se sometió a ratones hembra de dicha cepa a un período de adaptación de una semana a las condiciones del enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales, con libre acceso a alimento y agua, y condiciones controladas de temperatura y humedad antes del experimento; a continuación, fueron tratadas respectivamente, por vía intraperitoneal con APOTf a una dosis de 2,5 mg/kg y con el correspondiente vehículo (PBS estéril) durante seis días a la semana durante 12 semanas consecutivas, o con APOTf, a una dosis de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg y el correspondiente vehículo (PBS estéril) de acuerdo con el mismo diseño experimental.

45 [0074] Durante el período de estudio, se examinó a los ratones dos veces a la semana en cuanto al inicio de la diabetes midiendo su glucosuria: se confirmó que eran diabéticos cuando se observó que sus niveles de glucemia en ayunas estaban por encima de 12 mmol/l dos días consecutivos.

50 [0075] Se sacrificó a los animales que comenzaron el tratamiento a las 4 semanas de vida por inhalación con CO<sub>2</sub> al final del período de tratamiento y se recogió su páncreas para evaluación histológica.

[0076] Se llevó a cabo dicho examen histológico de los islotes pancreáticos con referencia a una escala de muestra de acuerdo con los siguientes criterios:

- 55 0 = sin infiltrado de células mononucleares;  
 1 = infiltrado de células mononucleares periductal;  
 2 = infiltrado de células mononucleares peri-insular;  
 3 = infiltrado de células mononucleares intra-insular;  
 4= infiltrado de células mononucleares intra-insular asociado con distribución celular beta.

60 [0077] Se examinaron al menos 12 islotes para cada ratón, al mismo tiempo que se obtuvo la puntuación histológica media para cada páncreas dividiendo la puntuación total por el número de islotes examinados.

[0078] En las Figuras 10A y 10B se muestran los resultados obtenidos de la media de dos experimentos distintos.

65 [0079] Para valorar los efectos de APOTf en diabetes acelerada en ratones NOD, se sometió a ratones hembra de 5

o 13-14 semanas de vida de esta cepa a un período de adaptación de una semana a las condiciones del enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales, con libre acceso a alimento y agua y condiciones controladas de temperatura y humedad antes del experimento; a continuación, se indujo la diabetes o bien a través de la transferencia intravenosa (en la vena de la cola) de células esplénicas aisladas de ratones NOD diabéticos a ratones

5 NOD euglucémicos, a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células/ratón, o bien a través de dos inyecciones intraperitoneales de ciclofosfamida a una dosis de 200 mg/kg, administrados con una separación de 14 días.

[0080] Se identificó el inicio de la diabetes a través de mediciones de la glucosuria diariamente, diagnosticando a los animales como diabéticos cuando, tras dos pruebas de glucosuria positivas, se observó que su glucemia en ayunas

10 estaba por encima de 12 mmol/l dos días consecutivos. Se evaluó la glucosuria de los animales días alternos a lo largo del curso del experimento.

[0081] Para el modelo de diabetes acelerada inducida por transferencia celular, se aleatorizaron los animales para su tratamiento intraperitonealmente (i.p.) con anticuerpo monoclonal de rata o anti-IFN-gamma de ratón (AN-18) a

15 una dosis de 500 µg/ratón en días alternos (como control positivo) con una dosis de APOTf de 1 mg/kg y 2,5 mg/kg o con el vehículo correspondiente (PBS estéril) a partir del séptimo día tras la transferencia de células, seis veces a la semana, durante seis semanas consecutivas.

[0082] Para la diabetes acelerada inducida por inoculación de ciclofosfamida, se repartió aleatoriamente a los

20 animales y se los trató intraperitonealmente (i.p.) con APOTf a dosis de 1 y 2,5 mg/kg, con el vehículo correspondiente (PBS estéril) seis veces a la semana durante 28 días y con anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ AN-18 a una dosis de 500 µg/ratón en días alternos durante 28 días consecutivos, de acuerdo con un régimen profiláctico o utilizando las mismas moléculas y el mismo diseño experimental, pero a partir del séptimo día tras la inoculación de ciclofosfamida y a través de todo el período experimental hasta el día 28º. En ambos casos, los animales estaban

25 euglucémicos al comenzar la terapia.

[0083] En las Figuras 10C, 10D y 10E, se muestran los resultados obtenidos a través de dos experimentos distintos.

[0084] Al igual que los ratones NOD, las ratas BB desarrollaron espontáneamente diabetes mellitus dependiente de

30 insulina como consecuencia de la destrucción del islote pancreático mediado por linfocitos T autorreactivos. También en este caso, la enfermedad clínicamente manifiesta va precedida de una infiltración inflamatoria de los islotes pancreáticos, pero la diabetes se desarrolla plenamente entre los 60 y 120 días de vida, con una incidencia de 60-80 % tanto en machos como en hembras.

[0085] Para valorar los efectos de APOTf en diabetes espontánea en ratas BB, se sometió a ratas macho de esta

35 cepa, de entre 37 y 46 días de vida, primero, a un período de adaptación de una semana a las condiciones de enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales con libre acceso a alimento y agua y condiciones controladas de temperatura y humedad, antes del experimento; después, fueron tratadas con APTf i.p. a dosis de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y con el correspondiente vehículo (PBS estéril) cada día durante siete semanas

40 consecutivas.

[0086] Se evaluó el inicio de la diabetes midiendo la glucosuria y se diagnosticó como diabético a cualquier animal

en el que se observó glucemia en ayunas por encima de 12 mmol/l al menos dos días consecutivos.

[0087] En las Figuras 10F, 10G y 10H se presentan los resultados obtenidos de dos experimentos distintos.

[0088] El análisis de los efectos de APOTf en los parámetros examinados demostró que, especialmente cuando se

50 administra a una dosis de 2,5 mg/kg, es eficaz para reducir tanto las insulinas como la incidencia de diabetes de acuerdo con el diseño experimental adoptado en los modelos de diabetes mellitus tipo 1, ya sea espontánea o acelerada por transferencia de células o inoculación de ciclofosfamida en ratones NOD.

[0089] A la luz de todo lo mencionado, fue posible utilizar las preparaciones farmacéuticas con contenido en APOTf

para la prevención y tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 en seres humanos.

55 **Ejemplo 6:** Evaluación de la eficacia en modelos animales de hepatitis autoinmunes

[0090] Se evaluaron los efectos de la administración de APOTf *in vivo* en ratones NMRI con hepatitis inducida por

60 ConA, que representa un modelo útil de numerosas enfermedades hepáticas humanas con una patogénesis inmunoinflamatoria.

[0091] En este modelo, una sola inyección de ConA es suficiente para desarrollar lesiones de hígado inmuno-

mediadas. De hecho, al cabo de 8-24 horas de la administración de ConA, el cuadro patológico se caracteriza por signos clínicos e histológicos de hepatitis con una mayor actividad de las transaminasas en plasma, infiltración

65 inflamatoria intra-lobular con una acumulación masiva de granulocitos y cambios necróticos en las células hepáticas. La hepatitis inducida por ConA depende tanto de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como de los macrófagos.

5 **[0092]** Brevemente, se indujo la enfermedad en ratones NMRI macho de entre 6 y 7 semanas de vida, a los que se inoculó por vía intravenosa (i.v.), a través de la vena de la cola, después de pasar por un período de adaptación de una semana para las condiciones de enjaulado, que implicó unas condiciones de laboratorio normales, con libre acceso a alimento y agua, y condiciones controladas de temperatura y humedad, el día 0, después de 16 horas de ayuno, después de inducir una anestesia suave, con 20 mg/kg de ConA disuelto en PBS estéril.

10 **[0093]** Se dividieron en grupos por medio de un proceso de aleatorización y se trataron i.p. con APOTf a una dosis de 0,1, 1 y 2,5 mg/kg y con el vehículo correspondiente (PBS estéril) 24 horas y después 1 hora antes de la inoculación de ConA, y se sacrificaron 8 horas después de inocular ConA para recoger las muestras de sangre venosa periférica. A continuación, se determinó la actividad de glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en plasma utilizando un patrón fotométrico, se analizó utilizando un analizador cromático.

**[0094]** En la Figura 11 se dan los resultados.

15 **[0095]** El análisis de los efectos de APOTf en el parámetro en cuestión demostró que administrado a 2,5 mg/kg, es eficaz para reducir el grado de lesión hepática asociada con la administración de ConA.

**REIVINDICACIONES**

1. Apotransferrina (ApoTf) para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades autoinmunes.
- 5 2. Uso de ApoTf de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona entre diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndromes inflamatorios intestinales y hepatitis autoinmune.
- 10 3. Una composición farmacéutica que contiene Apotransferrina (ApoTf) para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades autoinmunes.
- 15 4. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona entre diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndromes inflamatorios intestinales y hepatitis autoinmune.
- 20 5. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en la que dicha composición contiene ApoTf en cantidades comprendidas entre 1 y 10 mg/kg de peso corporal para su administración diaria.
- 25 6. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, conteniendo dicha composición ApoTf en cantidades  $\geq 2,5$  mg/kg de peso corporal para su administración diaria.
- 30 7. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de artritis reumatoide, conteniendo dicha composición ApoTf en cantidades  $\geq 1$  mg/kg de peso corporal para su administración diaria.
- 35 8. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento de síndromes inflamatorios intestinales, conteniendo dicha composición ApoTf en cantidades  $\geq 5$  mg/kg de peso corporal para su administración diaria.
9. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de diabetes mellitus de tipo 1, conteniendo dicha composición ApoTf en cantidades  $\geq 1$  mg/kg de peso corporal para su administración diaria.
10. Composición farmacéutica que contiene ApoTf para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en el tratamiento de hepatitis autoinmune, conteniendo dicha composición ApoTf en cantidades  $\geq 2,5$  mg/kg de peso corporal para su administración diaria.

FIG 1

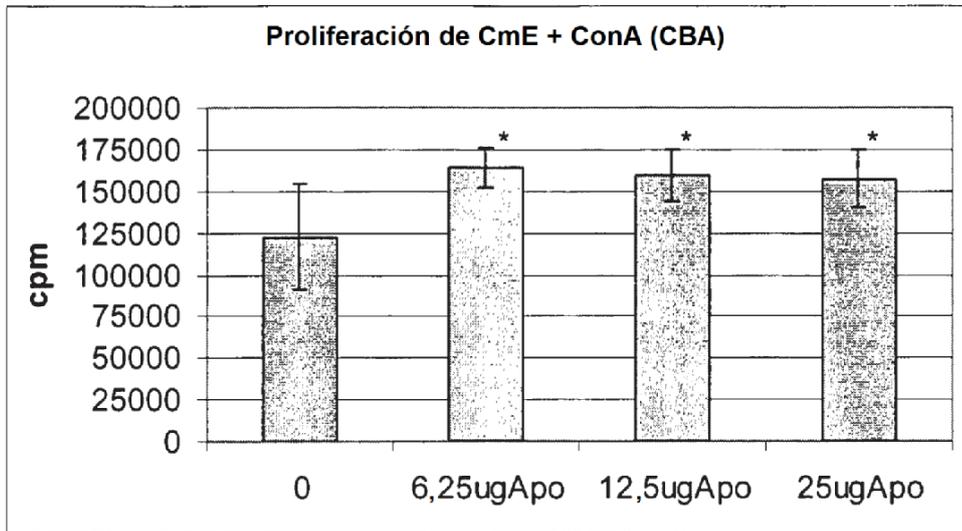


FIG 2

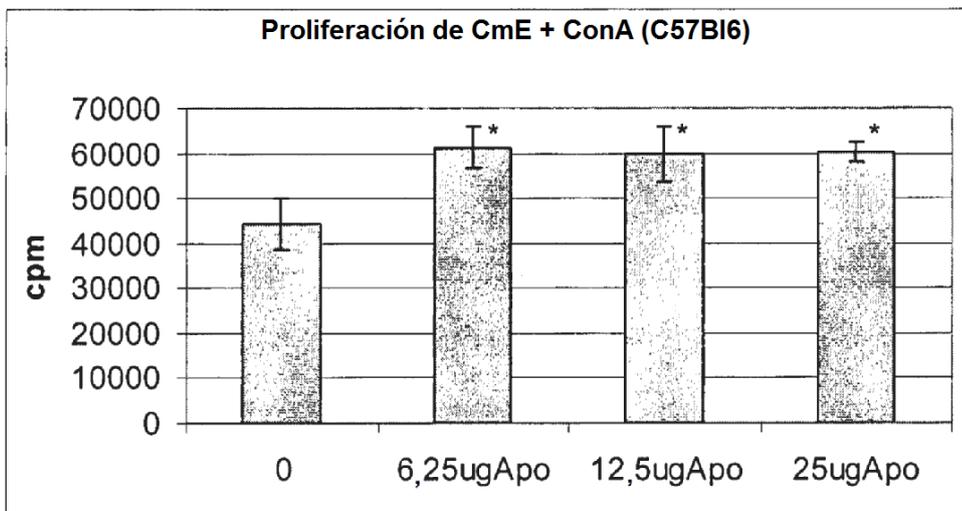
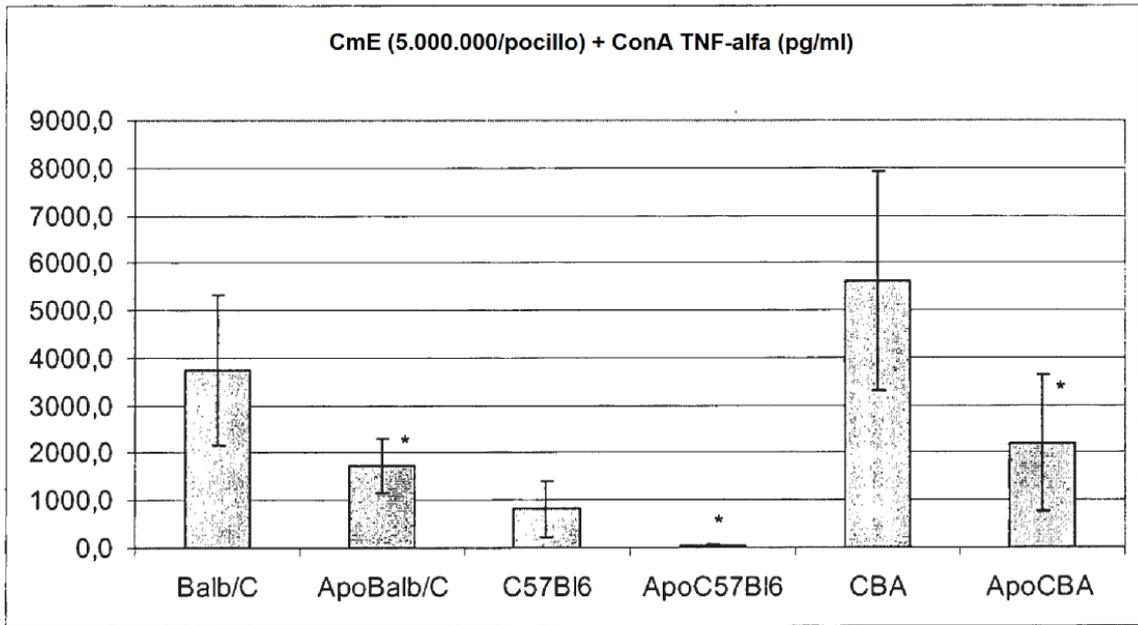


FIG 3

A



B

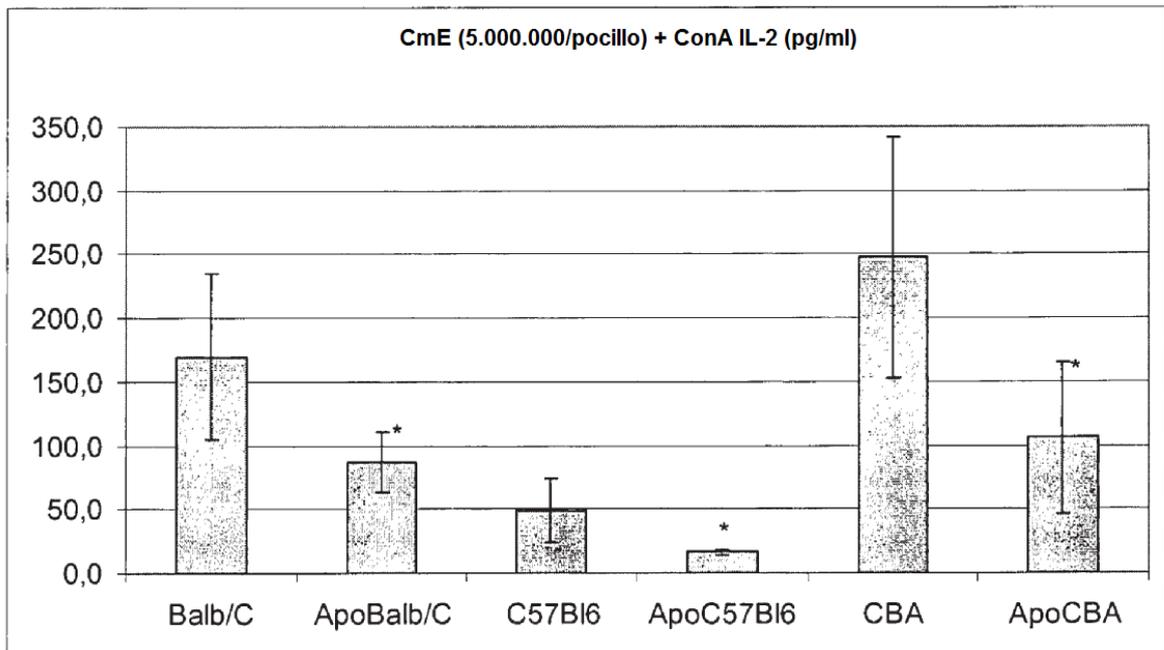


FIG 4

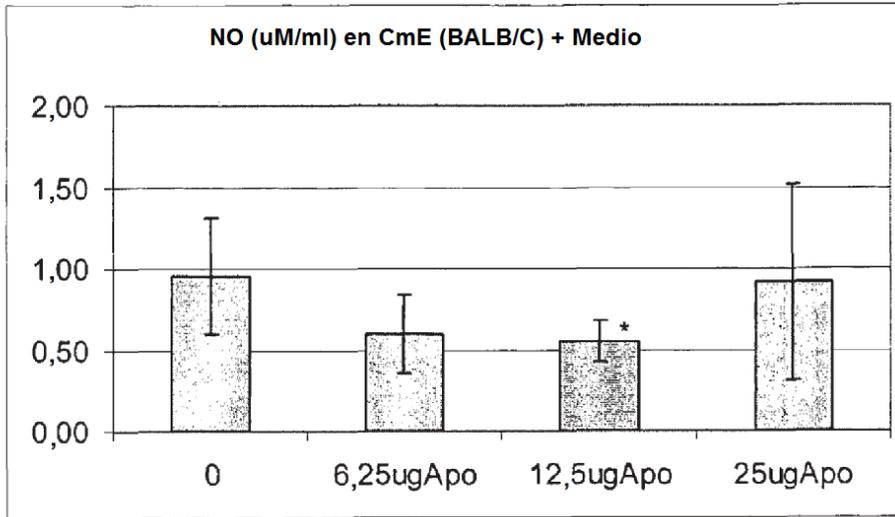


FIG 5

A

PC (1.000.000/pocillo) + LPS IL-1 $\beta$ (pg/ml)					
Incubación	Cepa	Dosis	Nº muestras	Media	S.D.
5h	CBA	0	6	285,3	72,9
5h	CBA	12,5ugApo	6	239,0	42,4
24h	CBA	0	8	941,9	147,1
24h	CBA	12,5ugApo	8	934,7	133,0

B

PC (1.000.000/pocillo) + LPS 24 h TNF- $\alpha$ (pg/ml)					
Cepa	Dosis	Nº muestras	Media	S.D.	
CBA	0	10	1210,5	579,3	
CBA	12,5ugApo	10	1244,8	502,4	

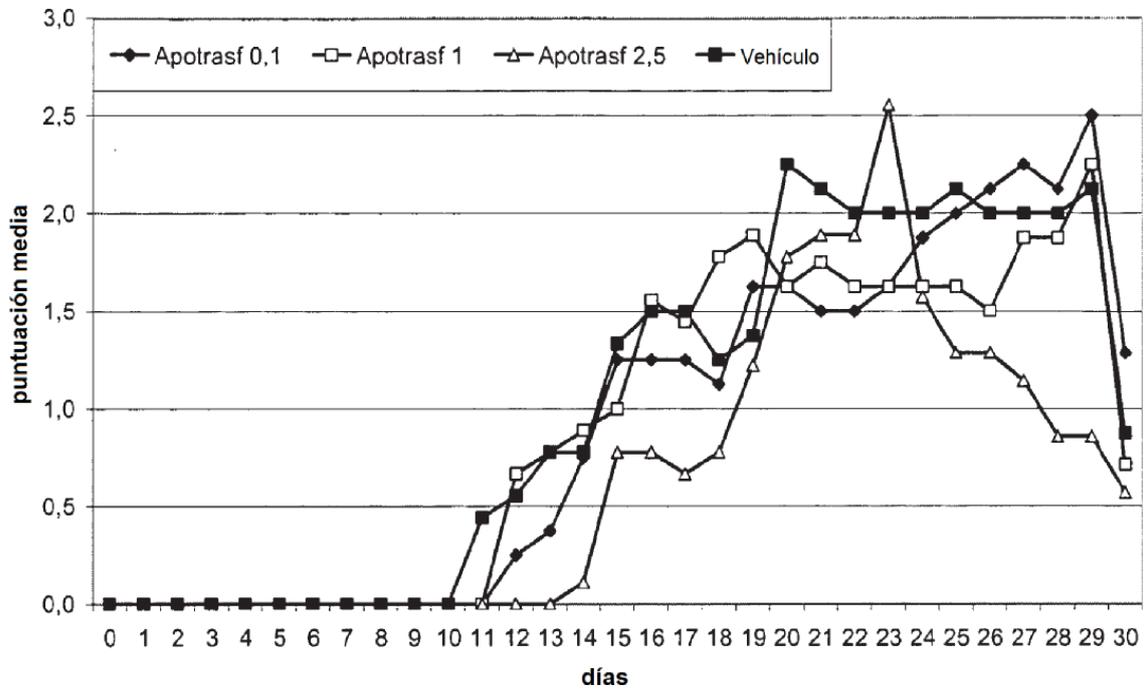
PC (5.000.000/pocillo) 24 h TNF- $\alpha$ (pg/ml)					
Cepa	Dosis	Nº muestras	Media	S.D.	
Balb/C	0	6	1294,49	425,42	
Balb/C	12,5ugApo	6	1321,63	231,65	
C57Bl6	0	2	2447,6	0	
C57Bl6	12,5ugApo	6	2156,11	397,69	

PC (5.000.000/pocillo) + LPS 24 h TNF- $\alpha$ (pg/ml)					
Cepa	Dosis	Nº muestras	Media	S.D.	
Balb/C	0	6	2186,12	163,74	
Balb/C	12,5ugApo	6	2098,96	334,4	
C57Bl6	0	6	2561,92	280,49	
C57Bl6	12,5ugApo	6	2883,42	694,74	

FIG 6

A



B

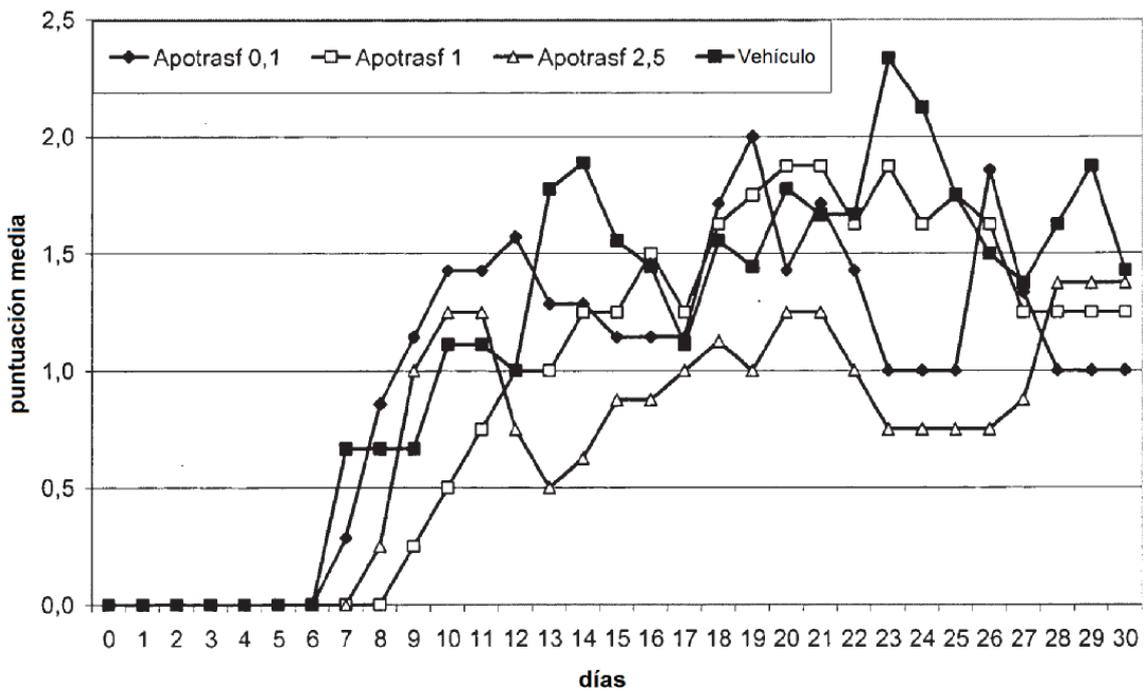
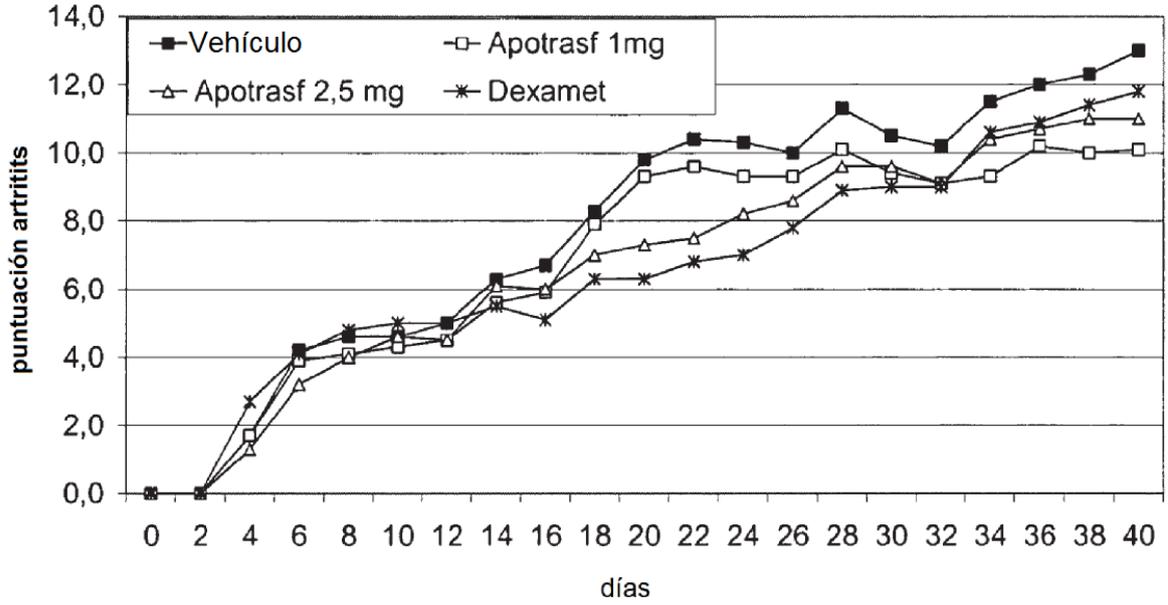


FIG. 7 A-B

A

Puntuación pata (profilaxis)



B

Puntuación pata (terapia)

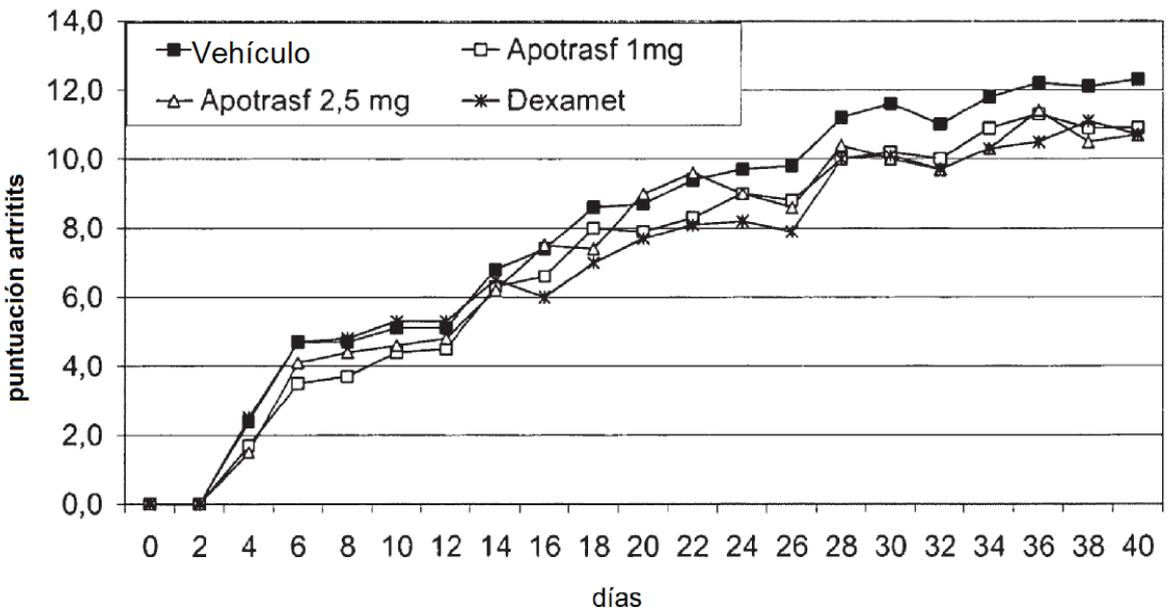
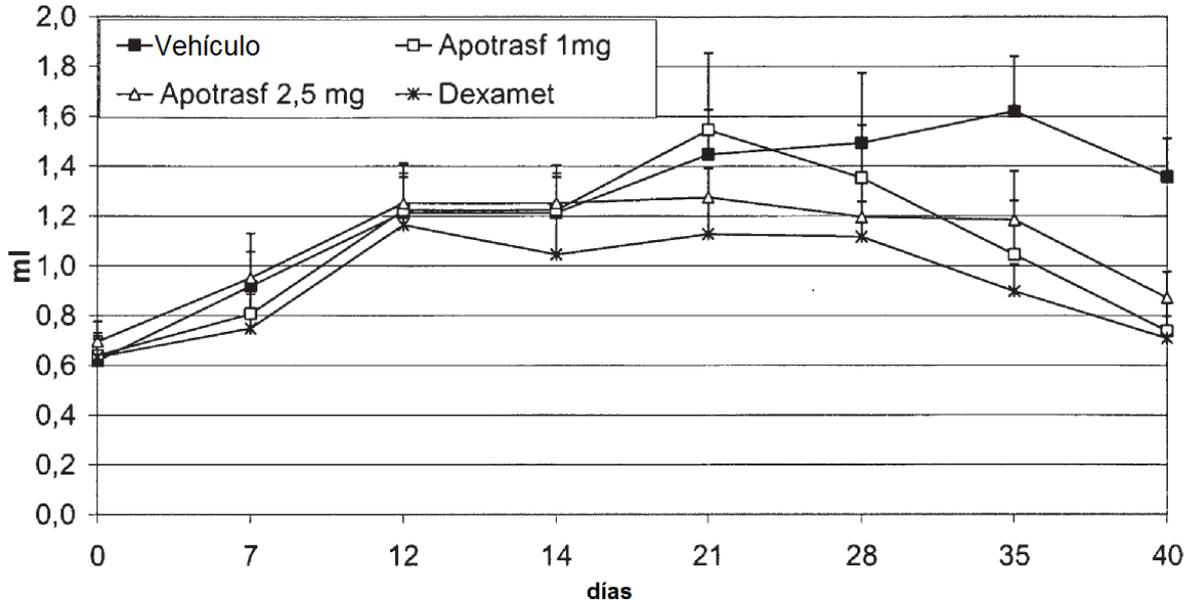


FIG. 7 C-D

C

Edema de pata (profilaxis)



D

Edema de pata (terapia)

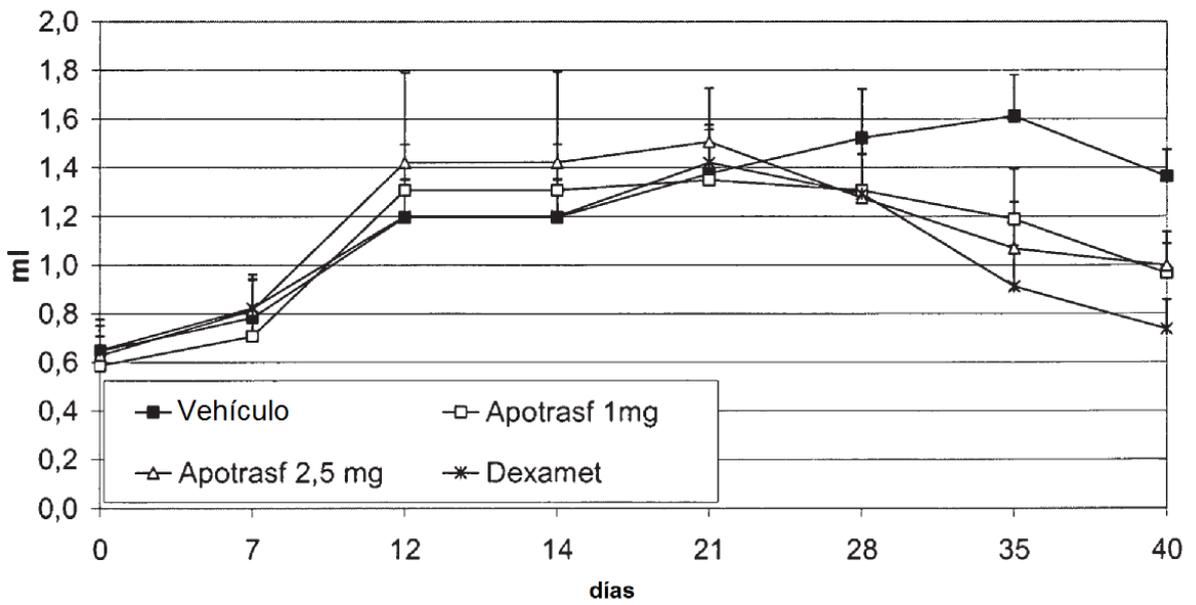
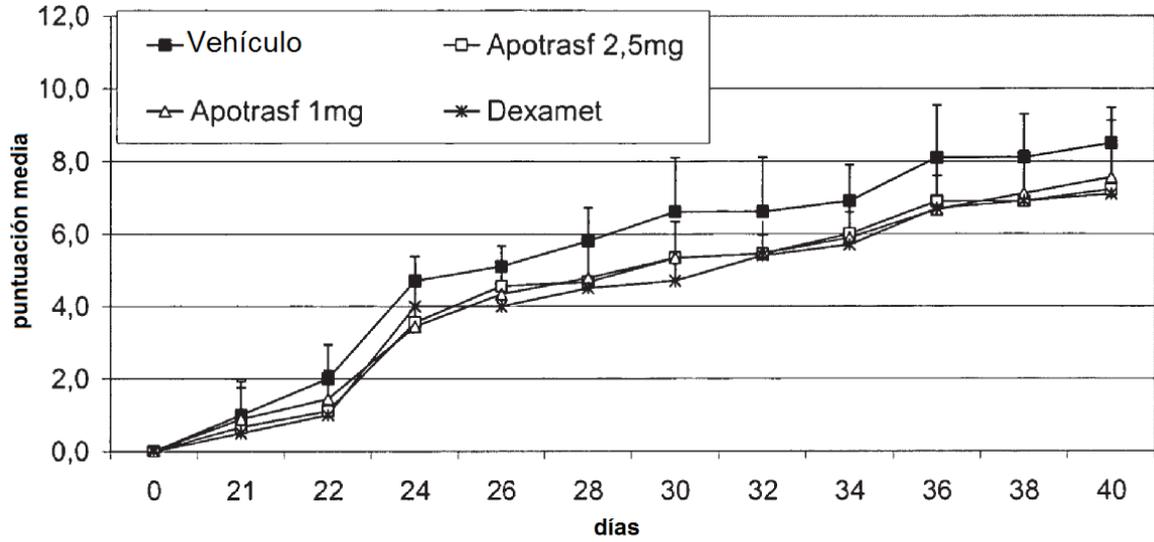


FIG 8 A-B

A

Puntuación de artritis (profilaxis)



B

Puntuación de artritis (terapia)

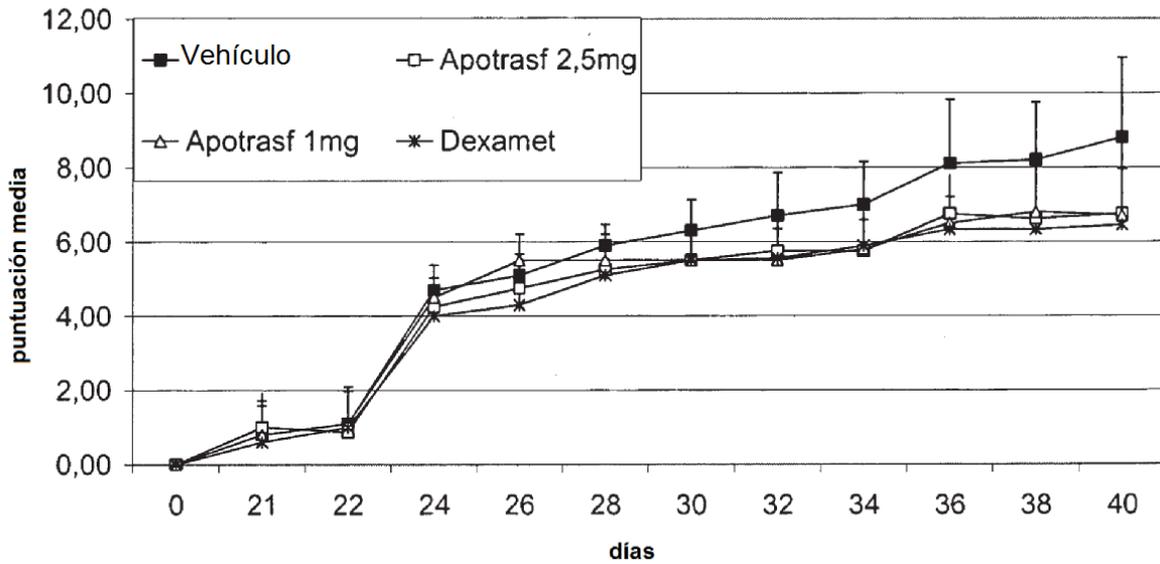
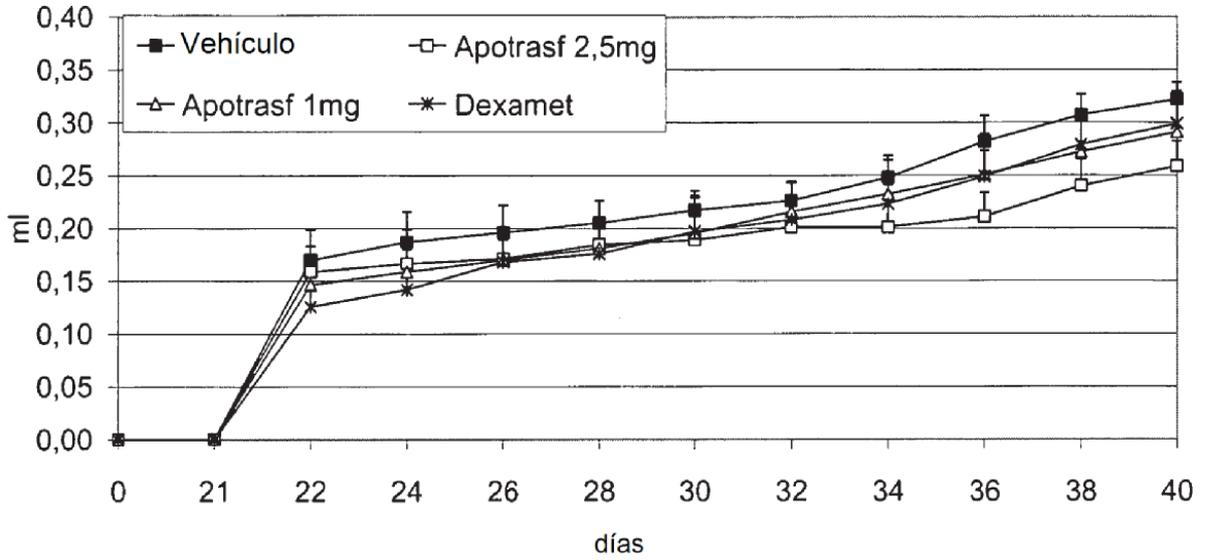


FIG 8 C-D

C

Edema de pata (profilaxis)



D

Edema de pata (terapia)

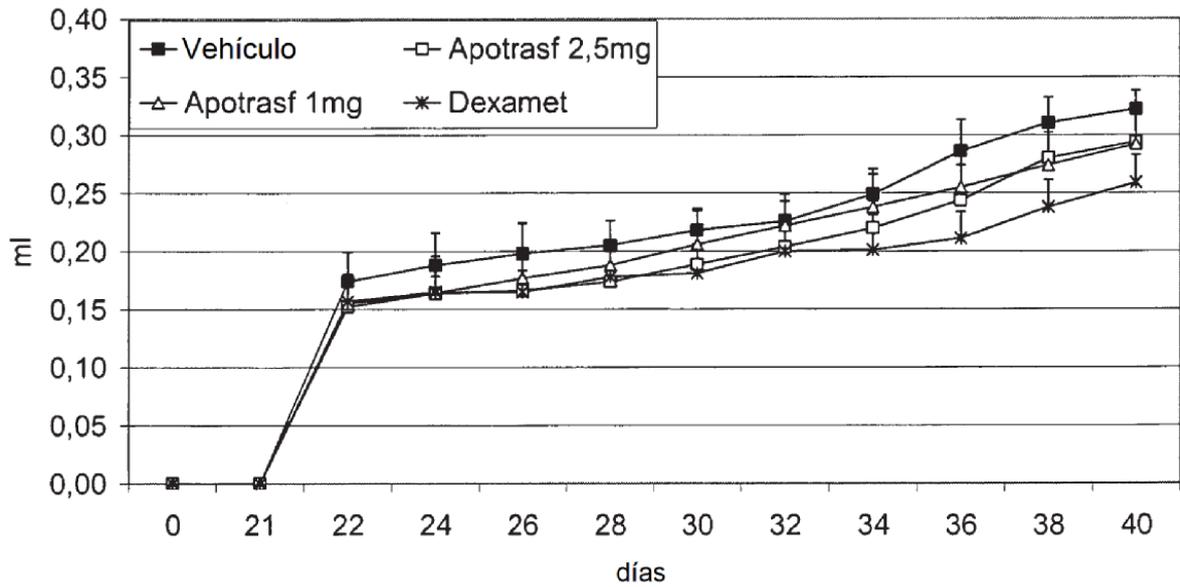
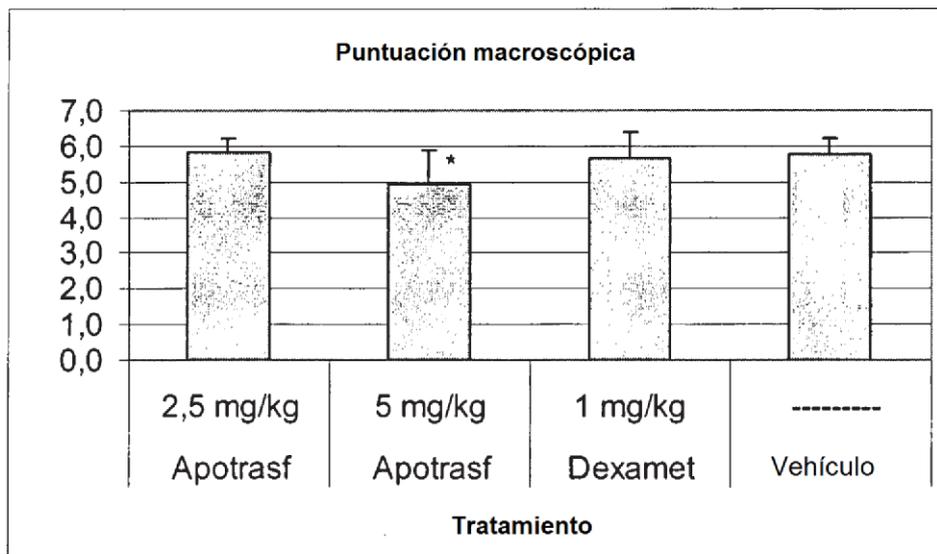
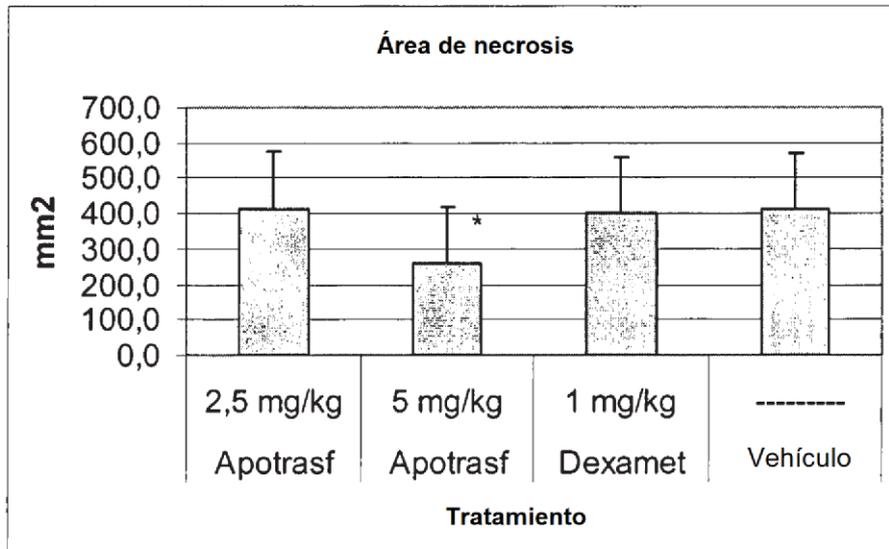
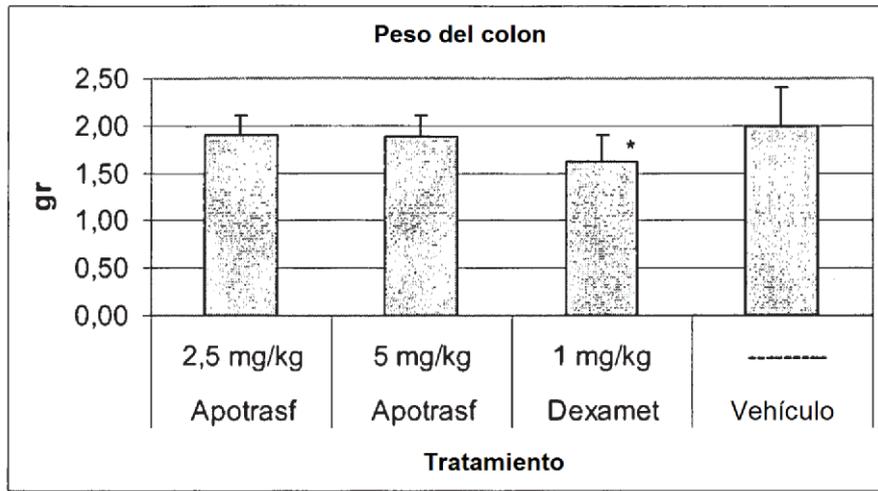


FIG 9 A



**FIG 9 B**

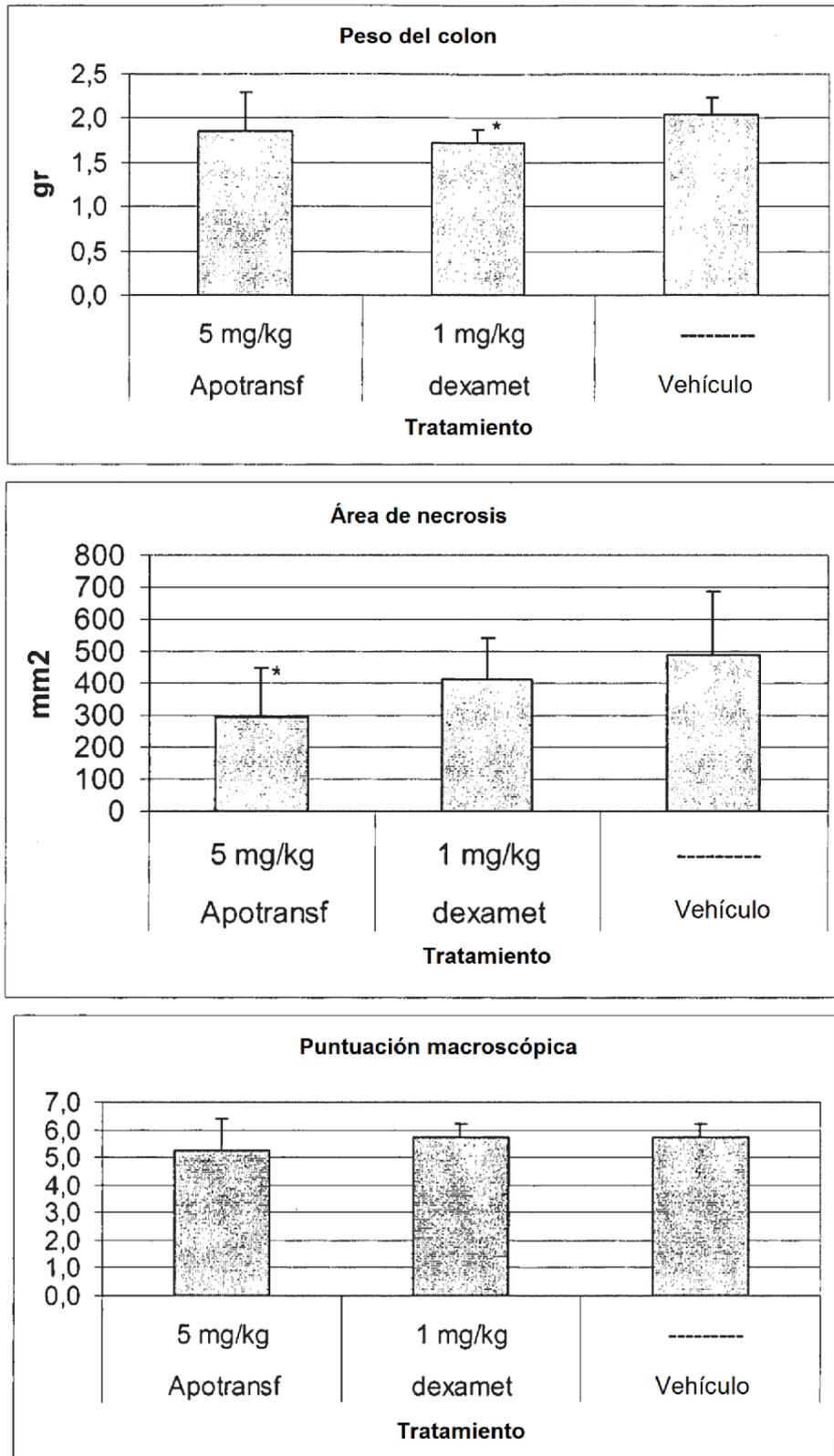


FIG. 10 A-B

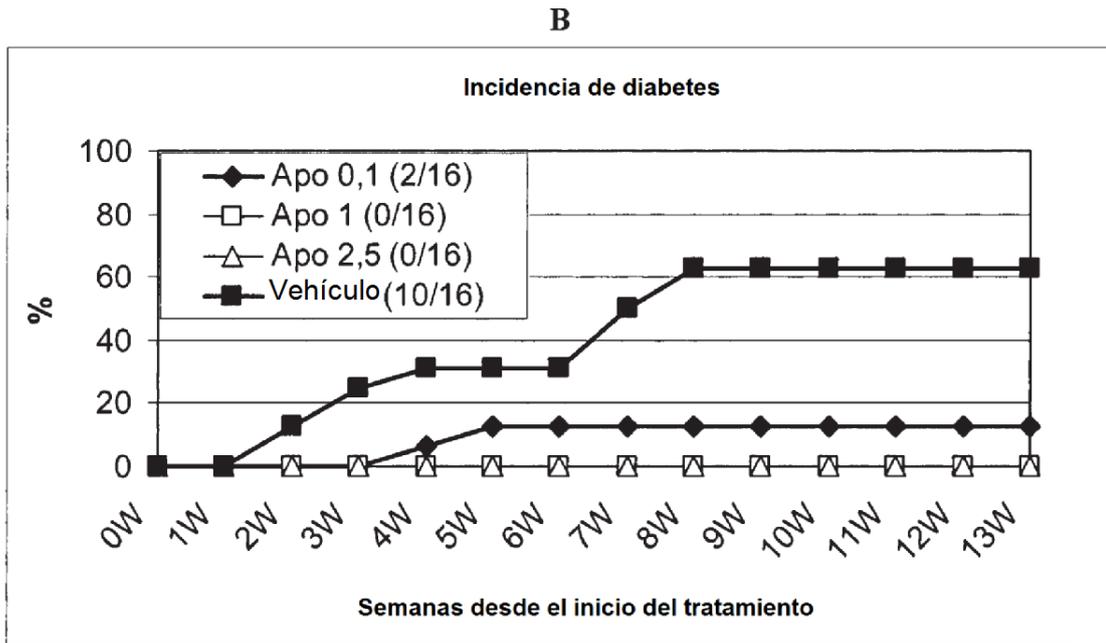
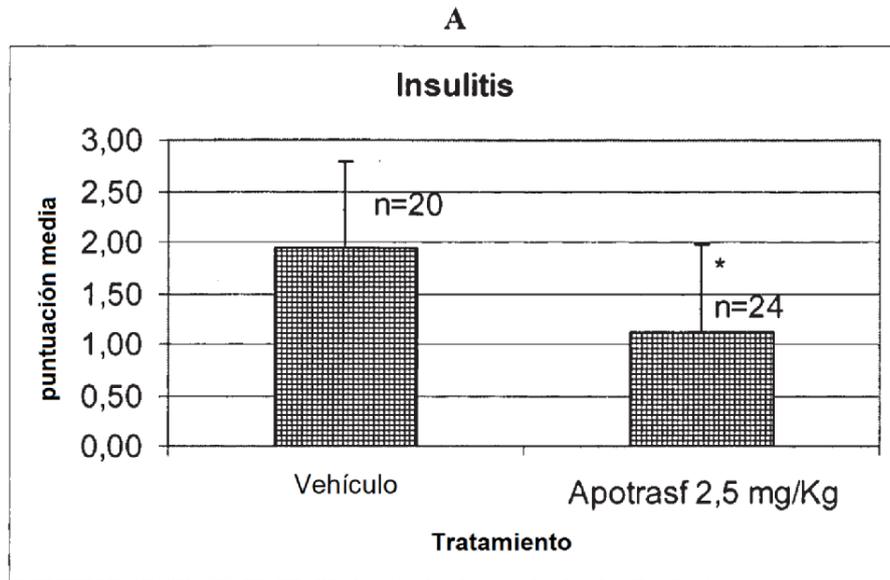
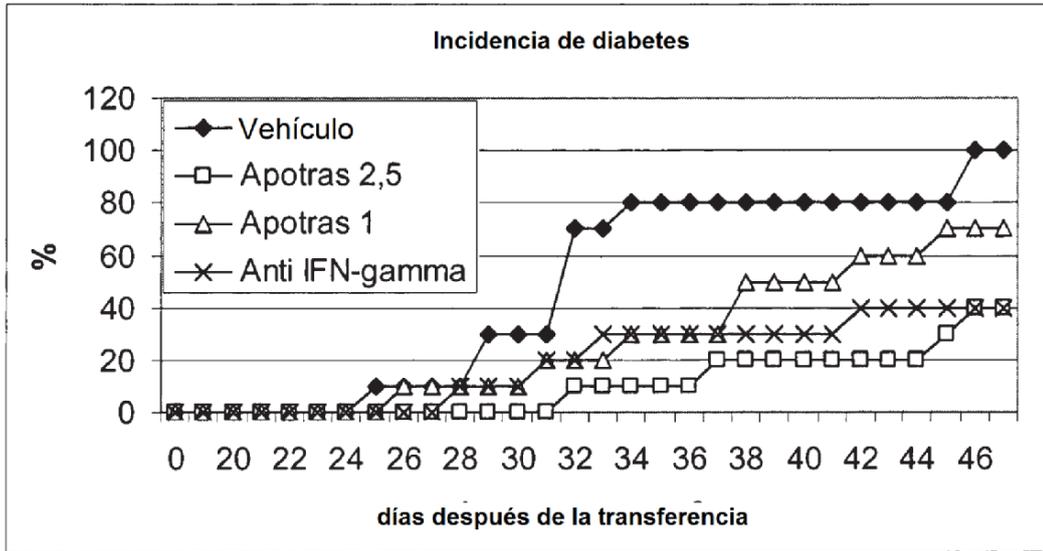


FIG 10 C-D

C



D

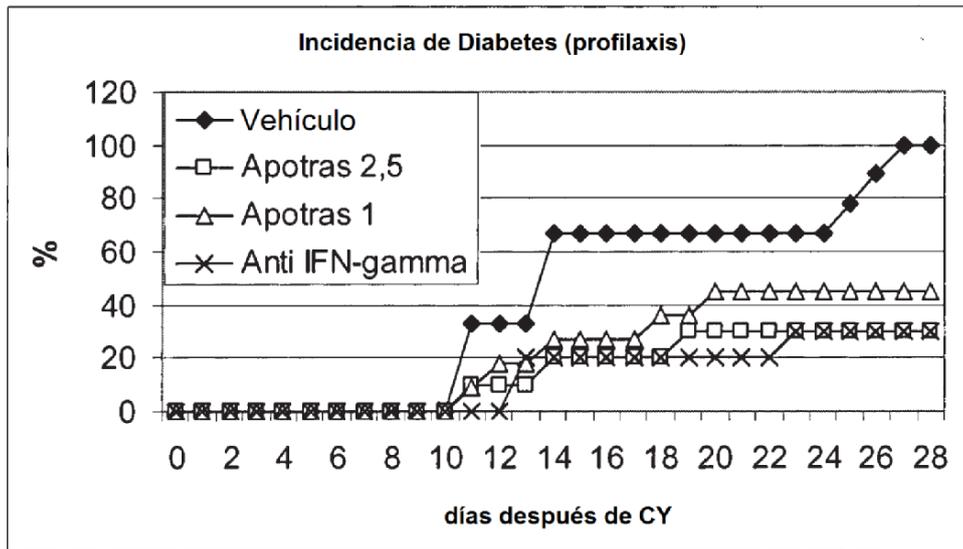
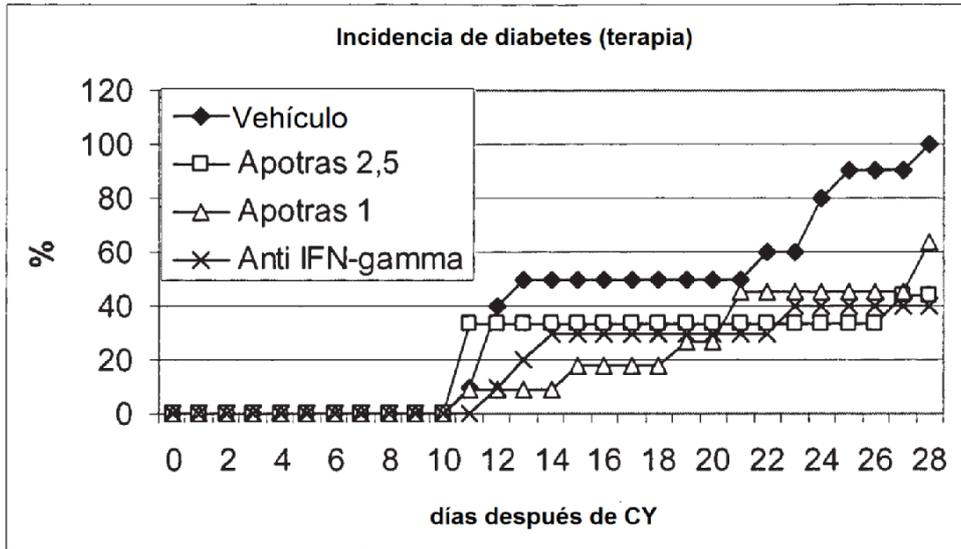


FIG 10 E-F

E



F

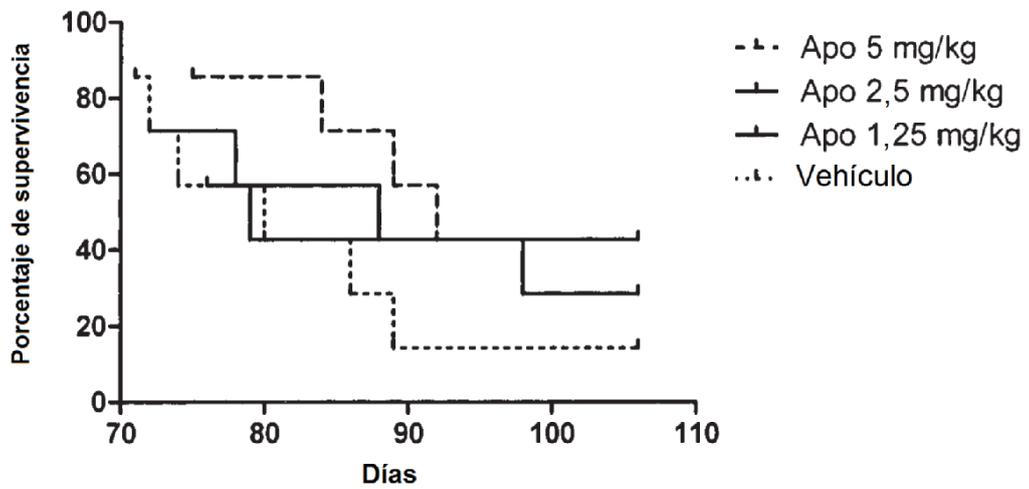


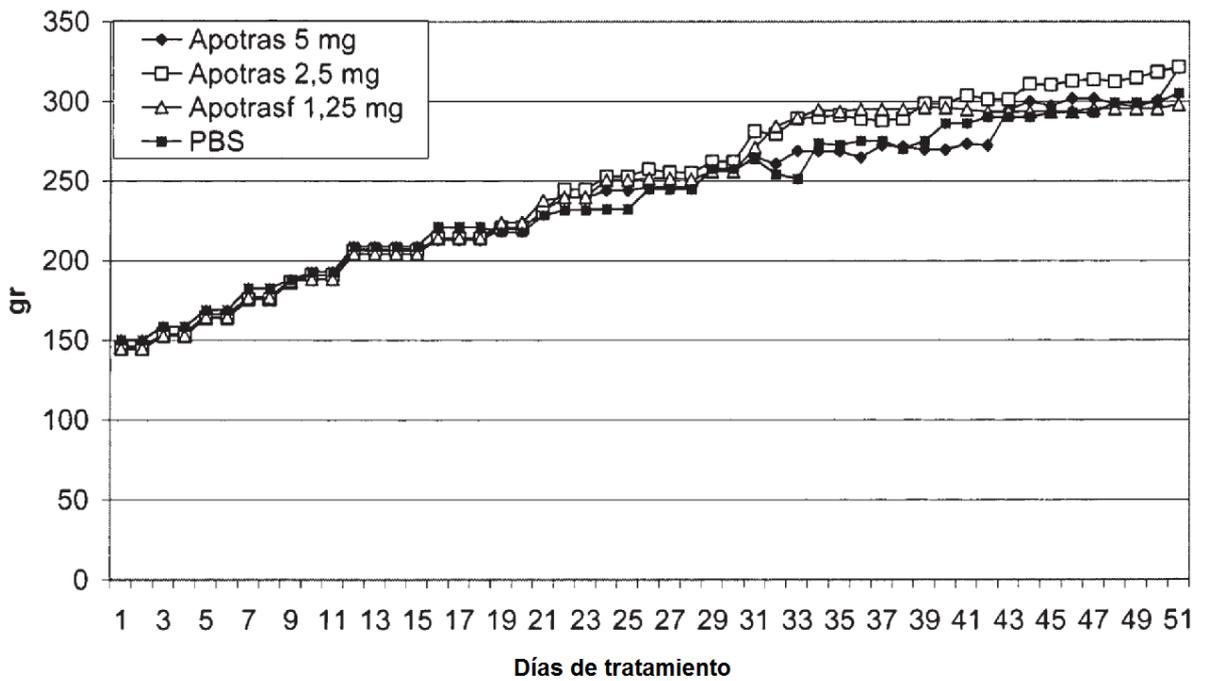
FIG 10 G-H

G

INICIO DE DIABETES				
	Apo 5	Apo 2,5	Apo 1,25	PBS
Media	91,43	87,29	84,57	81,43
Desviación típica	9,6	16,8	13,8	10,1
Prueba T	0,082	0,444	0,635	

H

Variación de peso corporal



**FIG 11**

