



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 368 941**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04700102 .9**
96 Fecha de presentación : **05.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1583562**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54 Título: **Angiopep-1, compuestos relacionados y utilidades correspondientes.**

30 Prioridad: **06.01.2003 US 437986 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es: **ANGIOCHEM Inc.**
201 President Kennedy
Avenue Suite Pk-R210
Montreal, QC H2X 3Y7, CA

72 Inventor/es: **Beliveau, Richard y**
Demeule, Michel

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Angiopep-1, compuestos relacionados y utilidades correspondientes.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a mejoras en el campo de la distribución de fármacos. De manera más particular, la invención se refiere a un método no invasivo y flexible y a un portador para transportar un compuesto o fármaco a través de la barrera hematoencefálica de un individuo.

10

Antecedentes de la invención

En el desarrollo de una nueva terapia para patologías cerebrales, la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) se considera el principal obstáculo para el uso potencial de fármacos para tratar trastornos del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés). El mercado global para fármacos del CNS fue de \$33 billones de dólares en 1998, que fue aproximadamente la mitad del mercado global para fármacos cardiovasculares, aunque en los Estados Unidos de América, casi el doble de personas sufren trastornos del CNS como de enfermedades cardiovasculares. La razón de este desequilibrio es que más del 98% de todos los fármacos potenciales del CNS no cruzan la barrera hematoencefálica. Además, más del 99% del desarrollo mundial de fármacos del CNS se dedica únicamente al descubrimiento de fármacos del CNS, y menos del 1% se dirige a la distribución de fármacos del CNS. Esta relación puede justificar por qué actualmente no hay tratamiento eficiente para las principales enfermedades neurológicas tales como tumores cerebrales, Alzheimer y accidente cerebrovascular.

El cerebro se protege contra sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas de barrera: la barrera hematoencefálica (BBB) y la barrera sanguínea-fluido cerebroespinal (BCSFB). La BBB se considera que es la ruta principal para la captación de ligandos séricos puesto que su área superficial es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BCSFB. El endotelio cerebral, que constituye la BBB, representa el principal obstáculo para el uso de fármacos potenciales contra muchos trastornos del CNS. Como regla general, sólo pueden pasar a través de la BBB, es decir, de la sangre al cerebro, moléculas lipófilas menores de aproximadamente 500 Daltons. Sin embargo, el tamaño de muchos fármacos que muestran resultados prometedores en estudios de animales para tratar trastornos del CNS es considerablemente mayor. De esta manera, los productos terapéuticos de péptidos y proteínas en general se excluyen del transporte de la sangre al cerebro debido a la permeabilidad insignificante de la pared endotelial del capilar cerebral a estos fármacos. Las células endoteliales capilares cerebrales (BCEC) están cercanamente selladas por uniones herméticas, poseen pocas fenestras y pocas vesículas endocíticas en comparación con los capilares de otros órganos. Las BCEC están circundadas por matriz extracelular, astrocitos, pericitos y células microgliales. La asociación cercana de las células endoteliales con los procesos de bases de astrocitos y la membrana base de capilares son importantes para el desarrollo y mantenimiento de las propiedades de la BBB que permiten el control hermético del intercambio sangre-cerebro.

A la fecha, no hay ningún planteamiento eficiente de distribución de fármacos disponible para el cerebro. Los métodos bajo investigación para la distribución de fármacos de péptidos y proteínas al cerebro se pueden dividir en tres estrategias principales. Primeramente, los procedimientos invasivos incluyen la administración intraventricular directa de fármacos por medio de cirugía, y la interrupción temporal de la BBB por medio de la infusión intracarótida de soluciones hiperosmolares. Segundo, la estrategia basada en la farmacología consiste en facilitar el paso a través de la BBB al incrementar la solubilidad lipídica de péptidos o proteínas. Tercero, las estrategias basadas en la fisiología sacan provecho de los varios mecanismos portadores en la BBB, que se han caracterizado en estos últimos años. En este planteamiento, se unen fármacos a un vector de proteína que actúa como un vehículo de distribución dirigido a receptores en la BBB. Este planteamiento es altamente específico y presenta una alta eficiencia con una extrema flexibilidad para indicaciones clínicas con objetivos ilimitados. En la presente invención se ha investigado este último planteamiento.

50

Sería altamente deseable proporcionar una mejora en el campo de la distribución de fármacos.

También sería altamente deseable proporcionar un método no invasivo y flexible y un portador para transportar un compuesto o fármaco a través de la BBB de un individuo.

55

Breve descripción de la invención

Una finalidad de la presente invención es proporcionar una mejora en el campo de la distribución de fármacos.

Otra finalidad de la presente invención es proporcionar un método no invasivo y flexible y un portador para transportar un compuesto o fármaco a través de la barrera hematoencefálica de un individuo.

60

De acuerdo a una modalidad de la invención, se proporciona un portador como se reivindica en la reivindicación 1.

65

El portador de la invención sirve para transportar un agente unido a este a través de una barrera hematoencefálica, donde el portador es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica después de la unión al agente y transportar de este modo el agente a través de la barrera hematoencefálica.

ES 2 368 941 T3

En una modalidad preferida de la presente invención, el transporte no afecta a la integridad de la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con la presente invención, el portador comprende Angio-pep1 o consta de un fragmento de este.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente se selecciona del grupo conformado por un fármaco, una medicina, una proteína, un péptido, una enzima, un antibiótico, un agente anti-cáncer, una molécula activa al nivel del sistema nervioso central, un agente de radioformación de imágenes, un anticuerpo, una toxina celular, una marca detectable y un compuesto anti-angiogénico.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente anti-cáncer es Paclitaxel.

En una modalidad preferida de la presente invención, la marca detectable se selecciona del grupo conformado por una marca radioactiva, una proteína fluorescente verde, una proteína histag y β -galactosidasa.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente tiene un peso molecular máximo de 160,000 Daltons.

En una modalidad preferida de la presente invención, el transporte se efectúa por la transcitosis mediada por receptores o transcitosis mediada por absorbentes.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente sirve para el tratamiento de una enfermedad neurológica.

En una modalidad preferida de la presente invención, la enfermedad neurológica se selecciona del grupo conformado por un tumor cerebral, una metástasis cerebral, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular y disfunciones relacionadas con la barrera hematoencefálica.

En una modalidad preferida de la presente invención, la disfunción relacionada con barrera hematoencefálica es la obesidad.

En una modalidad preferida de la presente invención, el transporte da como resultado la distribución del agente al sistema nervioso central (CNS) de un individuo.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente se puede liberar del portador después del transporte a través de la barrera hematoencefálica.

En una modalidad preferida de la presente invención, el agente se libera del portador después del transporte a través de la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona un conjugado para su uso en el transporte de un agente a través de una barrera hematoencefálica; dicho conjugado comprende: (a) un portador de la invención; y (b) un agente unido al portador, donde el conjugado es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y transportar de este modo el agente a través de la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el transporte de un agente a través de una barrera hematoencefálica; dicha composición comprende un conjugado de acuerdo con una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurológica; dicha composición comprende un conjugado de acuerdo con una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la distribución de un agente al CNS de un individuo; dicha composición comprende un conjugado de acuerdo con una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona un uso de un portador de la invención para su uso en el transporte de un agente unido a este a través de una barrera hematoencefálica en la elaboración de un medicamento para transportar el agente a través de la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el transporte de un agente a través de una barrera hematoencefálica; dicha composición comprende un medicamento elaborado como se define en una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona un portador de la invención para su uso en el transporte de un agente unido a este a través de una barrera hematoencefálica en la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad neurológica en un individuo.

5 De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurológica que comprende un medicamento elaborado como se define en una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona un portador para su uso en el transporte de un agente unido a este a través de una barrera hematoencefálica en la elaboración de un medicamento para tratar un trastorno del sistema nervioso central en un individuo.

15 De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar un trastorno del sistema nervioso central; dicha composición comprende un medicamento elaborado como se define en una modalidad de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a un conjugado o composición de la invención para su uso en el transporte de un agente a través de la barrera hematoencefálica.

20 La presente invención también se refiere a un conjugado o composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente.

En un método preferido de la presente invención, la composición farmacéutica se debe administrar al individuo de forma intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os*.

25 El portador de conformidad con la reivindicación 1 es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y estar unido a o conjugado a otro compuesto u agente y de este modo ser capaz de transportar el otro compuesto u agente a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, el portador puede unirse a receptores presentes en células endoteliales cerebrales y de este modo ser transportado a través de la barrera hematoencefálica por transcitosis.

30 El conjugado de conformidad con la reivindicación 3 se propone que signifique un conjugado de un portador y otro compuesto o agente. La conjugación puede ser de naturaleza química, tal como con un ligador, o de naturaleza genética, por ejemplo por tecnología genética recombinante, tal como en una proteína de fusión como por ejemplo una proteína fluorescente verde, β -galactosidasa o proteína Histag.

35 Los términos “tratamiento” y “que trata” se propone que signifiquen obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, por ejemplo, inhibición de crecimiento de células cancerosas, muerte de una célula cancerosa o mejora de una enfermedad o condición neurológica. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad.

40 El término “cáncer” se propone que signifique cualquier neoplasia cuyo rasgo único es la pérdida de controles normales que dan como resultado el crecimiento incontrolado, carencia de diferenciación y capacidad para invadir tejidos locales y metastazar. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano. De manera más específica, el cáncer se propone que incluya cáncer del cerebro.

45 El término “que administra” y “administración” se propone que signifique un modo de distribución que incluye de forma intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os*. La preferida es *per os*. Una dosis diaria se puede dividir en una, dos o más dosis en una forma adecuada que se administran una, dos o más veces a lo largo de un periodo de tiempo.

El conjugado o composición de la invención puede administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva.

55 El término “terapéuticamente efectivo” se propone que signifique una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente algún síntoma asociado con una enfermedad o condición médica. Por ejemplo, en el tratamiento de cáncer o una condición mental por enfermedad neurológica o del CNS, un agente o compuesto que disminuya, prevenga, retrase, suprima o detenga cualquier síntoma de la enfermedad o condición será terapéuticamente efectivo. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o compuesto no se requiere que cure una enfermedad o condición sino que proporcionará un tratamiento para una enfermedad o condición tal que el comienzo de la enfermedad o condición se retrase, impida o prevenga, o la enfermedad o síntomas de la condición se mejoren, o el término de la enfermedad o condición se cambie o, por ejemplo, sea menos severo o se acelere la recuperación en un individuo.

65 El portador y los conjugados portador-agente de la presente invención se pueden usar en combinación con cualquiera de los métodos convencionales de tratamiento y/o terapia o se pueden usar de manera separada a partir de métodos convencionales de tratamiento y/o terapia.

Cuando los conjugados de portador-agente de esta invención se administran en terapias de combinación con otros agentes, se pueden administrar de manera secuencial o concurrente a un individuo. De manera alternativa, las compo-

siciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden comprender una combinación de un conjugado de portador-agente de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente, y otro agente terapéutico profiláctico conocido en la técnica.

5 Se entenderá que una “cantidad efectiva” para cualquier individuo en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del agente específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y/o dieta del individuo, tiempo de administración, ruta de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se someta a prevención o terapia.

10 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por métodos conocidos y usados en la técnica.

Como se usa en la presente, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes (tal como solución salina amortiguada con fosfato, amortiguadores, agua, solución salina), medios de dispersión, 15 revestimientos, agentes antibacterianos y fungicidas, y agentes de retraso isotónicos y de absorción. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en lo que se refiere a cualquier medio convencional o agente que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones principios activos complementarios.

20 Un fragmento de un péptido puede ser un subconjunto de aminoácidos que constituyen la secuencia del péptido completo. Un fragmento de portador es capaz de ser unido a o conjugado a otro compuesto o agente y cruzar la barrera hematoencefálica y de este modo ser capaz de transportar el otro compuesto o agente a través de la barrera hematoencefálica.

25 El término “agente” se propone que signifique sin distinción un fármaco o un compuesto tal como un agente o compuesto terapéutico, un marcador, un trazador o un compuesto de formación de imágenes.

El término “agente terapéutico” se propone que signifique un agente y/o medicina y/o fármaco usado para tratar los síntomas de una enfermedad, condición física o mental, lesión o infección e incluye, antibióticos, agentes anti- 30 cáncer, agentes anti-angiogénicos y moléculas activas al nivel del sistema nervioso central. Se puede administrar por ejemplo Paclitaxel de forma intravenosa para tratar cáncer cerebral.

El término “paciente” se propone que signifique cualquiera que recibe un cierto tratamiento médico e incluye que se someta a la administración de un conjugado de portador-agente o compuesto para tratar, detectar, trazar, marcar o 35 formar en imágenes una condición, tal como un tumor. De manera preferente, el paciente o individuo tratado es un mamífero y de manera más preferente un humano.

Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de los experimentos de transcitosis de la aptotina (●), p97 (◆) y ceruloplasmina (■) a través de células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BBCEC);

La Figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de los experimentos de transcitosis de aptotina (●) y transferrina (○) a través de células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BBCEC);

45 La Figura 3 es una gráfica de barras que ilustra que la aptotina tiene una mayor capacidad de transcitosis que la transferrina en un modelo de barrera hematoencefálica;

La Figura 4 es un análisis de SDS-PAGE que ilustra que la integridad de la aptotina no se ve afectada por su 50 transcitosis a través de las monocapas de BBCEC;

La Figura 5 es una gráfica de la depuración de [¹⁴C]-sacarosa expresada como una función del tiempo. La depuración de la sacarosa se midió en la presencia y en la ausencia de aptotina a 250 nM;

55 La Figura 6 es una gráfica que muestra los resultados de una prueba de permeabilidad de sacarosa de células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BBCEC);

La Figura 7 es una gráfica de la depuración de [¹⁴C]-sacarosa expresada como una función del tiempo que ilustra que la aptotina no afecta la integridad de la barrera hematoencefálica. La depuración de la sacarosa se midió en la 60 presencia y ausencia de aptotina 5 μM;

La Figura 8 es una gráfica de barras que ilustra la acumulación de [¹²⁵I]-aptotina en capilares humanos y de rata;

La Figura 9 es una gráfica que ilustra un transcurso del tiempo de la captación de aptotina en capilares humanos 65 y de rata;

La Figura 10 es una gráfica de barras que ilustra que el conjugado de aptotina-biotina y la aptotina tienen la misma capacidad de transcitosis;

La Figura 11 es una gráfica de barras que ilustra que la transcitosis de la aprotinina y el conjugado de aprotinina-biotina es dependiente de la temperatura y dependiente de la conformación;

Las Figuras 12A y 12B son conjuntos de gráficas que ilustran el efecto de la temperatura y calentamiento en la transcitosis de (A) aprotinina y (B) conjugado de aprotinina-biotina en células BBCEC;

La Figura 13 es una gráfica de barras que ilustra el incremento en la transcitosis de estreptavidina en la presencia de conjugado de aprotinina-biotina;

La Figura 14 es una gráfica de barras que ilustra la inhibición de la transcitosis de aprotinina por el antagonista de LRP, proteína asociada al receptor (RAP);

La Figura 15 es una gráfica de barras que ilustra la captación de aprotinina en un experimento de perfusión cerebral *in situ*;

La Figura 16 ilustra una secuencia de aprotinina sintética;

La Figura 17 ilustra una alineación de secuencias entre aprotinina y tres proteínas humanas con un dominio similar;

La Figura 18 es una gráfica de barras que ilustra *in situ* la perfusión cerebral de transferrina, aprotinina y Angio-pep1;

La Figura 19 es una gráfica que ilustra la transcitosis de Angio-pep1 en comparación con la de la aprotinina; y

La Figura 20 es una gráfica que ilustra la transcitosis de Angio-pep1 a través del modelo de barrera hematoencefálica *in vitro*.

Descripción detallada de la modalidad preferida

La presente invención se refiere a un portador para transportar un agente, medicina u otra molécula al cerebro y/o sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés). Este portador permite el paso del agente, medicina u otra molécula que se une o acopla (conjugua) al portador y que es incapaz por sí misma de cruzar la barrera hematoencefálica, que se transporta a través de la barrera hematoencefálica. El conjugado del portador puede ser un conjugado de portador-agente terapéutico. Estos conjugados pueden estar en la forma de una composición, tal como una composición farmacéutica, para su uso en el tratamiento de una condición o enfermedad.

Este planteamiento es muy versátil puesto que permite la conjugación de moléculas pequeñas así como grandes que tienen objetivos terapéuticos muy diversos.

De acuerdo con la presente invención, un portador para su uso en un método para transportar un agente a través de la barrera hematoencefálica comprende administrar a un individuo un agente que comprende un principio activo o un agente farmacéuticamente unido a un portador de conformidad con la reivindicación 1.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto se puede administrar de forma intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os* al paciente. El agente es de manera preferente un compuesto anti-angiogénico. El agente puede tener un peso máximo de 160,000 Daltons. De manera preferente, el agente es un marcador o un fármaco tal como un fármaco de molécula pequeña, una proteína, un péptido o una enzima. El fármaco se adapta de manera preferente para tratar una enfermedad neurológica o un trastorno del sistema nervioso central de un paciente. El fármaco puede ser un fármaco citotóxico y el marcador puede ser una marca detectable tal como una marca radioactiva, una proteína fluorescente verde, una proteína histag o β -galactosidasa. El agente se distribuye de manera preferente en el sistema nervioso central de un paciente.

De acuerdo con aún otra modalidad preferida de la invención, los compuestos de la invención no alteran la integridad de la barrera hematoencefálica del paciente.

El portador de la presente invención se puede enlazar a o marcar con una marca detectable tal como un agente de radioformación de imágenes, tal como los que emiten radiación, para detección de una enfermedad o condición, por ejemplo por el uso de un conjugado de agente de radioformación de imágenes-anticuerpo-portador, en donde el anticuerpo se une a un antígeno específico de la enfermedad o condición. De manera alternativa, el portador de la presente invención se puede enlazar a un agente terapéutico, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición, o se puede enlazar a o marcar con mezclas de los mismos.

Un agente terapéutico de la presente invención puede ser un fármaco, una medicina, un agente que emite radiación, una toxina cerebral (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y/o un fragmento biológicamente activo del mismo, y/o mezcla de los mismos para permitir la aniquilación celular que puede ser un agente para tratar, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir una enfermedad o condición en un individuo tratado. Un agente terapéutico puede ser un producto sintético o un producto de origen fúngico, bacteriano u otro microorganismo, tal como micoplasma, viral, etc., animal, tal como reptil o vegetal. Un agente terapéutico y/o fragmento biológicamente activo del mismo puede

ser un agente enzimáticamente activo y/o fragmento del mismo, o puede actuar al inhibir o bloquear una ruta celular importante y/o esencial o al competir con un componente celular importante y/o esencial que se presente de forma natural.

- 5 Los agentes de radioformación de imágenes que emiten radiación (radiomarcas detectables) para el uso en la presente invención se ejemplifican por indio-111, tecnecio-99, o yodo-131 a baja dosis.

Las marcas detectables o marcadores para el uso en la presente invención pueden ser una radiomarca, una marca fluorescente, una marca activa de resonancia magnética o nuclear, una marca luminiscente, una marca de cromóforo, un isótopo que emite positrones para scanner de PET, marca quimioluminiscente, o una marca enzimática. Las marcas fluorescentes incluyen proteína fluorescente verde (GFP), fluoresceína y rodamina. Las marcas quimioluminiscentes incluyen luciferasa y β -galactosidasa. Las marcas enzimáticas incluyen peroxidasa y fosfatasa. Una histag también puede ser una marca detectable.

- 15 Se contempla que un agente se pueda liberar del portador después del transporte a través de la barrera hematoencefálica, por ejemplo, por escisión o ruptura enzimática de un enlace químico entre el portador y el agente. El agente de liberación entonces funcionará a su capacidad propuesta en la ausencia del portador.

La presente invención se entenderá más fácilmente al hacer referencia a los siguientes ejemplos que se dan para ilustrar la invención.

Ejemplos

Determinación de un Portador Adecuado

25 Un modelo reproducible *in vitro* de barrera hematoencefálica que muestra las características *in vivo* se ha usado para ensayo de detección y para estudios mecánicos de transporte de fármacos al cerebro. Este modelo *in vitro* eficiente de la barrera hematoencefálica se desarrolló por la compañía CELLIAL^{MR} Technologies, fue de principal importancia a la evaluación fiable de la capacidad de diferentes portadores para alcanzar el cerebro. El modelo consiste de un cocultivo de células endoteliales capilares cerebrales bovinas y células gliales de rata. Presenta rasgos ultraestructurales característicos del endotelio cerebral que incluyen uniones herméticas, carencia de fenestración, carencia de canales transendoteliales, baja permeabilidad para moléculas hidrófilas y una alta resistencia eléctrica. Además, este modelo ha mostrado un buen coeficiente de correlación entre análisis *in vitro* e *in vivo* de la amplia variedad de moléculas probadas. A la fecha, todos los datos obtenidos muestran que este modelo de BBB imita cercanamente la situación *in vivo* al reproducir algunas de las complejidades del ambiente celular que existen *in vivo*, en tanto que retiene las ventajas experimentales asociadas con el cultivo de tejido. De esta manera, muchos estudios han validado este cocultivo celular como uno de los modelos más reproducibles *in vitro* de la BBB.

El modelo *in vitro* de la BBB se estableció al usar un cocultivo de BBCEC y astrocitos. Antes del cultivo celular, se revistieron piezas de inserción de laca (Millicell-PC 3.0 μ m; diámetro 30-mm) en el lado superior con colágeno de cola de rata. Entonces se colocaron en microplacas de seis cavidades que contienen los astrocitos y las BBCEC se revistieron en el lado superior de los filtros en 2 mL de medio de cocultivo. Este medio de BBCEC se cargó tres veces a la semana. Bajo estas condiciones, las BBCEC diferenciadas formaron una monocapa confluyente 7 días después. Los experimentos se realizaron entre 5 y 7 días después de que se alcanzara la confluencia. El coeficiente de permeabilidad para sacarosa se midió para verificar la permeabilidad endotelial.

Los cultivos primarios de los astrocitos mezclados se prepararon a partir de corteza cerebral de rata neonata (Dehouck M.P., Meresse S., Delorme P., Fruchart J.C., Cecchelli, R. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood-Brain Barrier *In Vitro*. J. Neurochem, 54, 1798-1801, 1990). De forma breve, después de remover las meninges, el tejido cerebral se forzó suavemente a través de un tamiz de nylon de 82 μ m. Los astrocitos se colocaron en microplacas de seis cavidades a una concentración de 1.2×10^5 células/mL en 2 mL de medio de cultivo óptimo (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10%, inactivado con calor. El medio se cambió dos veces por semana.

Se obtuvieron células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BBCEC) de Cellial Technologies. Las células se cultivaron en presencia del medio de DMEM complementado con suero de caballo al 10% (v/v) y suero de ternera al 10%, inactivado con calor, 2 mM de glutamina, 50 μ g/mL de gentamicina, y 1 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básicos, agregado cada dos días.

A fin de determinar un portador adecuado para la presente invención, se realizaron pruebas comparativas usando el modelo *in vitro* de la BBB. Como se ilustra en la Figura 1, se realizaron experimentos de transcitosis de diferentes proteínas (aprotinina (●), p97 (◆) y ceruloplasmina (■)) a través de las células endoteliales capilares cerebrales bovinas (BBCEC). Las Figuras 2 y 3 muestran los resultados de los experimentos de transcitosis realizados con aprotinina (●) y transferrina (○), usando el mismo método que en los experimentos de la Figura 1. Se colocó una pieza de inserción cubierta con BBCEC en una microplaca de seis cavidades de 2 mL de Ringer-Hepes y se preincubó durante 2 horas a 37°C. Se adicionaron [¹²⁵I]-aprotinina, [¹²⁵I]-p97, [¹²⁵I]-ceruloplasmina o [¹²⁵I]-transferrina (concentración final 250 mM) al lado superior del filtro cubierto con células. En varios momentos, la pieza de inserción se transfirió a otra cavidad para evitar una posible reendocitosis de las [¹²⁵I]-proteínas por el lado abluminal de las BBCEC. Al

final del experimento, se valoraron las [^{125}I]-proteínas en 500 μL de la cámara inferior de la cavidad por precipitación con TCA. Los resultados indican que la aprotinina tiene una capacidad mayor de transcitosi que la transferrina, p97 o ceruloplasmina en un modelo de barrera hematoencefálica.

La aprotinina, p97 y holo-transferrina bovina se yodaron con procedimientos normales usando cuentas de yodo de Sigma^{MR}. La holo-transferrina bovina se diluyó en amortiguador de fosfato 0.1 M, pH 6.5 (PB). La p97 obtenida de Synapse Technologies en citrato neutralizado a pH 7.0 se dializó contra esta PB. Dos cuentas de yodo se usaron para cada proteína. Estas cuentas se lavaron dos veces con 3 mL de PB en un papel Whatman^{MR} y se redispersaron en 60 μL de PB. Se adicionó ^{125}I (1 mCi) de Amersham-Pharmacia biotech para la suspensión de las cuentas durante 5 minutos a temperatura ambiente. La yodación para cada proteína se inició con la adición de 100 μg (80-100 μL). Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, los sobrenadantes se aplicaron en una columna de desalinación preempacada con 5 mL de dextrano reticulado de Pierce y las ^{125}I -proteínas se eluyeron con 10 mL de PBS. Las fracciones de 0.5 mL se recogieron y se midió la radioactividad en 5 μL de cada fracción. Se mezclaron las fracciones que corresponden a las ^{125}I -proteínas y se dializaron contra Ringer-Hepes, pH 7.4. La eficiencia de la radiomarcación fue entre 0.6-1 x 10⁸ cpm/100 μg de proteína.

De las Figuras 1-3, es claro que la aprotinina tiene una capacidad de transcitosi que es bastante superior a la de las otras proteínas probadas. Los datos de las Figuras 1-3 se han resumido en la Tabla 1, donde se ha hecho una comparación de las diferentes proteínas.

TABLA 1

Comparación de ^{125}I -proteínas (250 mM), transcitosi a través de monocapas de BBCEC

Proteínas comparadas	Relaciones (x-veces)
aprotinina/p97	8.2
aprotinina/ceruloplasmina	44.0
aprotinina/transferrina	11.6

La Tabla 2 resume otro experimento donde se ha hecho una comparación de diferentes proteínas adicionales.

TABLA 2

Eficiencia de aprotinina para cruzar la barrera hematoencefálica

Proteínas comparadas	Transcitosi (pmol/h/cm ²)	Relaciones Aprotinina/Proteína
Aprotinina	2.7	1
Melanotransferrina (p97)	0.28	10
Transferrina	0.14	19
Lactoferrina	0.05	50
Streptavidina	0.09	30

En vista de las Tablas 1 y 2, se puede ver que para aprotinina, se obtuvo un transporte transendotelial superior en comparación con las otras proteínas probadas y que la alta transcitosi de la aprotinina es de aproximadamente 10 a 50 veces mayor que estas otras proteínas.

Integridad de aprotinina no se ve afectada por su transcitosi a través de monocapas de BBCEC

Se adicionó [^{125}I]-proteína (0.5-105 μCi /ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior de filtros con o sin células de BBCEC colocadas en placas de 6 cavidades. En cada punto de evaluación, los filtros se pusieron en la siguiente cavidad de las placas de 6 cavidades. Al final del experimento, se tomaron alícuotas en cada cavidad y se sometieron a SDS-PAGE. Los geles entonces se sometieron a detección por autorradiografía. Los resultados, presentados en la Figura 4, indican que la integridad de la aprotinina no se ve afectada por su transcitosi a través de las monocapas de BBCEC.

Aprotinina no afecta la integridad de la barrera hematoencefálica

Se realizó una prueba adicional para determinar el efecto de la aprotinina a 250 mM en la integridad de la BBB al medir la permeabilidad de [^{14}C]-sacarosa en el modelo de BBB en monocapas de BBCEC cultivadas en filtros en presencia de astrocitos. Para lograr esta prueba, se transfirieron monocapas de células endoteliales cerebrales cultivadas en piezas de inserción a placas de 6 cavidades que contienen 2 mL de Ringer-Hepes por cavidad (compartimento basolateral) durante dos horas a 37°C. La solución de Ringer-Hepes se compuso de NaCl 150 mM, KCl 5.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM, MgCl₂ 0.2 mM, NaHCO₃ 6 mM, Hepes 5 mM, Hepes 2.8 mM, pH 7.4. En cada cámara apical, el medio de cultivo se reemplazó por 1 mL de Ringer-Hepes que contenía la [^{14}C]-sacarosa marcada. En diferentes

momentos se colocaron las piezas de inserción en otra cavidad. Se inhibió el paso de [14 C]-sacarosa a 37°C, en filtros sin células ($\square$) o con filtros revestidos con células BBCEC en la ausencia (Δ) o presencia ($\circ$) de aprotinina 5 μ L (Figura 6). Los resultados se grafican como la depuración de sacarosa (μ L) como una función del tiempo (min). El coeficiente de permeabilidad de sacarosa entonces se determinó. El coeficiente de permeabilidad (Pe) se calculó como:

$$1) \text{ Depuración } (\mu\text{L}) = \frac{[C]A \times VA}{[C]L}$$

en donde:

[C]A = Concentración de trazador abluminal

VA = Volumen de cámara abluminal

[C]L = Concentración de trazador luminal.

$$2) 1/Pe = (1/PS_t - 1/PS_f) / \text{área de filtro (4.2 cm}^2\text{)}.$$

Al final de los experimentos, se midieron las cantidades de los radiotrazadores en el compartimento basolateral en un contador de centelleo líquido. El coeficiente de permeabilidad (Pe) para sacarosa se calculó como se describe anteriormente (Dehouck M.P., Jolliet-Riant, P., Brée, F., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Tillement, J.P., J. Neurochem. 58:1790-1797, 1992) usando filtros revestidos y no revestidos con EC. Los resultados de los dos experimentos se graficaron de manera separada en términos de la depuración de [14 C]-sacarosa (μ L) como una función del tiempo (min) (Figuras 5 y 6). En las Figuras 5 y 6, PS_t representa la permeabilidad por área superficial de un filtro del cocultivo y PS_f representa la permeabilidad de un filtro revestido con colágeno y astrocitos colocados en placas en el lado del fondo del filtro B. El coeficiente de permeabilidad (Pe) se calculó y se demostró que la integridad de la BBB no se ve afectada por la aprotinina (ver Figura 6 para Pe calculado de la Figura 5, y Tabla 3 para Pe calculado de la Figura 7).

TABLA 3

Coefficientes de permeabilidad de aprotinina demuestran que aprotinina no afecta la integridad de la barrera hematoencefálica

	Pe sacarosa (10^{-3} cm/min)
- Aprotinina	0.46 $\pm$ 0.09
+ Aprotinina	0.32 $\pm$ 0.04

Acumulación de [125 I]-aprotinina en capilares humanos y de rata

Se midió la acumulación a 37°C durante 1 hora. El medio de incubación contuvo aprotinina a una concentración final de 100 nM en solución de Ringer/Hepes. La acumulación se detuvo por la adición de solución de detención enfriada con hielo y filtración al vacío a través de un filtro de 0.45 μ M. La unión no específica de la aprotinina a la superficie de los capilares se evaluó por la adición de la solución enfriada con hielo antes de adicionar el medio de incubación. Este valor se sustrajo del valor de acumulación para obtener el valor de acumulación real. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8.

Transcurso en tiempo de captación de aprotinina en capilares humanos y de rata

Se midió la captación de aprotinina a 37°C para un tiempo variable. El medio de incubación contuvo aprotinina a una concentración final de 100 nM en solución de Ringer/Hepes. En cada punto de evaluación, la acumulación se detuvo por adición de una solución de detención enfriada con hielo y filtración al vacío a través de un filtro de 0.45 μ M. En cada punto de evaluación, se evaluó la unión específica de aprotinina en la superficie de los capilares por la adición de la solución enfriada con hielo antes de adicionar el medio de incubación. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9.

Conjugado de aprotinina-biotina: Procedimiento de biotinilación

Se usó para la conjugación análogo de biotina soluble en agua Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina (Pierce). Este análogo reacciona con aminas primarias en la ausencia de solvente orgánico y a un pH neutro. Se adicionó un exceso molar de 12 veces de análogo de biotina a una solución de aprotinina de 10 mg/ml. La mezcla de análogo de biotina y aprotinina se incubó durante 2 horas a 4°C. Para eliminar el reactivo de biotina sin reaccionar, se realizó una diálisis durante la noche en un cartucho de diálisis "slide-a-lyzer" (Pierce) con un corte de 3500 Da. Entonces se realizó la determinación de la incorporación de biotina con el tinte HABA (ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)-benzoico) que se une a avidina produciendo una absorción a 500 nm. Esa unión se puede dispersar con biotina libre o con proteína

biotinilada, permitiendo la cuantificación de la incorporación de biotina. La relación obtenida por esta conjugación fue de tres biotinas por cada aprotinina.

Conjugado de aprotinina-biotina y aprotinina tienen la misma capacidad de transcitosis

La transcitosis de [125 I]-aprotinina y [125 I]-aprotinina-biotina se evaluó a 37°C. Se adicionó [125 I]-proteína (0.5-1.5 μ Ci/ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior del filtro cubierto con células para la medición de la transcitosis. Al final del experimento, se determinó la transcitosis celular de [125 I]-proteína directamente por precipitación de TCA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10.

Transcitosis de aprotinina y conjugado de aprotinina-biotina es dependiente de la temperatura y dependiente de conformación

Se evaluó la acumulación de [125 I]-aprotinina y [125 I]-aprotinina-biotina a 37°C y 4°C, o a 37°C después de que las proteínas se hubieron sometido a ebullición durante 10 minutos a 100°C. Se adicionó [125 I]-proteína (0.5-1.5 μ Ci/ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior del filtro cubierto con células para la medición de la transcitosis. Al final del experimento, los filtros cubiertos con células se cortaron y se determinó la acumulación celular de [125 I]-proteína directamente por precipitación de TCA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 11.

Efecto de temperatura y calentamiento en transcitosis de aprotinina y conjugado de aprotinina-biotina en células BBCEC

Se evaluó la transcitosis de [125 I]-aprotinina (Figura 12A) y [125 I]-aprotinina-biotina (Figura 12B) a 37°C y 4°C, o a 37°C después de que las proteínas se hubieron sometido a ebullición durante 10 minutos a 100°C. Se adicionó [125 I]-proteína (0.5-1.5 μ Ci/ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior del filtro cubierto con células para la medición de la transcitosis. En cada punto de evaluación se movió el filtro a la siguiente cavidad de la placa de 6 cavidades. Al final del experimento, se valoró [125 I]-proteína en el compartimento inferior de cada cavidad por precipitación de TCA.

Incremento en transcitosis de estreptavidina en la presencia de conjugado de aprotinina-biotina

Se evaluó la transcitosis de [125 I]-estreptavidina sola o en la presencia de conjugado de aprotinina-biotina. Se adicionó [125 I]-proteína (0.5-1.5 μ Ci/ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior del filtro cubierto con células para la medición de la transcitosis. En cada punto de evaluación, se movió el filtro a la siguiente cavidad de la placa de 6 cavidades. Al final del experimento, se valoró [125 I]-proteína en el compartimento inferior de cada cavidad por precipitación de TCA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 13.

Inhibición de transcitosis de aprotinina por antagonista de LRP, proteína asociada a receptor (RAP)

Se evaluó la transcitosis de proteína a 37°C. Se adicionó [125 I]-proteína (0.5-1.5 μ Ci/ensayo) a una concentración final de 250 nM al lado superior del filtro cubierto con células con o sin RAP. Al final del experimento, se valoró [125 I]-aprotinina en el compartimento inferior de cada cavidad por precipitación de TCA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 14.

Captación de aprotinina: Perfusión cerebral en ratón in situ

Procedimiento Quirúrgico

La captación de [125 I]-aprotinina al lado luminal de los capilares cerebrales de ratón se midió usando el método de perfusión cerebral *in situ* adaptado al laboratorio para el estudio de la captación de fármacos en cerebro de ratón (Dagenais *et al.*, 2000, J. Cereb. Blood Flow Metab. 20(2):381-386). De forma breve, la carótida común derecha de ratones anestesiados con cetamina/xilazina (140/8 mg/kg i.p.), se expuso y ligó al nivel de la bifurcación de la carótida común, rostral a la arteria occipital. La carótida común entonces se cateterizó rostralmente con un catéter de polietileno (0.30 mm de i.d. x 0.70 mm de o.d.), relleno de heparina (25 U/ml) y se montó en una aguja de calibre de 26. La jeringa que contenía el fluido de perfusión (10 nM de [125 I]-aprotinina en amortiguador de Krebs/bicarbonato a un pH de 7.4, gasificada con O₂ a 95% y CO₂ al 5%) se colocó en una bomba de infusión (Harvard pump PHD 2000; Harvard Apparatus) y se conectó al catéter. Inmediatamente antes de la perfusión, se detuvo el corazón al cortar los ventrículos para eliminar la contribución del flujo sanguíneo contralateral. El cerebro se perfundió durante 10 minutos a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min. Después de 10 minutos de perfusión, el cerebro se perfundió adicionalmente durante 30 segundos con solución de Ringer/Hepes (NaCl 150 mM, KCl 5.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM, MgCl₂ 0.2 mM, NaHCO₃ 6 mM, Hepes 5 mM, glucosa 2.8 mM, pH 7.4), para lavar el exceso de [125 I]-aprotinina. Entonces se decapitaron los ratones para terminar la perfusión y se aisló el hemisferio derecho en hielo antes de que se sometiera a agotamiento capilar (Triguero *et al.*, 1990, J Neurochem. 54(6): 1882-8). Las alícuotas de los homogenados, sobrenadantes, sedimentos y perfundidos se tomaron para medir sus contenidos en [125 I]-aprotinina por precipitación con TCA y para evaluar el volumen aparente de distribución.

Determinación de constantes de transporte de BBB

De forma breve, se llevaron a cabo cálculos como se describe previamente por Smith (1996, Pharm. Biotechnol. 8:285-307). La captación de aprotinina se expresó como volumen de distribución (V_d) a partir de la siguiente ecuación:

$$V_d = Q^*_{br} / C^*_{pf}$$

donde Q^*_{br} es la cantidad calculada de [125 I]-aprotinina por gramo de hemisferio cerebral derecho y C^*_{pf} es la concentración de trazador marcado medido en el perfundido.

Los resultados de este experimento, mostrados en la Figura 15, indican que hay mayor captación cerebral para la aprotinina que para la transferrina y que la conjugación con biotina no modifica la captación cerebral de aprotinina.

En vista de los resultados obtenidos para las pruebas mencionadas con anterioridad, la aprotinina es un portador prometedor para transportar un agente o compuesto a través de la BBB puesto que tiene una transcitosis superior a través de manoplasmas de BBCEC a la de otras proteínas y no altera la integridad de la barrera hematoencefálica. Además, la aprotinina no se degrada durante la transcitosis ni la conjugación de aprotinina a biotina afecta su transcitosis. Además, la aprotinina es un portador versátil y flexible puesto que muchas moléculas tal como moléculas pequeñas de fármaco, proteínas, péptidos y enzimas se pueden unir fácilmente a las proteínas de aprotinina para promover su paso a través de la BBB. Estas moléculas se pueden unir de manera concebible a la aprotinina mediante un conectar.

También se ha determinado que el volumen de distribución cerebral de aprotinina es mayor que el de la transferrina. Adicionalmente se ha determinado que la transcitosis es sensible a la temperatura y dependiente de la conformación, lo que implica que un receptor de la familia de LDL-R, probablemente LRP participa en la transcitosis de la aprotinina.

De esta manera, la aprotinina es un portador efectivo y eficiente para distribuir un agente en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica.

Diseño de un péptido como un vector de fármaco para el cerebro

Una comparación de secuencias se hizo en la secuencia N-terminal de aprotinina (MRPDFCLEPPYTGPCVARIIR) (Figura 16) (SEQ ID NO:2) usando el programa BLAST^{MR} en el sitio Web National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta comparación de secuencias dio como resultado cuatro secuencias que se identifican. Ninguna de estas secuencias identificadas correspondió a una proteína humana.

La secuencia C-terminal de aprotinina (GLCQTFVYGGCRKRNNFKSAE) (Figura 16) (SEQ ID NO:3) también se comparó en el sitio Web NCBI. Esta comparación de secuencias dio como resultado 27 secuencias que se identifican con algunas proteínas correspondientes a proteínas humanas. Las proteínas con la mayor puntuación entonces se alinearon con la secuencia de la aprotinina (Figura 17). De esta alineación, se generó el siguiente péptido Angio-pep1: TFFYGGCRGKRNNFKTEEY (carga neta +2) (SEQ ID NO:4).

Perfusión cerebral in situ de transferrina, aprotinina y angio-pep1

El volumen de distribución cerebral aparente se midió para [125 I]-transferrina, [125 I]-aprotinina y [125 I]-Angio-pep1. Los cerebros de ratón se perfundieron durante 10 minutos. Se realizó el agotamiento de capilares cerebrales para valorar el volumen aparente de distribución en la parénquima cerebral. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 18.

Transcitosis de Angio-pep1 en comparación con la de aprotinina

La transcitosis de Angio-pep1 se comparó con la de aprotinina. El transporte de [125 I]-Angio-pep1 y [125 I]-aprotinina a partir del lado apical a basolateral de las monocapas de células endoteliales se midió como se describe anteriormente. La concentración final usada para Angiopep1 y aprotinina para este experimento fue de 2.5 μ M. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 19.

Transcitosis de Angio-pep1 a través del modelo in vitro de barrera hematoencefálica

Se evaluó el transporte de Angio-pep1 desde el lado apical a basolateral de las piezas de inserción cubiertas con o sin monocapas de células endoteliales. Los resultados se expresan como la depuración de Angio-pep1 como una función del tiempo. Las pendientes corresponden a la permeabilidad del péptido a través del filtro solo (Psf) y a la permeabilidad total de las monocapas de células endoteliales (Pst). El coeficiente de permeabilidad (Pe) para Angio-pep1 fue de 1.2×10^{-3} cm/min. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20.

Los coeficientes de permeabilidad para Angio-pep1, aprotinina, leptina y transferrina se determinaron usando el modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica. El coeficiente de permeabilidad (Pe) se calculó como se describe anteriormente. La comparación de los coeficientes de permeabilidad se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Coefficientes de permeabilidad para Angio-pep1, aprotinina, leptina y transferrina

Proteínas	Coefficiente de permeabilidad (Pe) (x 10 ⁻³ cm/min)	Relaciones
Angio-pep1	1.2	1
Aprotinina	0.16	7.5
Leptina	0.055	21
Transferrina	0.0057	210

Los experimentos anteriores indican que la penetración al cerebro para Angio-pep1 es mayor que la de aprotinina y transferrina. Los experimentos también indican que la transcitosi de Angio-pep1 medida usando el modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica es mayor que la de las otras proteínas incluyendo aprotinina, leptina y transferrina.

REIVINDICACIONES

1. Un portador, **caracterizado** por que la penetración al cerebro o transcitosis a través de la barrera hematoencefálica de dicho portador es mayor que la de aprotinina y transferrina,

a) que comprende el péptido Angiopep-1 (TFFYGGCRGKRNNFKTEEY) o

b) conformado por un fragmento de dicho péptido.

2. El portador de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el portador es Angiopep-1.

3. Un conjugado **caracterizado** por que comprende:

(a) un portador de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, y

(b) un agente unido al portador, en donde el conjugado es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica.

4. El conjugado de conformidad con la reivindicación 3, **caracterizado** por que el agente tiene un peso molecular máximo de 160,000 Daltons.

5. El conjugado de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizado** por que el agente es un fármaco de molécula pequeña que tiene un peso molecular de 1000 g/mol o menos.

6. El conjugado de conformidad con la reivindicación 3, **caracterizado** por que el agente se selecciona del grupo conformado por un fármaco de molécula pequeña, una proteína, un péptido, una marca detectable y un compuesto antiangiogénico.

7. El conjugado de conformidad con la reivindicación 3, **caracterizado** por que el agente es un agente terapéutico.

8. El conjugado de conformidad con la reivindicación 6, **caracterizado** por que el agente es un agente anticancerígeno.

9. El conjugado de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado** por que el agente anticancerígeno es paclitaxel.

10. El conjugado de conformidad con la reivindicación 6, **caracterizado** por que el agente es un anticuerpo.

11. El conjugado de conformidad con las reivindicaciones 3-10, **caracterizado** por que el transporte de dicho conjugado a través de la barrera hematoencefálica no afecta la integridad de la barrera hematoencefálica.

12. Una composición farmacéutica **caracterizada** por que comprende un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 3-11, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** por que la composición se puede administrar de forma intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os*.

14. Un conjugado o composición de conformidad con las reivindicaciones 3-13 útil para tratar una enfermedad neurológica.

15. El conjugado o composición para su uso de conformidad con la reivindicación 14, **caracterizado** por que la enfermedad neurológica se selecciona del grupo conformado por un tumor cerebral, una metástasis cerebral, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular y disfunción relacionada con la barrera hematoencefálica.

16. El conjugado o composición para su uso de conformidad con la reivindicación 14, **caracterizado** por que la enfermedad neurológica es un tumor cerebral o metástasis cerebral.

17. El conjugado o composición para su uso de conformidad con las reivindicaciones 14-16, **caracterizado** por que el agente es paclitaxel.

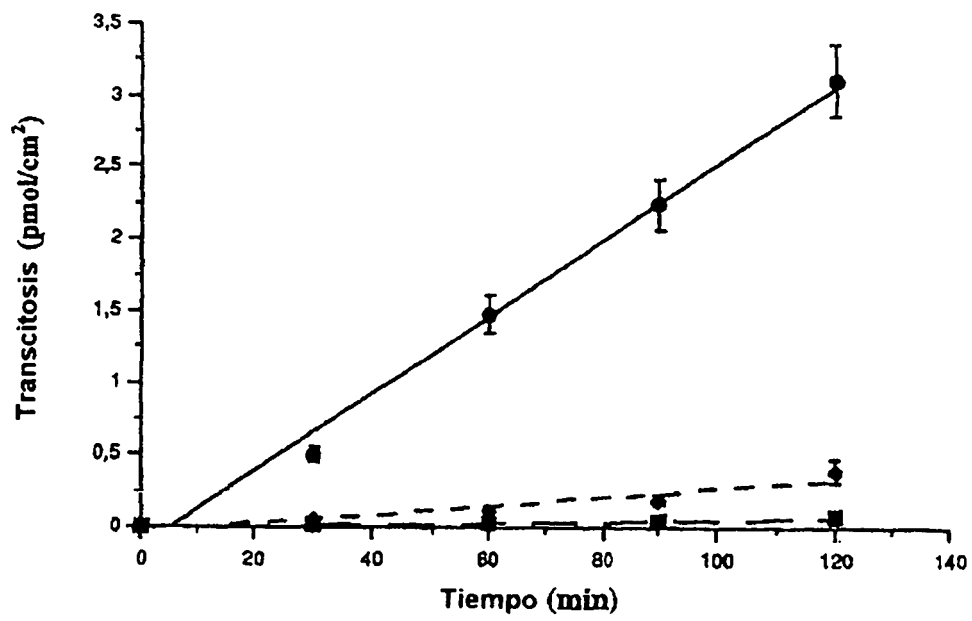


FIG. 1

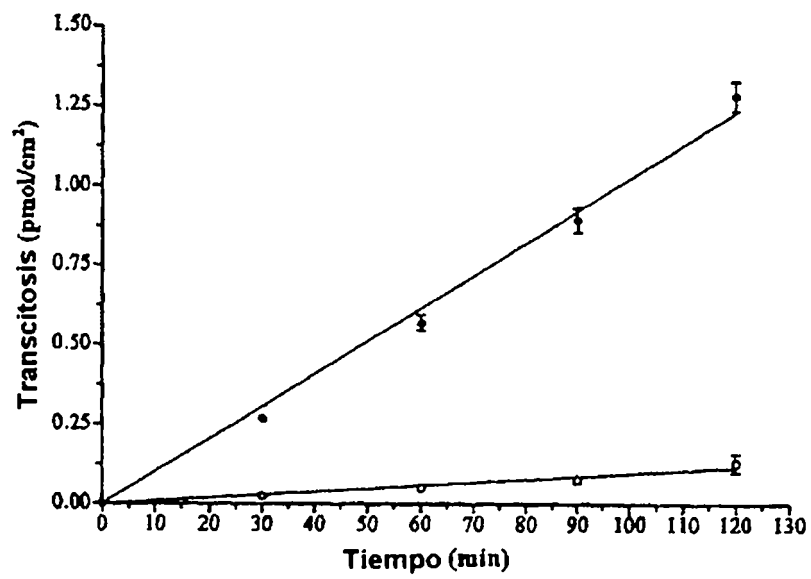


FIG. 2

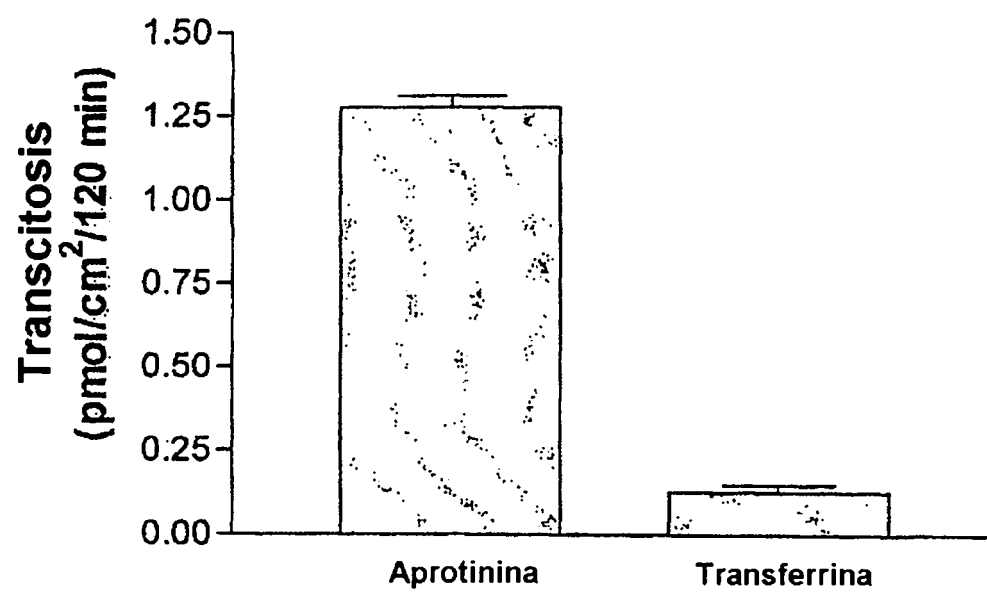


FIG. 3

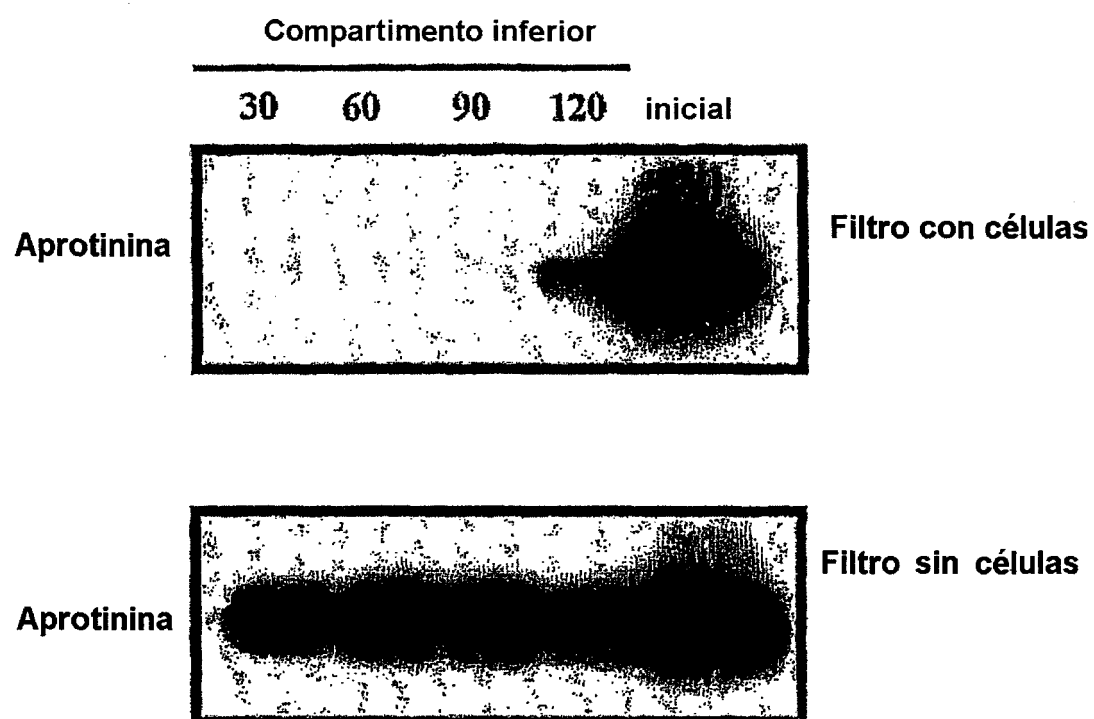


FIG. 4

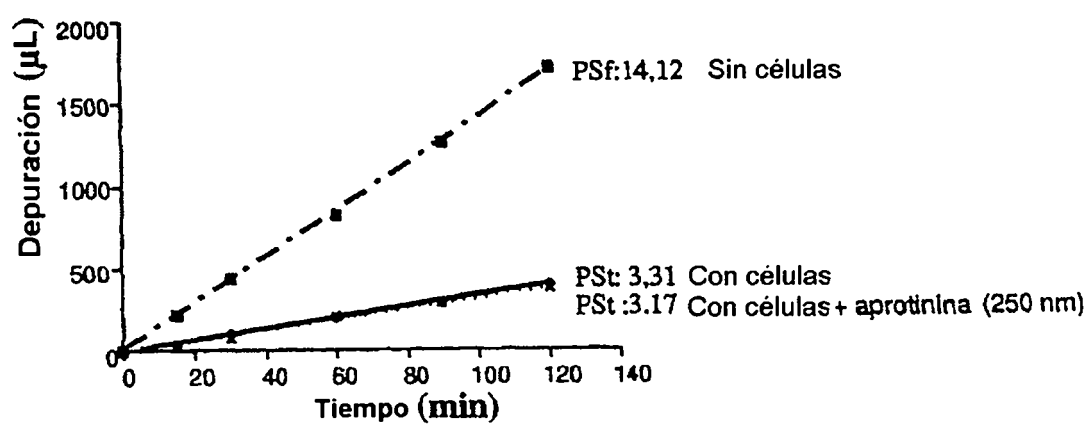


FIG. 5

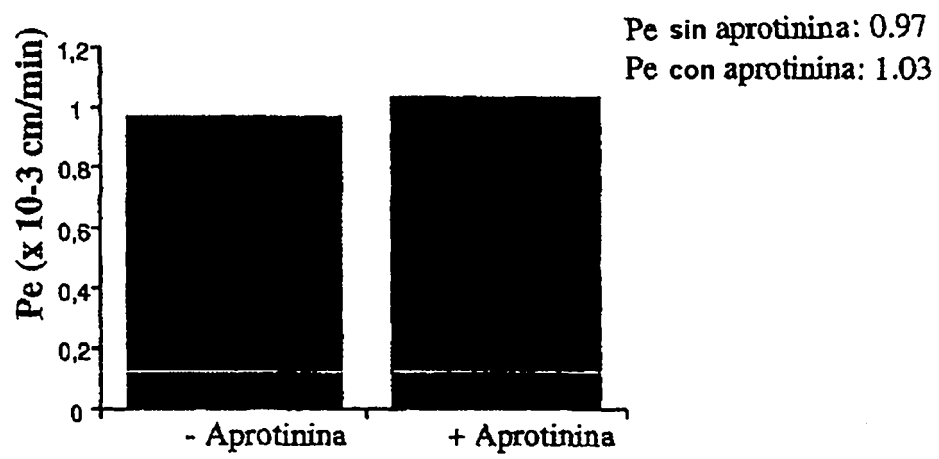


FIG. 6

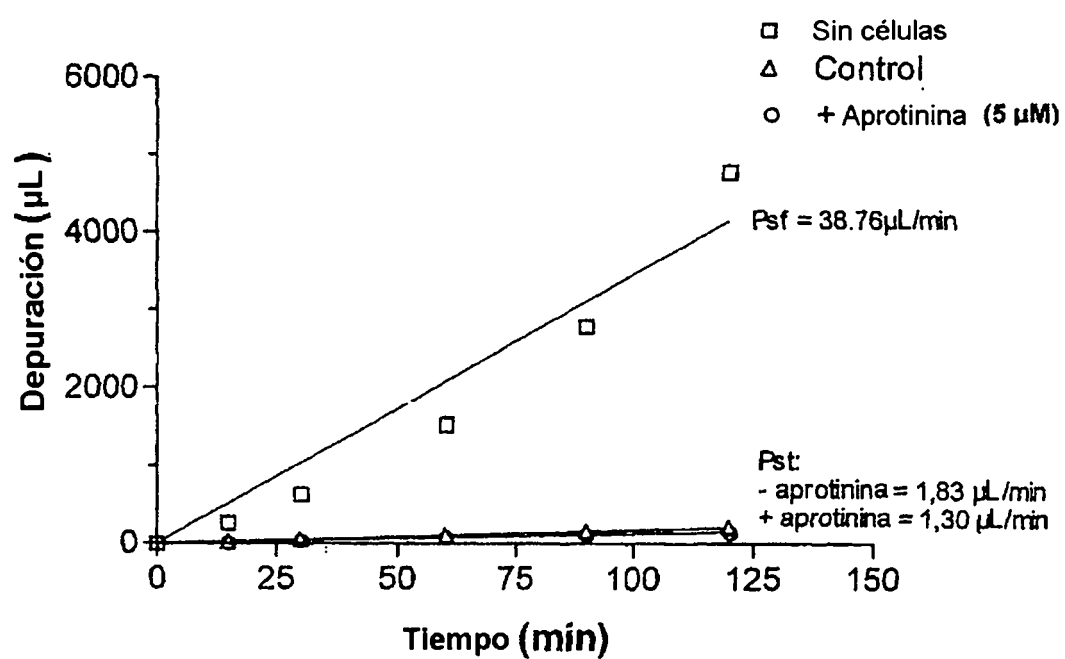


FIG. 7

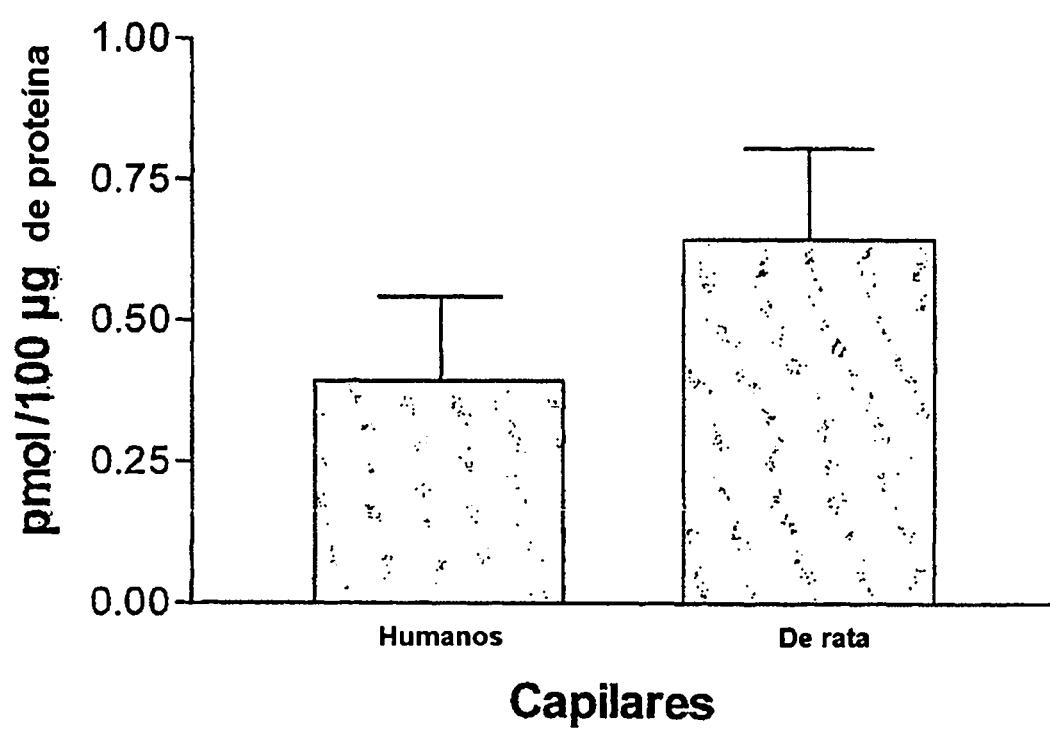


FIG. 8

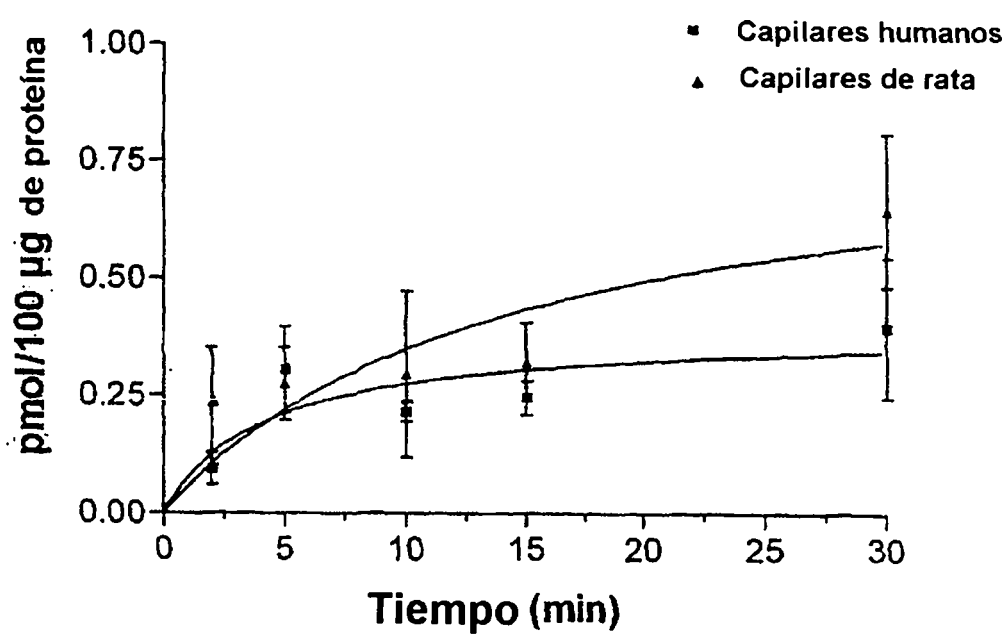


FIG. 9

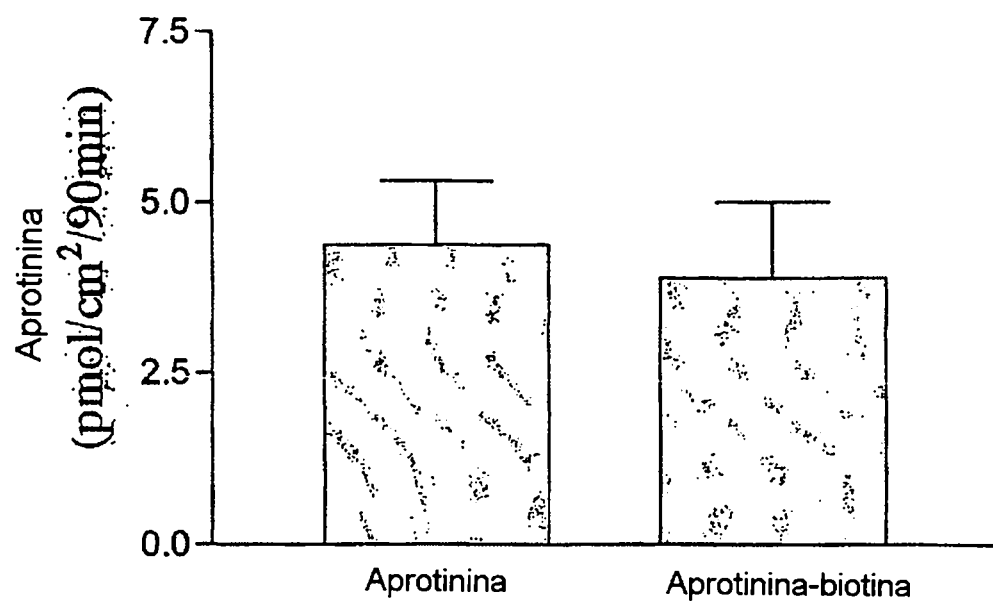


FIG. 10

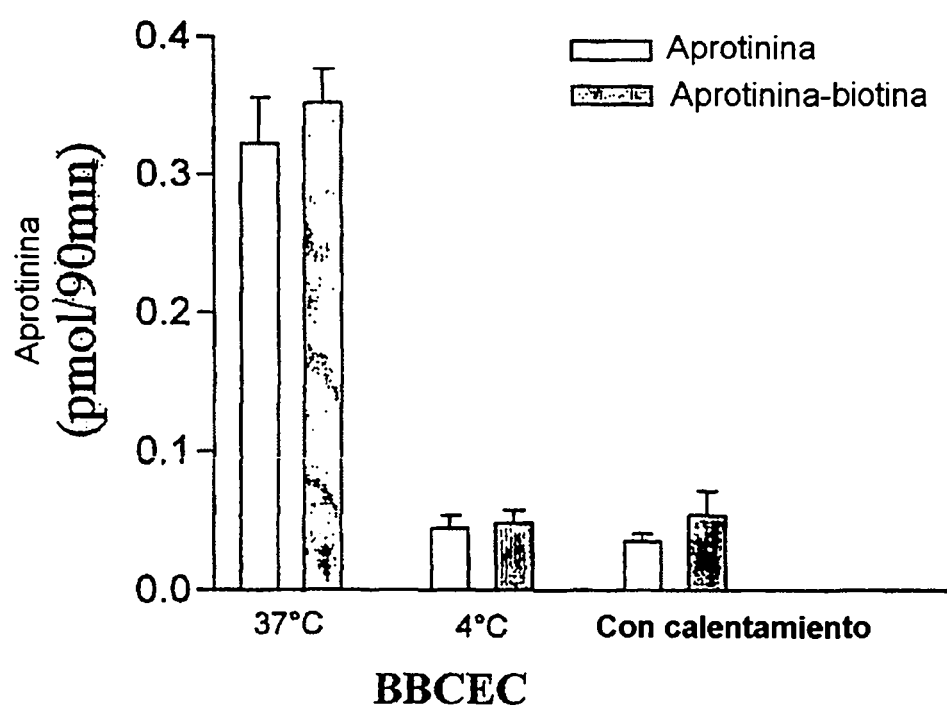


FIG. 11

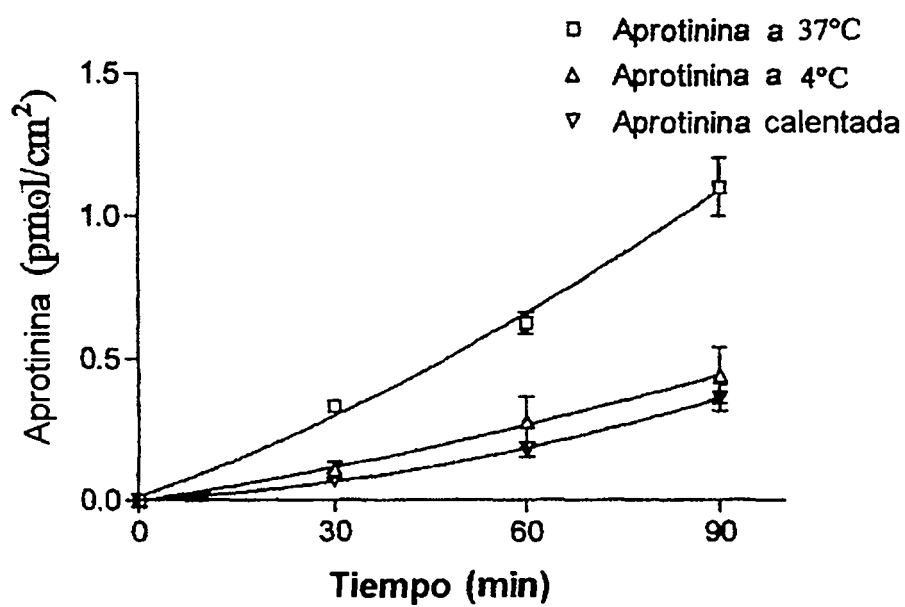


Fig. 12A

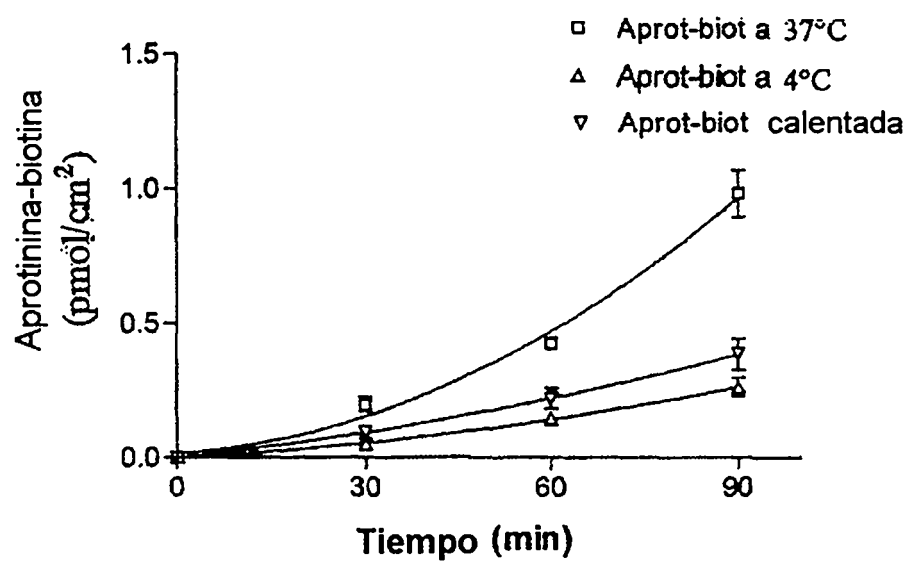


FIG. 12B

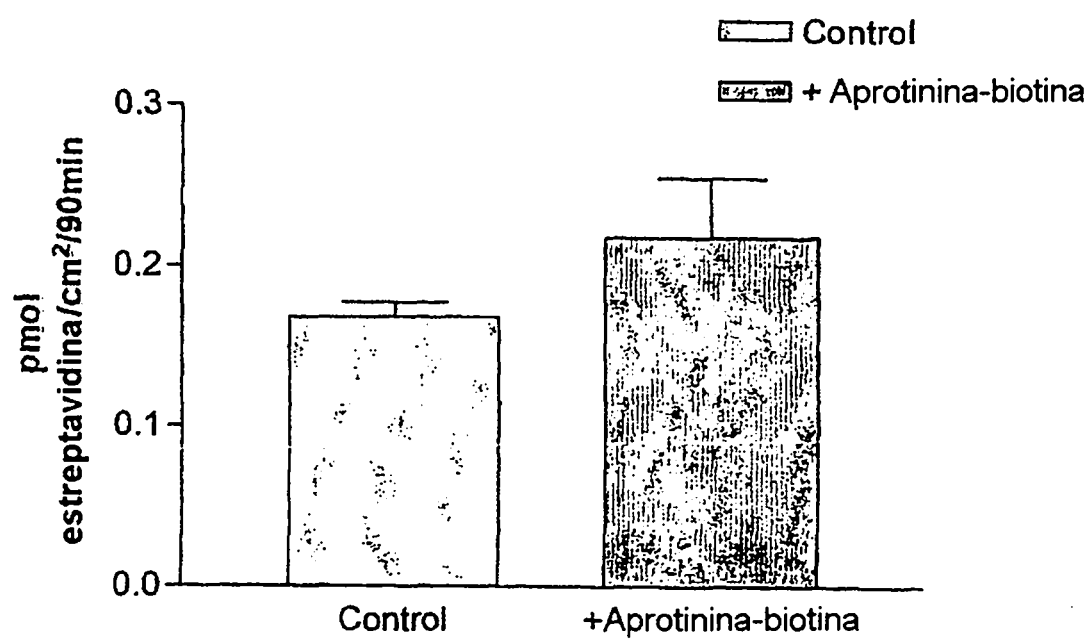


FIG. 13

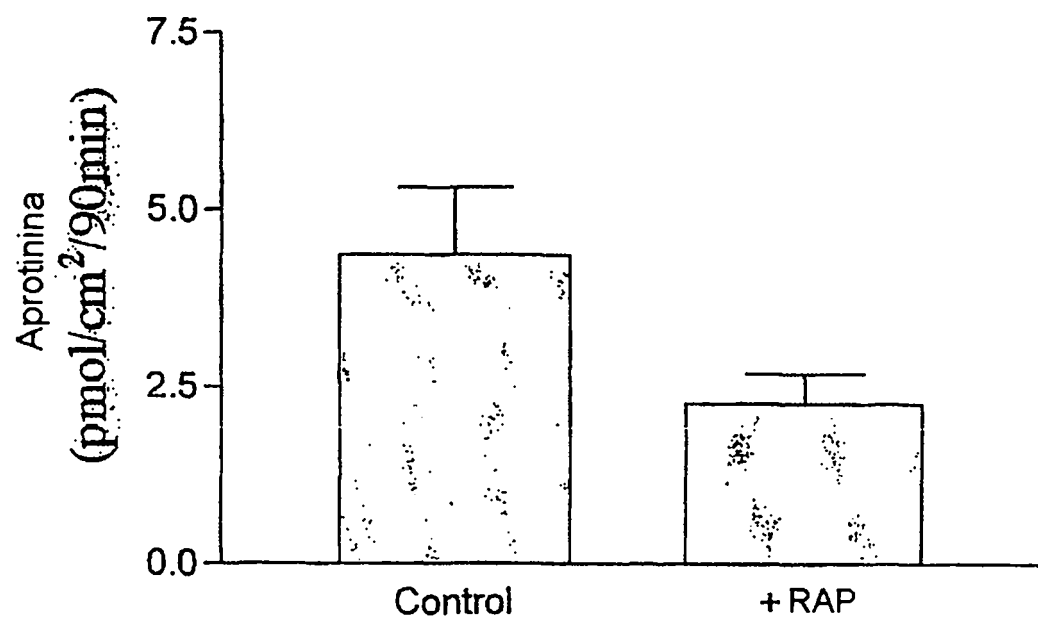
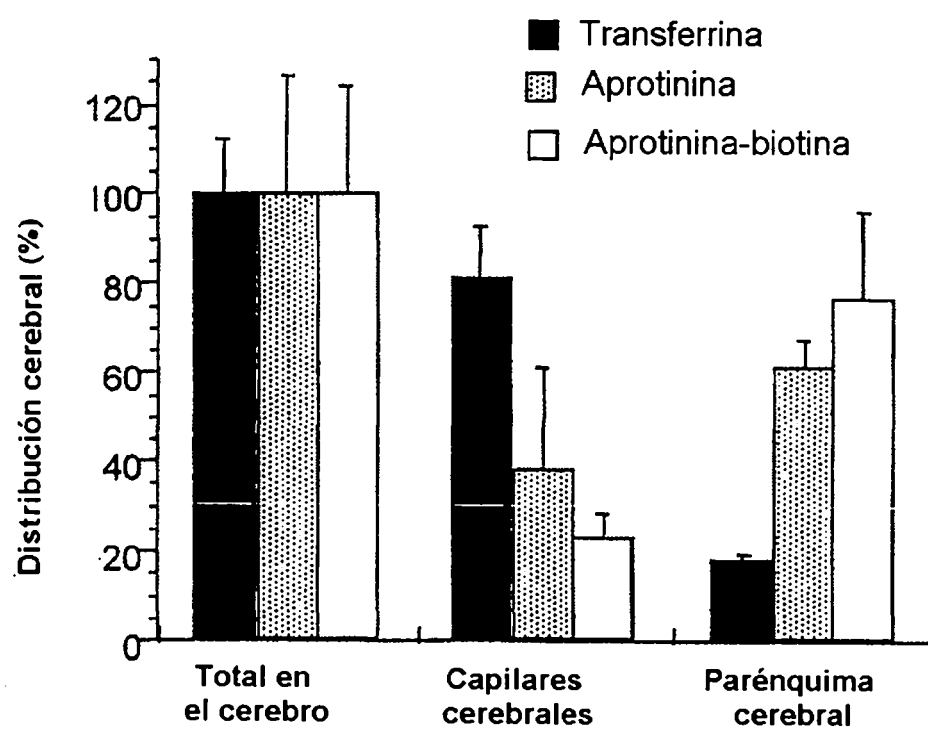


FIG. 14



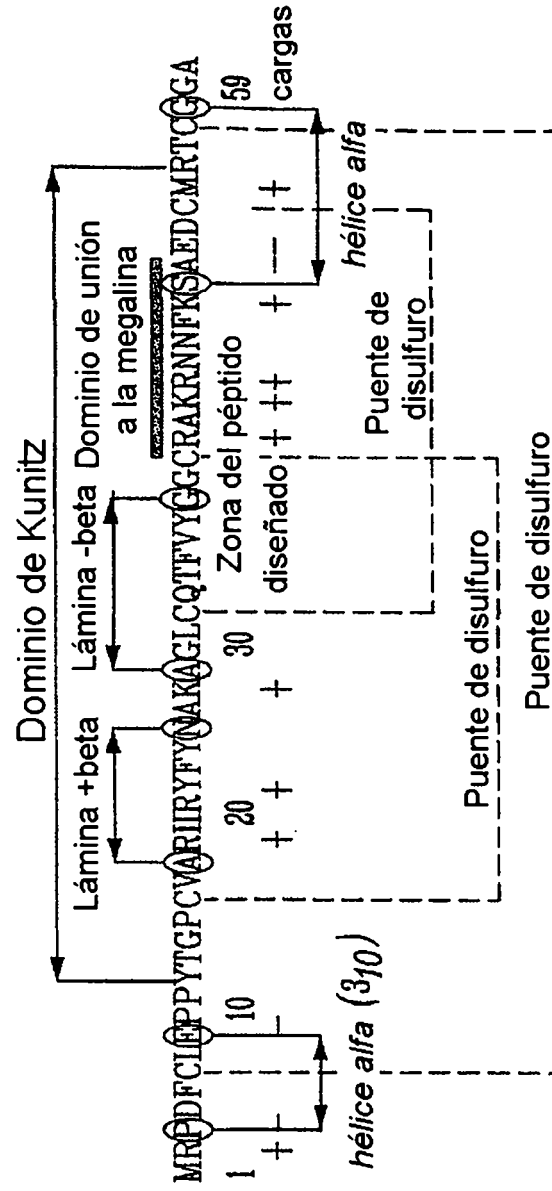
V_D de aprotinina en la parénquima cerebral = 3 $\mu\text{L}/100\text{ g}$

FIG. 15

Secuencia de aprotinina sintética (carga neta + 5)

Proteína de 59 aminoácidos, 6500 Da:

FIG. 16



- * Zona de los péptidos diseñados
- * 4 aminas nucleofílicas = 4 sitios potenciales de conjugación (residuo 1,27,42,47)
- * 6 cisteínas conectadas por puentes de disulfuro
- * 2 hélices alfa y 2 láminas beta

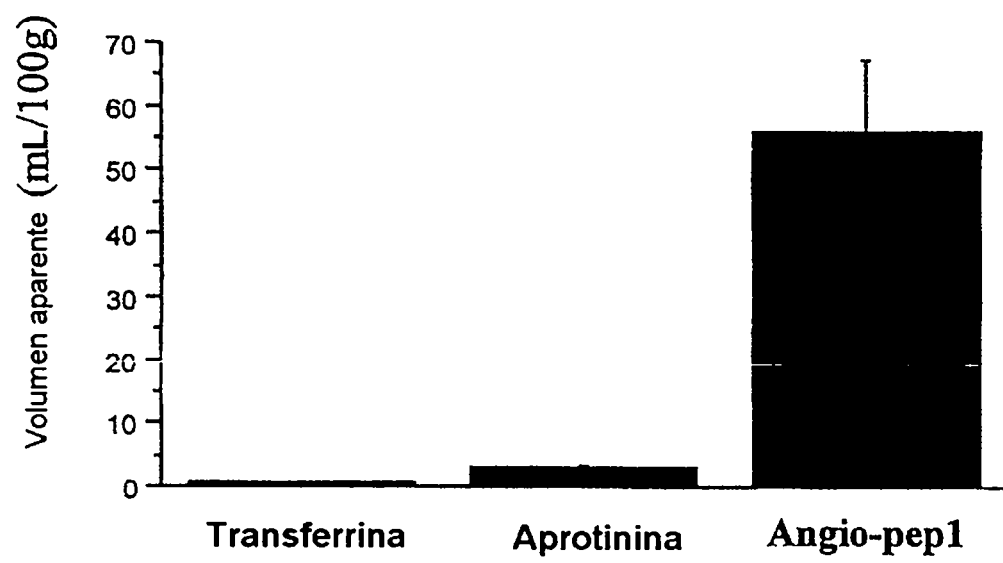


FIG. 18

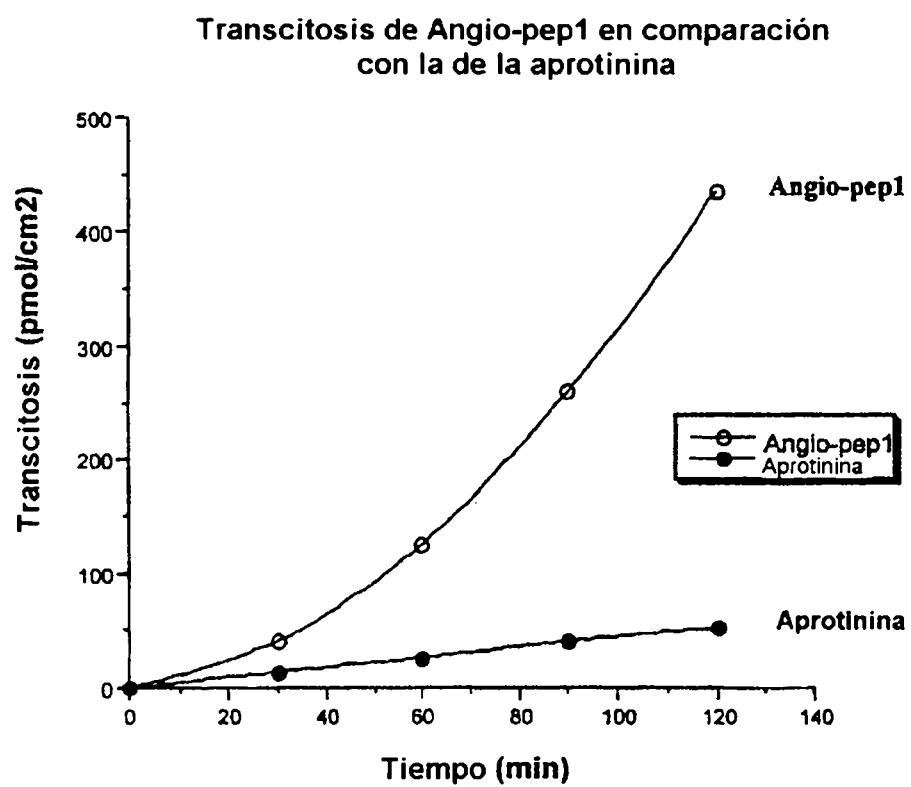


FIG. 19

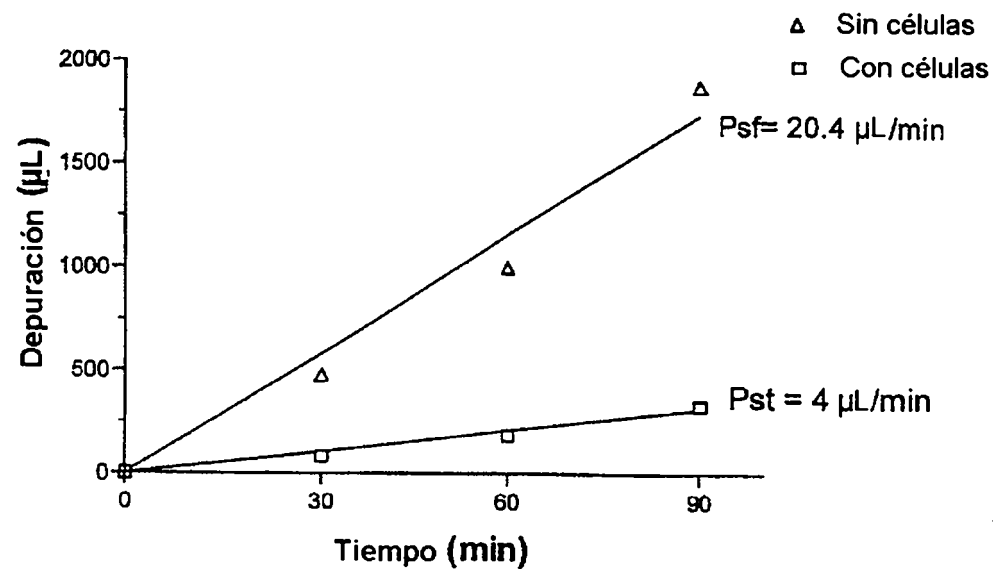


FIG. 20