

(12)

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(1) Número de publicación: 2 609 913

51 Int. CI.: *A61K 38/16* (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacior	nal:	09.05.2	2008	PCT/US2008/06	63213
87 Fecha y número de publicación internacional:	20.11	.2008	WOO	8141155	
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	09.05	.2008	E 087	'80622 (0)	
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea:	19.10	.2016	EP 2 ⁻	152293	

54 Título: Composiciones para el suministro de proteínas y métodos de uso de las mismas

30 Prioridad:	7 Titular/es:
 11.05.2007 US 928884 P 05.12.2007 US 5463 P Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 	THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA (100.0%) 986099 NEBRASKA MEDICAL CENTER OMAHA, NE 68198-6099, US (72) Inventor/es:
25.04.2017	KABANOV, ALEXANDER, V.; BRONICH, TATIANA; BATRAKOVA, ELENA y GENDELMAN, HOWARD (⁷⁴) Agente/Representante: VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para el suministro de proteínas y métodos de uso de las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el suministro de agentes terapéuticos a un paciente, particularmente en el sistema nervioso central (SNC).

10 Antecedentes de la invención

La barrera hematoencefálica (BHE) es una de las barreras más restrictivas en biología. Numerosos cooperan para crear esta barrera restrictiva. En estudios de microscopia electrónica se ha demostrado que las uniones estrechas entre las células endoteliales vasculares del cerebro y otras modificaciones de células endoteliales (por ejemplo,

- disminución de la pinocitosis, falta de menestras intracelulares) impedían la formación de un ultrafiltrado de plasma. La actividad enzimática en la BHE limita aún más la entrada de algunas sustancias, especialmente de monoaminas y algunos péptidos pequeños (Baranczyk-Kuzma y Audus (1987) J. Cereb. Blood Flow Metab., 7:801-805; Hardebo y Owman (1990) Pathophysiology of the BBB, pág. 41-55 (Johansson et al., Eds.) Elsevier, Amsterdam; Miller et al. (1994) J. Cell. Physiol., 161:333-341; Brownson et al. (1994) J. Pharmacol. Exp. Ther., 270:675-680; Brownlees y
- Williams (1993) J. Neurochem., 60:793-803). Los sistemas de flujo de salida de la barrera hematoencefálica saturables, tales como la p-glicoproteína (Pgp), también evitan la acumulación de pequeñas moléculas y sustancias solubles en lípidos (Taylor, E.M. (2002) Clin. Pharmacokinet., 41:81-92; Schinkel et al. (1996) J. Clin. Invest., 97:2517-2524). Los factores periféricos, tales como la proteína de unión/receptores solubles, degradación enzimática, aclaramiento y secuestro de los tejidos también afectan a la capacidad de una sustancia para atravesar
- Ia BHE mediante la limitación de la presentación; estos factores son especialmente importantes para las sustancias administradas de forma exógena (Banks y Kastin (1993) Proceedings of the International Symposium on Blood Binding and Drug Transfer, pág. 223-242 (Tillement et al., Eds.) Fort and Clair, Paris). H. Dou et al (BLOOD, vol. 108; 15 de octubre de 2006, páginas 2827-2835) describen el desarrollo de una plataforma de nanopartículas basada en macrófagos para la administración de fármacos antirretrovirales, Dou et al (Virology, Academic press, Orlando LIS, vol. 258, no. 1, 9 do entre de 2007) investigan los presidedes matéricais a farmacos farmacos para las describes y de construction de fármacos antirretrovirales.
- 30 Orlando US, vol. 358, no. 1, 9 de enero de 2007) investigan las propiedades morfológicas, farmacocinéticas y antirretrovirales de las nanopartículas de indinavir en macrófagos derivados de monocitos humanos.

Vinogradov et al (Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 135-147) analizan los hidrogeles catiónicos nanométricos para el suministro de fármacos y discute sus propiedades e interacción con las células. Concluyen que el sistema de suministro tiene un potencial de aumentar la biodisponibilidad oral y cerebral de los oligonucleótidos.

Harada et al (J. Controlled Release, Vol. 72, no. 1-3, p. 85-91; 14 May 2001) estudian la actividad enzimática de la lisozima en el núcleo de las micelas de complejo de poli-ion (PIC) que se formaron a partir de lisozima de clara de huevo y copolímero de bloque de poli(etilenglicol)-poli(ácido α, β-aspártico)(PEG-P(Asp)). Los resultados indican que la actividad enzimática puede controlarse cambiando el espesor de la corona de las micelas de PIC a través de una variación en la relación de mezcla de PEG-P (Asp) y lisozima.

Harada et al (J. American Chem Soc, vol. 125, no. 50, 1 de diciembre de 2003) informan además sobre la elevación de la actividad de la lisozima a través de la inclusión en las micelas de PIC que consigue la conmutación de la reactividad de la enzima que se sincroniza con la aplicación de un campo eléctrico de impulsos.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento 50 de un trastorno neurológico del sistema nervioso central en un paciente.

Más específicamente, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico del sistema nervioso central, comprendiendo dicha composición:

- a) al menos un complejo que comprende un polipéptido terapéutico y un polímero sintético, en el que dicho polímero sintético es un copolímero de bloque que comprende al menos un segmento no iónico soluble en agua y al menos un segmento de poli-ion, en el que dicho complejo se autoensambla en nanopartículas que tienen una morfología de núcleo-cubierta, en la que el núcleo comprende el polipéptido terapéutico y el segmento de poli-ion del copolímero de bloque, y en el que dicho segmento de poli-ion comprende al menos una carga
 opuesta a la carga del polipéptido terapéutico, y
 - b) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el complejo puede estar comprendido dentro de una célula aislada y la célula se puede aislar del paciente que se va a tratar. La célula aislada puede ser una célula inmune. Por ejemplo, la célula inmune se puede seleccionar del grupo que consiste en monocitos de médula ósea, monocitos, macrófagos, monocitos derivados de médula ósea, células dendríticas, linfocitos, células T, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

65

35

40

45

Breve descripción de las figuras

40

45

- La Figura 1A proporciona una presentación esquemática de una estructura de complejo de polipéptido-poli-ion (también puede denominarse nanozima). La Figura 1B es una imagen de un ensayo de retardo en gel de los complejos enzima/poli-ion en diversas muestras Z. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5 %) en condiciones no desnaturalizantes (sin SDS). Calle 1: enzima sola; calles 2-4: Complejos enzima/PEI-PEG con aumento progresivo de Z (0,5, 2, 4). Las figuras 1C-E son gráficos de los cambios en el diámetro acumulativo (Fig. 1C-E) y potencial zeta (Fig. 1C) de los complejos de catalasa-poli-ion en diversas
- 10 condiciones: Figura 1C: Z en soluciones de PBS; Figura 1D: fuerza iónica (Z = 1, pH 7,4); Figura 1E: pH (Z = 1, [NaCI] = 0,15M). La Figura 1F es una imagen TEM de complejo catalasa-poli-ion (Z = 1). La barra representa 100 nm La figura 1G es un gráfico de la actividad enzimática de catalasa en el complejo de poli-ion. La actividad de la catalasa en el complejo de poli-iones con diversas Z se determinó mediante la velocidad de descomposición de peróxido de hidrógeno. Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La significación estadística de la actividad
- del complejo catalasa-poli-ion en comparación con catalasa solo se muestra con un asterisco (*) p <0,05. (*) p<0,05. La actividad enzimática de la catalasa no se cambió durante amplia gama de copolímero de bloque, disminuyendo significativamente solo en Z = 50.
 La figura 2A es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2). Los
- números de la calle corresponden a los números de muestra en la Tabla 1. La Figura 2B es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de Hor BChE solo y complejos Hor BChE/PLL-g-PEO (2) en diversas composiciones. Los números de la calle corresponden a los números de muestra en la Tabla 2. La Figura 3 es un gráfico del diámetro de las partículas formadas en (o) Hor BChE/PLL-g-PEO (2) y (I) Hu BChE/PLL-g-PEO (2) mezclas en diversas Z +/-. La concentración de BChE era 0,15 mg/ml, 23 °C, tampón
- fosfato 10 mM, pH 7,4.
 La Figura 4A es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de Hor BChE solo (A) y el complejo Hor BChE/PLL-g-PEO (7) (B) (Z_{+/}= 10,3) a varias diluciones. La concentración inicial de Hor BChE fue 0,167 mg/ml. La Figura 4B es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de Hu BChE solo (A); complejos Hu BChE/PLL-g-PEO(2) no reticulados (B) (Z_{+/}= 1.2); y complejos Hu BChE/PLL-g-PEO(2) reticulados (C) (Z_{+/}= 1,2; 85 % de relación de reticulación), a varias diluciones (1:1000, 1:5000, y 1:250). La concentración inicial de Hu BChE
 fue 0.15 mg/ml.
- Las Figuras 5A-5C proporcionan imágenes de ensayos de electroforesis en gel de Hu BChE solo (calle A); complejos Hu BChE/ PLL-g-PEO(2) no reticulados (calle B) (Z_{+/-}= 1,2); y complejos Hu BChE/ PLL-g-PEO(2) reticulados (calle C) (Z_{+/-}= 1,2) a varias diluciones: 1000, 500 y 250. La relación de reticulación fue de 85 %, 40 % y 20 % en las Figuras 5A, 5B, y 5C, respectivamente. La concentración final de Hu BChE fue 0,15 mg/ml.
- 35 La Figura 6 es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2) reticulados de (Z +/- = 1,2) de diversas relaciones de reticulación, a una dilución de 500 veces. La concentración final de Hu BChE fue 0,15 mg/ml.

La Figura 7 proporciona imágenes de ratones a los que se ha inyectado por vía intravenosa un complejo de CuZnSOD-poli-ion. Usando un sistema de imágenes IVIS 200, se detectó fluorescencia Alexa 680 en ratones en diversos intervalos de tiempo después de la inyección intravenosa (vena de la cola) del complejo de CuZnSOD-poli-ion marcado con Alexa 680.

Las figuras 8A y 8B proporcionan imágenes de los ensayos de electroforesis en gel de complejos de Hu BChE/PLL-b-PEO y complejos de Hor BChE/PLL-b-PEO, respectivamente. Los números de las calles corresponden a los números de muestra proporcionados en la Tabla 9. La concentración de Hu BChE y Hor BChE era 0,15 mg/ml.

Las figuras 9A y 9B es una imagen de un ensayo de electroforesis en gel de complejos Hu BChE/PLL-b-PEO y Hor BChE/PLL-b-PEO reticulados en Z +/- = 1,0 o en Z +/- = 2,0, respectivamente, con una relación de reticulación 40 %. La calle A es Hu BChE solo; la calle B es el complejo Hu BChE/PLL-b-PEO no reticulado; la calle C es el complejo Hu BChE/PLL-b-PEO reticulado; la calle D es Hor BChE solo; la calle E es el complejo Hor BChE/PLL-b-PEO no reticulado; y la calle F es el complejo Hor BChE/PLL-b-PEO reticulado. La concentración

BChE/PLL-b-PEO no reticulado; y la calle F es el complejo Hor BChE/PLL-b-PEO reticulado. La concentración final de BChE fue 0,0003 mg/ml.
 La Figura 10 es un gráfico de la citotoxicidad del complejo de polipéptido-poli-ion (Z = 1) o las concentraciones correspondientes de PEI-PEG en BMM. Las células se incubaron durante 24 horas con varias concentraciones de complejo de polipéptido-poli-ion o el copolímero de bloques, se lavaron, y se incubaron en medio fresco

- durante 48 horas a 37 °C. La supervivencia celular se determinó mediante ensayo de sulforodamina-B (SRB). Se midió la absorbancia a 490 nm en lector Microkinetics BT2000 y los valores obtenidos se expresaron como un porcentaje de los valores obtenidos para las células de control a las que no se añadieron los complejos de polipéptido-poli-ion. Todas las mediciones se repitieron ocho veces. No se observaron efectos citotóxicos de catalasa solo o del complejo poli-ion de catalasa y PEI-PEG en BMM.
- 60 La Figura 11A es un gráfico de la cinética de la acumulación de catalasa "desnuda" y el complejo de catalasa-poli-ion (Z = 1) en monocitos. Las células se trataron con el complejo de enzima o enzima-poli-ion marcado con Alexa Fluor 594 en diversos puntos temporales. Después de la incubación, se recogió el contenido celular, y la cantidad de fluorescencia se midió mediante un espectrofotómetro de fluorescencia (λ_{ex} = 580 nm, λ_{em} = 617 nm). Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La Figura 11B es un gráfico de barras que representa la acumulación de complejos de catalasa-poli-ion en BMM en varios Z. La Figura 11C proporciona una imagen de la
- 65 acumulación de complejos de catalasa-poli-ion en BMM en varios Z. La Figura 11C proporciona una imagen de la localización intracelular del complejo de catalasa-poli-ion marcado con RITC en BMM. Las células cultivadas

sobre cubreobjetos se cargaron con el complejo catalasa/PEI-PEG (Z = 1) durante 24 horas. Después de la incubación, las células se fijaron y tiñeron con faloidina Oregon Green 488 específica de F-actina y una tinción nuclear, ToPro-3. Las imágenes se obtuvieron mediante un sistema de microscopia de fluorescencia confocal ACAS-570.

- 5 La figura 12A es un gráfico del perfil de liberación de complejo catalasa-poli-ion de BMM. Se cargaron las células con el complejo de catalasa/PEI-PEG (Z = 1) durante 1 hora, se lavaron con PBS, y se incubaron con los medios sin catalasa para diversos intervalos de tiempo. La cantidad de catalasa liberada al medio y retenida en las células se representó mediante espectrofotometría fluorescente. Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La Figura 12B es un gráfico de la liberación desencadenada de la catalasa de BMM en los medios. Los BMM
- 10 maduros se pre-cargaron con el complejo de catalasa-poli-ion marcado con Alexa Fluir 594 (Z = 1) durante 1 hora, se lavaron con PBS, y después se incubaron medios sin catalasa con o sin miristato acetato de forbol (PMA) 10 μM para diversos intervalos de tiempo. La cantidad de catalasa liberada en el medio se representó mediante espectrofotometría fluorescente. Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La adición de PMA al medio de incubación dio como resultado el aumento de la liberación de enzimas en los medios en aproximadamente un 50 %.
- Las figuras 13A y 13B son gráficos que representan la conservación de la actividad enzimática de catalasa contra la degradación en BMM. En la Figura 13A, catalasa "desnudo" o complejo catalasa-poli-ion (Z = 1) se cargaron en BMM y las células se lavaron y se incubaron con medios sin catalasa para diversos intervalos de tiempo. La actividad de la catalasa liberada de los BMM se determinó mediante espectrofotometría. En la Figura
- 13B, los complejos de catalasa-poli-ion con diversas composiciones (Z) se cargaron en las células y se incubaron en medio libre de catalasa durante 2 horas. A continuación, se recogió el medio y se evaluó la actividad de catalasa por espectrofotometría. Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La significación estadística de la actividad del complejo catalasa-poli-ion en comparación con catalasa solo se muestra con asteriscos (*) p <0,05, (**) p <0,005.</p>
- 25 La figura 14A es un esquema para la modulación de ROS derivados de microglía mediante el complejo catalasapoli-ion liberado de BMM. El copolímero de bloque (2 mg/ml; Figura 14C) o catalasa "desnuda" o complejo de catalasa-poli-ion (Z = 1) (Figuras 14B y 14D) se cargaron en BMM. Luego, las células se lavaron y se incubaron en tampón de Ringer de Kreb durante 2 horas. En paralelo, las células microgliales murinas se estimularon con 200 ng/ml de TNF-α (48 horas) (Figs. 14B y 14C) o 0,5 µM de N-α-syn (Fig. 14RE). A continuación, los
- sobrenadantes recogidos de BMM con la enzima liberada se complementaron con soluciones Amplex Red y HRP y se añadieron a las células microgliales activadas. La microglía de control activada se incubó con medio fresco (Fig. 14B) o 0,5 μM de N-α-syn agregada (Fig. 14RE). La cantidad de H₂O₂ producida por las células microgliales y descompuesta por la catalasa liberada de BMM se detectó mediante fluorescencia. Los datos representan la media ± SEM (n = 6). La significación estadística de la cantidad de H₂O₂ descompuesto por liberado del complejo catalasa-poli-jon o catalasa de BMM, en comparación con microglía activada (control) se muestra por asteriscos
- catalasa-poli-ion o catalasa de BMM, en comparación con microglía activada (control) se muestra por asteriscos (*) p <0,05, (**) p <0,005.
 La Figura 15 es un gráfico de la biodistribución del complejo de catalasa-poli-ion marcado con ¹²⁵I en ratones tratados con MPTP. Se inyectó a los ratones BMM (10 x 10⁶ células/ratón) cargados con complejo de catalasa-
- poli-ion (Z = 1, 50 μCi/ratón) o con el complejo de catalasa-poli-ion solo (grupo de control). Veinticuatro horas
 más tarde se sacrificó a los ratones y se midió la cantidad de radiactividad en diversos órganos. Los datos representan la media ± SEM (n = 4). La significación estadística del transporte del complejo de catalasa-poli-ion cargado con BMM en comparación con el complejo de catalasa-poli-ion solo se muestra por asteriscos: (**) p <0,005.

La Figura 16 proporciona imágenes de la biodistribución en el tiempo del complejo de polipéptido-poli-ion marcado con Alexa 680 cargado en BMM y se inyectó por vía intravenosa a ratones intoxicados con MPTP.

La Figura 17 es un gráfico que demuestra neuroprotección contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP mediante la administración de BMM, que comprende un complejo de polipéptido-poli-ion cargado con catalasa. Se observó una disminución significativa de los niveles de NAA en los ratones de control con un ligero aumento en los ratones tratados con el complejo de catalasa-poli-ion/BMM (n = 4).

45

50 La Figura 18 es un gráfico que demuestra que el complejo CuZnSOD-poli-ion administrado periféricamente inhibe el aumento de la presión arterial mediado por ICV AngII. Se midió el cambio máximo en la presión arterial media (PAM) tras la Ang II inyectada con ICV 0, 1, 2 y 5 días después de la administración intra-carótida de CuZnSOD libre o el complejo CuZnSOD-poli-ion.

La Figura 19 es un gráfico que representa la neuroprotección contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP con BMM cargados con un complejo de poli-iones catalasa.

- La Figura 20 es una imagen de un ensayo de retardo en gel de los complejos de catalasa/poli-ion con diversos agentes de reticulación usados. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS). Calles: 1- marcadores de peso molecular; 2- catalasa sola; y complejos poliiónicos unidos a 3-EDC; 4-GA; 5-BS3.
- 60 La Figura 21 es una imagen de un ensayo de retardo en gel de los complejos de SOD/poliiónicos para diversos enlazadores utilizados. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) en condiciones desnaturalizantes (con SDS). Calles: 1- marcadores de peso molecular; 2-SOD solo; 3- complejo de poli-ion no unido; y complejos poliiónicos unidos a 4-EDC; 5-GA; 6-BS3.
- La Figura 22A es una imagen de un ensayo de retardo en gel de los complejos de catalasa/SOD/poli-ion para diversos enlazadores utilizados. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS). Calles: 1- complejo no unido; complejos poliiónicos unidos a 2-

GA; 3-EDC; 4-BS3; y 5-EDC-S-NHS. La visualización se realizó con anticuerpo frente a la catalasa. La Figura 22B es una imagen de un ensayo de retardo en gel de los complejos de catalasa/SOD /poli-ion para diversos enlazadores utilizados. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) en condiciones desnaturalizantes (con SDS). Calles: 1- complejo no unido; complejos poliiónicos unidos a 2-GA; 3-EDC; 4-BS3; y 5-EDC-S-NHS. La visualización se realizó con anticuerpo frente a SOD.

5 La Figura 23 proporciona imágenes de la biodistribución de BMM marcados con Li-COR cargados con el complejo poli-ion catalasa. Los BMM se aislaron de ratones BALB/C, se cultivaron hasta la maduración (12 días) marcados con Li-COR, y se cargaron durante 2 horas con el complejo de catalasa poli-ion. Los BMM cargados se inyectaron i.v. en ratones BALB/C (50 millones/ratón) afeitados mantenidos con una dieta líquida durante 24 10 horas.

Descripción detallada de la invención

- De acuerdo con la presente invención, las composiciones se proporcionan para el suministro específico de sitio v/o 15 sostenido de una proteína/polipéptido de interés. Más específicamente, las composiciones comprenden un complejo de poli-ion del polipéptido de interés con un polímero sintético que tiene una carga neta opuesta a la carga neta de la proteína de interés.
- En una realización preferida de la presente invención, los polímeros sintéticos de los complejos son copolímeros de 20 bloque. Más específicamente, los polímeros sintéticos son copolímeros de bloque que comprenden al menos un segmento de poli-ion y al menos un segmento de polímero soluble en agua no iónico. Los copolímeros de bloque se definen más simplemente como conjugados de al menos dos segmentos de polímero diferentes (Tirrel, M. En: Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins. Goddard E.D. and Ananthapadmanabhan, K.P. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Londres, Tokio, pág. 59-122, 1992). La arguitectura más simple del copolímero de
- 25 bloque contiene dos segmentos unidos en sus extremos para dar un dibloque de tipo A-B. La consiguiente conjugación de más de dos segmentos por sus extremos da un tribloque de tipo A-B-A, un multibloque de tipo A-B-A-B, o incluso arguitecturas d multisegmento A-B-C. Si una cadena principal en el copolímero de blogue se puede definir en la que una o varias unidades de repetición están unidas a diferentes segmentos de polímero, el copolímero tiene una arquitectura de injerto de, por ejemplo, un tipo A(B)n. Las arquitecturas más complejas incluyen, por
- 30 ejemplo, bloques en estrella (AB)n o AnBm que tienen más de dos segmentos de polímero unidos a un solo centro. Un copolímero de bloque de ejemplo de la presente invención tendría la fórmula A-B o B-A, en la que A es un segmento de poli-ion y B es un segmento de polímero soluble en agua no iónico. Los segmentos del copolímero de bloque pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 1.000 unidades o monómeros que se repiten.
- 35 El tamaño preferido de los complejos es de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 500 nm, más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 250 nm, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 nm, todavía más preferible entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 140 nm, y aún más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 nm. Los complejos no se agregan y se mantengan dentro del intervalo de tamaño preferido durante al menos 1 hora después
- 40 de la dispersión en la solución acuosa a pH y fuerza iónica fisiológicos, por ejemplo en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Los tamaños pueden medirse como los diámetros eficaces mediante dispersión de luz dinámica (véase, por ejemplo, Batrakova et al. (2007). Bioconjugate Chem, 18: 1498-1506). Se prefiere que, después de la dispersión en solución acuosa, los complejos permanezcan estables, es decir, no se agregan y/o precipiten durante al menos 2 horas, preferentemente durante 12 horas, todavía más preferentemente durante 24 horas. 45
 - El segmento de poli-ion del copolímero de blogue tiene una carga neta que es opuesta a la proteína de interés. Por ejemplo, si la proteína de interés tiene una carga neta negativa, entonces el segmento de poli-iones tendrá una carga neta positiva, al pH pertinente. El segmento de poli-ion puede ser un policatión (es decir, un polímero que tiene una carga neta positiva a un pH específico) o un polianión (es decir, un polímero que tiene una carga negativa
- neta a un pH específico). En una realización particular, el segmento de poli-ion tiene al menos tres cargas, 50 preferentemente al menos 10 cargos, y más preferentemente al menos 15 cargos. En una realización preferida, las cargas están espaciados cerca uno del otro. De hecho, sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que cuando la distancia entre las cargas de polielectrolitos es menor que un cierto valor crítico, los pequeños contraiones presentes en solución se puede condensar sobre una cadena de tales polielectrolito. Por ejemplo, la "longitud Bjerrum" en
- 55 solución acuosa de polielectrolitos es de aproximadamente 7 angstrom (ver Manning (1980) Biopolímeros, 19: 37-59). Tales iones de signo contrario pueden liberar en la solución externa durante la reacción de un polielectrolito con una poli-ion de carga opuesta y por lo tanto puede proporcionar una "fuerza motriz" para las formaciones de complejos de polielectrolitos (Kabanov et al. (2002) Estructura, estabilidad de la dispersión y la dinámica de complejos de ADN y policatión. En Perspectivas farmacéuticas de la terapéutica a base de ácido nucleico (S. W. Kim, R. Mahato, Eds.) Taylor & Francis, Londres, Nueva York, pp. 164-189). 60

El grado de polimerización de los segmentos de poli-iones es normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100.000. Más preferentemente, el grado de polimerización está entre alrededor de 20 y alrededor de 10.000, aún más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1.000, y aún todavía más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200. Independientemente del segmento de poli-ion,

65 el grado de polimerización del segmento de polímero soluble en agua no iónico es aproximadamente 10 y

aproximadamente 100.000. Más preferentemente, el grado de polimerización está entre alrededor de 20 y alrededor de 10.000, aún más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1.000, y aún todavía más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200.

- 5 El segmento de poli-ion abarca segmentos de policatión y segmentos de polianión. Ejemplos de segmentos de policatión incluyen, pero no se limitan a, polímeros y copolímeros y sus sales, que comprenden unidades que derivan de uno o más monómeros que incluyen, sin limitación, aminas primarias, secundarias y/o terciarias, cada una de los cuales puede estar cuaternizada parcial o completamente, formando de ese modo sales de amonio cuaternario. Ejemplos de estos monómeros incluyen aminoácidos catiónicos (por ejemplo, lisina, arginina, histidina,
- 10 ornitina y similares), alquileniminas (por ejemplo, etilenimina, propilenimina, butilenimina, pentilenimina, hexilenimina, espermina, y similares), monómeros de vinilo (por ejemplo, vinilcaprolactama, vinilpiridina, y similares), acrilatos y metacrilatos (por ejemplo, acrilato de N, N-dimetilaminoetilo, metacrilato de N, N-dietilaminoetilo, metacrilato de N, N-dietilaminoetilo, metacrilato de N, N-dietilaminoetilo, metacrilato de t-butilaminoetilo, haluro de acriloxietildimetilbencilamonio, haluro de metacrilamidopropiltrimetiamonio y similares), monómeros de alilo (por ejemplo, cloruro de dimetildialilamonio), ionenos alifáticos, heterocíclicos o
- aromáticos.

Los policationes y segmentos de policationes pueden producirse por polimerización de monómeros que en sí mismos pueden no ser catiónicos, tales como, por ejemplo, 4-vinilpiridina y, a continuación, se convierten en una forma de policatión mediante diversas reacciones químicas de las unidades monoméricas, por ejemplo alquilación, que da como resultado la aparición de grupos ionizables. La conversión de las unidades monoméricas puede ser incompleta, lo que da como resultado un copolímero que tiene una parte de las unidades que no tienen grupos ionizables, tales como, por ejemplo, un copolímero de vinilpiridina y haluro de N-alquilvinilpiridinio.

- 25 Los segmentos de policatión pueden ser un copolímero que contiene más de un tipo de unidades monoméricas que incluyen una combinación de unidades catiónicas con al menos otro tipo de unidad que incluye, por ejemplo, unidades catiónicas, unidades aniónicas, unidades zwiteriónicas, unidades no iónicas hidrófilas y/o unidades hidrófobas. Tales segmentos de policatión se pueden obtener por copolimerización de más de un tipo de monómeros químicamente diferentes. Cuando se emplea un copolímero de este tipo, los grupos cargados se deben
- 30 espaciar lo suficientemente cerca de manera que, cuando se hacen reaccionar con los otros componentes, se forma un complejo. En una realización preferida, la parte de las unidades no catiónicas es relativamente baja, de manera que el polímero o bloque de polímero permanece en gran parte de naturaleza catiónica. El polímero que contiene el policatión puede ser una mezcla de dos o más polímeros de diferentes estructuras, tales como polímeros que contienen diferentes grados de polimerización, estructuras de cadena principal, y/o grupos funcionales.
- 35

60

Ejemplos de segmentos de polianiones incluyen, pero no se limitan a, polímeros y sus sales que comprenden unidades que derivan de uno o más monómeros que incluyen: ácidos monocarboxílicos etilénicos insaturados, ácidos dicarboxílicos etilénicos insaturados, monómeros etilénicos que comprenden un grupo ácido sulfónico, sus sales de metales alcalinos y de amonio. Ejemplos de estos monómeros incluyen ácido acrílico, ácido metacrílico,

- 40 ácido aspártico, ácido alfa-acrilamidometilpropanosulfónico, ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido citrazínico, ácido citracónico, ácido trans-cinámico, ácido 4-hidroxi-cinámico, ácido trans-glutacónico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido fumárico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido maleico, ácidos nucleicos, ácido trans-beta-hidromucónico, ácido trans-trans-mucónico, ácido oleico, ácido 1,4-fenilendiacrílico, ácido fosfato 2-propeno-1-sulfónico, ácido ricinoleico, ácido 4-estireno sulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido 2-sulfoetilmetacrilato,
- 45 ácido trans-traumático, ácido vinilsulfónico, ácido vinilbencenosulfónico, ácido fosfórico de vinilo, ácido vinilbenzoico y ácido vinilglicólico y similares, así como dextrano carboxilado, dextrano sulfonatado, heparina y similares. Los ejemplos de polianiones incluyen, pero no se limitan a, ácido polimaleico, poliaminoácidos (por ejemplo, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, y sus copolímeros), ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, y similares.
- 50 Los polianiones y segmentos de polianiones pueden producirse por polimerización de monómeros que en sí mismos pueden no ser aniónicos o hidrófilos, tales como, por ejemplo, metacrilato de terc-butilo o anhídrido citracónico y, a continuación, convertirse una forma de polianión mediante diversas reacciones químicas de las unidades monoméricas, por ejemplo hidrólisis, lo que da como resultado grupos ionizables. La conversión de las unidades monoméricas puede ser incompleta, que da como resultado un copolímero que tiene una parte de las unidades que por tionero que tiene una parte de las unidades que ser incompleta, que da como resultado un copolímero que tiene una parte de las unidades que por tionero de motoriticos.
- 55 no tienen grupos ionizables, tales como, por ejemplo, un copolímero de metacrilato de terc-butilo y ácido metacrílico.

El segmento de polianión puede ser un copolímero que contiene más de un tipo de unidades monoméricas que incluyen una combinación de unidades aniónicas con al menos otro tipo de unidades, incluyendo unidades aniónicas, unidades catiónicas, unidades zwiteriónicas, unidades no iónicas hidrófilas y/o unidades hidrófobas. Tales polianiones y segmentos de polianiones se pueden obtener por copolimerización de más de un tipo de monómeros

químicamente diferentes. Cuando se emplea un copolímero de este tipo, los grupos cargados se deben espaciar lo suficientemente cerca de manera que, cuando se hacen reaccionar con los otros componentes, se forma un complejo. En una realización preferida, la parte de las unidades no aniónicas es relativamente baja, de manera que polímero o bloque de polímero permanece en gran parte aniónico y de naturaleza hidrófila. El polímero que contiene 65 polianión puede ser una mezcla de dos o más polímeros de diferentes estructuras, tales como polímeros que contienen diferentes grados de polimerización, estructuras de cadena principal, y/o grupos funcionales.

En una realización preferida, el segmento de poli-ion es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polímeros o copolímeros de lisina, histidina, arginina, ornitina, ácido aspártico y/o ácido glutámico, y sus sales. Ejemplos de tales poli-iones sintéticos incluyen polilisina, polihistidina, poliarginina, poliornitina, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, y sus sales. En otra realización preferida, el segmento de poli-ion se selecciona del grupo que consiste en ácido poliacrílico, ácido acrílico de polialquileno, polialquilenimina, polietilenimina, polifosfatos, y sus sales.

El segmento de polímero soluble en agua no iónico se puede seleccionar del grupo que consiste en óxido de polietileno, un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno, un polisacárido, una poliacrilamida, un poligicerol, un alcohol polivinílico, una polivinilpirrolidona, un N-óxido de polivinilpiridina, un copolímero de N-óxido de vinilpiridina y vinilpiridina, una polioxazolina, y una poliacroilmorfolina, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los segmentos de polímeros no iónicos son no tóxicos y no inmunogénicos. En una realización particular, los polímeros solubles en agua son poli(óxido de etileno) (PEO); poli(etilenglicol) (PEG); o un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno. Si el segmento de polímero soluble en agua no iónico es poli(óxido de

- etileno), la masa molecular preferida de tal polímero está entre aproximadamente 300 y aproximadamente 20.000, más preferentemente entre aproximadamente 1.500 y aproximadamente 15.000, aún más preferible entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000, y todavía más preferido de aproximadamente 4.000 y aproximadamente 10.000.
- 20

5

El segmento de poli-ion y el segmento de polímero soluble en agua no iónico pueden contener diferentes grupos terminales. Por ejemplo, el método de síntesis puede conducir a la inclusión de diferentes grupos terminales.

Los complejos de la presente invención se autoensamblan de forma espontánea en partículas de tamaño de nanoescala. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se cree que las partículas formadas tienen una morfología de núcleo-cubierta. El núcleo de las partículas comprende el complejo proteína-poli-ion y la cubierta hidrófila comprende el segmento no iónico soluble en agua del copolímero. De hecho, neutralización de las cargas de poli-iones conduce a la formación de dominios hidrófobos, que tienden a segregarse en medios acuosos. Sin embargo, los segmentos no iónicos solubles en agua previenen la agregación y separación de fases macroscópicas. Como resultado, estos complejos se autoensamblan en partículas de tamaño de nanoescala y forman dispersiones acuosas estables.

Para construir un nanorrecipiente protector para un polipéptido o proteína de interés, se sintetizan copolímeros de bloque por conjugación de un segmento de poli-ion (por ejemplo, polietilenimina (PEI, 2.000 Da)) and un segmento no iónico soluble en agua (por ejemplo, poli (óxido de etileno) (PEO, 10.000 Da) (Vinogradov et al. (1999) Bioconjug. Chem., 10:851-60). Los complejos pueden formarse mediante la adición de una solución de la proteína de interés (por ejemplo, catalasa (1 mg/ml)) a una solución de un copolímero de bloque (por ejemplo, PEI-PEG (2 mg/ml)) en un tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4)) que produce dispersiones ligeramente opalescentes.

40

Las partículas se pueden administrar a una célula del cuerpo en la solución isotónica a pH fisiológico 7,4. Sin embargo, los complejos se pueden preparar antes de la administración a un pH por debajo o por encima de pH 7,4. Se reconoce que muchos polipéptidos de interés en la presente invención son polianfolitos, que contienen grupos tanto positivos como negativos. El balance de los grupos positivos y negativos de dicho polipéptido depende de su

- 45 estructura química, así como del pH de la solución externa. A pH por debajo del punto isoeléctrico (pl) los polipéptidos pueden estar cargados positivamente. A pH por encima del pl, los polipéptidos pueden estar cargados negativamente. Por lo tanto, los complejos de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante la reacción de los polipéptidos por debajo del punto de pH con polianión. Estos complejos se pueden preparar también mediante la reacción de polipéptidos por encima del pl con policationes. Después de la preparación de los
- 50 complejos, el pH de la solución se puede cambiar al pH deseado, por ejemplo, a pH 7,4 para la administración adicional. Algunos casos, los polipéptidos pueden contener sitios o dominios con varios grupos positivos o negativos estrechamente posicionados entre sí. Tales polipéptidos pueden formar complejos con poli-iones de carga opuesta (por ejemplo, policationes en el caso de sitios con múltiples grupos negativos en el polipéptido o polianiones en el caso de sitios com múltiples grupos por encima del pH.
- 55

El núcleo de los complejos puede estar reticulado. Las reticulaciones pueden enlazar químicamente los grupos funcionales del polipéptido, de los poli-iones o de ambos polipéptidos y poli-iones, incluyendo uniones entre los polipéptidos y los poli-iones. Los reticulantes pueden ser escindibles o degradables y pueden escindirse en el cuerpo o dentro de la célula. Diversos métodos de reticulación conocidos en la técnica se pueden aplicar a la reticulación

- 60 (G. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier, 1996, 785 p.). Ejemplos de agentes de reticulación incluyen, sin limitación, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (DEC), glutaraldehído (GA), formaldehído, divinilsulfona, un polianhídrido, un polialdehído, un alcohol polihídrico, una carbodiimida, epiclorhidrina, éter de diglicidilo de etilenglicol, éter de diglicidilo de butanodiol, poliglicidiléter de poliglicerol, polietilenglicol, éter de diglicidilo de polipropilenglicol, un agente de reticulación bis- o poli-epoxi (por ejemplo, 1, 2, 3, 4-diepoxibutano o 1, 2, 7, 8-diepoxioctano), y los citados en G. Hermanson (Bioconjugate Techniques, Elsevier, 1996).
- La relación de reticulación del complejo polipéptido-poli-ion es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 75 %,

preferentemente de aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, y más preferentemente de aproximadamente 40 % a aproximadamente 50%. La presencia de un exceso de copolímero de bloque en los complejos polipéptidopoli-ion puede reducir la relación de reticulación necesaria para la estabilidad del complejo.

- 5 Los complejos de polipéptido-poli-ion de la presente invención se pueden administrar a un sujeto mamífero, particularmente un ser humano. Los complejos de polipéptido-poli-ion de la presente invención se muestran en a continuación en el presente documento que pueden atravesar la BHE y liberar el polipéptido de interés en el SNC, particularmente cuando el paciente tiene una enfermedad o trastorno neurodegenerativo o neuroinflamatorio. Sin estar ligado a teoría alguna, las partículas de complejo polipéptido-poli-ion, siguiendo a la administración al cuerpo
- 10 del sujeto mamífero, se pueden suspender en las células circulantes capaces de alcanzar el cerebro y una porción del polipéptido que estas células liberan en el cerebro. Más específicamente, la célula de circulación puede ser una célula del sistema inmunológico, tal como un monocito o un macrófago, preferentemente un monolito derivado de la médula ósea, una célula dendrítica, un linfocito, preferentemente una célula T, un neutrófilo, un eosinófilo un basófilo, y combinaciones de los mismos.
- 15

20

25

Además, sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los complejos de la presente invención proporcionan protección al polipéptido dentro de las células. Al mismo tiempo, debido a la estructura específica de núcleo cubierta inducida por el copolímero de bloque, los complejos no son tóxicos para la célula huésped y no alteran las propiedades funcionales de la célula. En particular, los complejos no afectan negativamente a la capacidad de las células para ir al sitio de la enfermedad.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, también se cree que los complejos pueden haber aumentado el tiempo de circulación solo o estando atrapados en las células circulantes. Como resultado, puede haber un aumento de la exposición de los complejos circulantes a la BHE y un aumento del porcentaje de la dosis inyectada del polipéptido liberado en el cerebro. Muchos estados de enfermedad pueden dar lugar a la permeabilidad disminuida de la BHE. Esto puede aumentar aún más el suministro en el cerebro de polipéptidos.

Por otra parte, sin desear quedar ligado a teoría alguna, también se cree que los complejos pueden unirse y entrar en el interior de las células neuronales y/o proyecciones periféricas neuronales y ser transportadas al cerebro a 30 través del proceso conocido como transporte retrógrado (Zweifel et al. (2005) Nat. Rev. Neurosci., 6:615-625; publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0083299) o un proceso similar. La estructura única de los complejos de la presente invención y, en particular, la combinación de cadenas poliméricas iónicas y no iónicas en los copolímeros proporciona protección a los polipéptidos, minimiza el daño a las células y tejidos, y facilita la libre migración de los complejos al cerebro.

35

Los complejos de polipéptido-poli-ion de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral, incluyendo, pero sin limitaciones, subcutánea, intravenosa e intraperitoneal. Además, los complejos de polipéptido-poli-ion pueden administrarse directamente en el sistema nervioso, en particular, por vía intratecal, epidural o intracerebral. Los complejos de polipéptido-poli-ion también se pueden administrar por vía intramuscular, intradérmica, o intracarotídea. Se puede usar una combinación de diferentes métodos de administración.

40

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el complejo de polipéptido-poli-ion se carga en una célula, que puede administrarse a un paciente como un agente terapéutico. Más específicamente, la célula es una célula circulante, en particular, una célula del sistema inmune. Las células del sistema inmune incluyen, sin limitaciones, un monocito, un macrófago, un monolito derivado de médula ósea, una célula dendrítica, un linfocito, una célula T, un

- 45 neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, v/o combinaciones de los mismos. Las células cargadas son capaces de atravesar la BHE y liberar el polipéptido de interés, particularmente cuando el paciente tiene una enfermedad o trastorno neurodegenerativo o neuroinflamatorio. Las células se pueden aislar del sujeto mamífero usando técnicas de aislamiento y separación de células disponibles en la materia. Como se describe a continuación en el presente
- 50 documento, las células pueden cargarse con el complejo polipéptido-poli-ion mediante la incubación de la célula con el complejo polipéptido-poli-ion. Las células cargadas se pueden administrar por vía parenteral, incluyendo, pero sin limitaciones, las vías subcutánea, intravenosa e intraperitoneal. Además de ello, pueden administrarse directamente en el sistema nervioso, en particular, por vía intratecal, epidural o intracerebral. Los complejos de polipéptido-poli-ion también se pueden administrar por vía intramuscular, intradérmica, o intracarotídea. Se puede usar una combinación
- 55 de diferentes métodos de administración.

La neuroinflamación, que se produce a través de la activación de los fagocitos mononucleares cerebrales (MP; macrófagos perivasculares y parenquimatosis y microglía) junto con astrocitos y células endoteliales, pueden actuar a través de vías paracrinas para acelerar la lesión neuronal en enfermedades muy divergentes, tales como la

60 enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), enfermedades de Huntington (EH), trastornos neurocognitivos asociados con el VIH (HAND), y encefalopatías espongiformes y accidente cerebrovascular. En estos trastornos, los infiltrados inflamatorios del SNC son complejos y de múltiples facetas. Los respondedores iniciales o los elementos celulares MP de la inmunidad innata establecieron una cascada, que más tarde implica la activación y el reclutamiento del sistema inmune adaptativo y, en última instancia, la neurodegeneración. Al final, la 65 microglía son los MP principales del SNC que responden a las lesiones y cuya función principal es la defensa del cerebro. La microglía activada participa en procesos inflamatorios vinculados a la neurodegeneración mediante la

producción de factores neurotóxicos, incluyendo ácido quinolínico, aniones superóxido, metaloproteinasas de la matriz (MMP), óxido nítrico, ácido araquidónico y sus metabolitos, quimiocinas, citocinas y excitotoxinas proinflamatorias, incluyendo el glutamato. Por otro lado, las funciones neuroprotectores de la microglía pueden estar mediados a través de sus capacidades para producir neurotrofinas y para secuestrar y eliminar excitotoxinas

- 5 presentes en los espacios extracelulares. De hecho, se sabe que supervivencia neuronal después de una lesión cerebral se ve afectada positivamente por las actividades de la microglía. Sin desear limitar la invención a una teoría específica, se cree que estos mecanismos comunes para la neurodegeneración se pueden utilizar para ganancia terapéutica utilizando transporte células inmunes de los complejos de polipéptido-poli-ion. En un método preferido, se usan fagocitos mononucleares que tengan una extraordinaria capacidad para cruzar la BHE debido a sus 10
- propiedades de marginación y de extravasación.

Un método de ejemplo comprende: aislar la célula diana de un paciente, incubar las células aisladas con los complejos de polipéptido-poli-ion, e invectar de las células de nuevo en el paciente. Sin limitar la presente invención a una teoría específica, se cree que un factor de este enfoque es la capacidad de los compleios de polipéptido-poliion para proteger su carga contra la proteólisis, que es extremadamente agresiva en los lisosomas de fagocitos. Se

15 cree, además, que los complejos de polipéptido-poli-ion de núcleo-cubierta no cambian la capacidad de las células circulantes para cruzar la BHE y llevar la carga útil al cerebro.

I. Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar una comprensión de la presente invención:

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polímero" se refiere a moléculas formadas a partir de la unión química de dos o más unidades que se repiten o monómeros. El término "copolímero de bloques" más simplemente se refiere a conjugados de al menos dos segmentos de polímero diferentes, en los que cada segmento de polímero comprende dos o más unidades adyacentes de la misma clase.

La expresión "proteína aislada" o "proteína aislada y purificada" se utiliza a veces en el presente documento. Este término se refiere principalmente a una proteína producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico 30 aislada de la invención. Como alternativa, este término puede referirse a una proteína que se ha separado suficientemente de otras proteínas con las que estaría naturalmente asociada, de forma que existe en forma "sustancialmente pura". Con "aislado" no se quiere decir que se excluyen las mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales o la presencia de impurezas que no interfieren en la actividad fundamental y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, o la adición de estabilizantes.

35

45

20

25

Polipéptido" y "proteína" se utiliza a veces indistintamente en el presente documento e indican una cadena molecular de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. Los términos también incluyen las modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, fragmentos de proteínas, análogos, proteínas variantes o mutadas, proteínas de fusión y similares se incluyen dentro del significado de polipéptido.

40

El término "aislado" puede referirse a una proteína, ácido nucleico, compuesto o célula que se ha separado suficientemente del ambiente con las que estaría naturalmente asociada, de forma que existe en forma "sustancialmente pura". "Aislado" no necesariamente significa la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales o la presencia de impurezas que no interfieren en la actividad fundamental y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica aprobación por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales 50 y, más particularmente, en seres humanos.

Un "vehículo" se refiere a, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, conservante (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico), antioxidante (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), solubilizante (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), emulsionante, tampón (por ejemplo, Tris HCl, acetato, fosfato), agua, soluciones acuosas, aceites,

- 55 sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol), excipiente, agente auxiliar o vehículo con el que se administra un agente activo de la presente invención. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA); Gennaro, A. R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, (Lippincott, Williams and Wilkins), 2000; Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Kibbe, et al., Eds., Handbook
- 60 of Pharmaceutical Excipients (3ª Ed.), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

II. Agente terapéutico

Aunque la presente invención implica proteínas contenidas en el complejo de polímero, también es posible 65 encapsular otros agentes terapéuticos o compuestos de interés en el complejo de polímero. Tales agentes o compuestos incluyen, sin limitación, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, y compuestos tales como fármacos

sintéticos y naturales. En una realización preferida, el agente terapéutico es un polipéptido o proteína. Aunque la descripción de la presente invención hace referencia a los complejos de polipéptido-poli-ion, el uso de proteínas también se contempla dentro de la presente invención. En muchos casos, el polipéptido términos y proteína se usan aquí indistintamente.

5

En una realización preferida de la presente invención, la proteína de interés en el complejo de polímero es una proteína terapéutica, es decir, produce mejora y/o cura de una enfermedad, trastorno, patología, y/o los síntomas asociados con la misma. Las proteínas pueden tener valor terapéutico contra trastornos neurológicos (en particular del SNC), incluyendo, sin limitación, trastornos degenerativos neurológicos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad

- 10 de Parkinson, enfermedad de Huntington (EH), accidente cerebrovascular, traumatismos, infecciones, meningitis, encefalitis, gliomas, cánceres (incluyendo metástasis cerebral), demencia asociada con el VIH (HAD), trastornos neurocognitivos asociados al VIH (HAND), parálisis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gerhig), esclerosis múltiple (EM), enfermedad cardiovascular asociada al SNC, enfermedad por priones, obesidad, trastornos metabólicos, enfermedades inflamatorias, trastornos metabólicos y enfermedades de almacenamiento
- 15 lisosomal (EAL; tales como, sin limitación, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Pompe, enfermedad de Niemann-pick, síndrome de Hunter (MPS II), mucopolisacaridosis I (MPS I), GM2-gangliosidosis, enfermedad de Gaucher, síndrome de Sanfilippo (MPS EIS), enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática y enfermedad de Fabry). Las proteínas terapéuticamente activas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, otros polipéptidos, cuya
- 20 administración al cerebro pueden ejercer mejora y/o cura de una enfermedad, trastorno, patología, y/o los síntomas asociados con la misma. Entre los polipéptidos neuroactivos útiles en la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, factores endocrinos, factores de crecimiento, factores de liberación hipotalámicos, factores neurotróficos, factores paracrinos, polipéptidos de neurotransmisores, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a cualquiera de los polipéptidos anteriores (tales factores neurotróficos, factores de crecimiento, y otros), anticuerpos y
- 25 fragmentos de anticuerpos que se unen a los receptores de estos polipéptidos (tales como receptores de factores neurotróficos), citocinas, endorfinas, antagonistas de polipéptidos, agonistas de un receptor expresado por una célula del SNC, polipéptidos implicados en las enfermedades de almacenamiento lisosomal, y similares. En una realización particular, la proteína terapéutica ejerce su efecto sobre el SNC. En otra realización concreta, la proteína terapéutica no atraviesa la BHE por sí misma.
- 30

65

Los ejemplos de proteínas específicas incluyen, sin limitación, catalasa, la telomerasa, superóxido dismutasa (SOD), glutationperoxidasa, glutaminasa, citocinas, endorfinas (por ejemplo, encefalinas), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (aFGF y bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento de plásico (BDNF), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento de plásico (BDNF), factor de crecimiento de cerebro (BDNF), factor de cerebro

- 35 neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento vascular (VGF), factor de crecimiento neural (NGF), factor de crecimiento II similar a la insulina (IGF-II), factor de necrosis tumoral-B (TGF-B), factor inhibidor de la leucemia (LIF), varias interleucinas, y similares), proteínas antiapoptóticas (BCL 2, PI3 cinasa, y similares), aglutinantes amiloide beta (por ejemplo, anticuerpos), moduladores de α-, β-, y/o γ-secretasas, péptido intestinal vasoactivo, leptina, alfa-glucosidasa ácida (GAA), esfingomielinasa
- 40 ácida, iduronato-2-sultatasa (I2S), α-L-iduronidasa (IDU), β-hexosaminidasa A (HexA), ácido β-glucocerebrosidasa ácida, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, α-galactosidasa A, y neurotransmisores (véase por ejemplo, Schapira, A.H. (2003) Neurology 61:S56-63; Ferrari et al. (1990) Adv Exp Med Biol. 265:93-99; Ferrari et al. (1991) J Neurosci Res. 30:493-497; Koliatsos et al. (1991) Ann Neurol. 30:831-840; Dogrukol-Ak et al. (2003) Peptides 24:437-444; Amalfitano et al. (2001) Genet Med. 3:132-138; Simonaro et al. (2002) Am J Hum Genet. 71:1413-1419; Muenzer et
- 45 al. (2002) Acta Paediatr Suppl. 91:98-99; Wraith et al. (2004) J Pediatr. 144:581-588; Wicklow et al. (2004) Am J Med Genet. 127A:158-166; Grabowski (2004) J Pediatr. 144:S15-19; Auclair et al. (2003) Mol Genet Metab. 78:163-174; Przybylska et al. (2004) J Gene Med. 6:85-92). Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son defectos genéticos hereditarios que dan lugar a una deficiencia de la enzima, lo que evita que las células desempeñen su función natural de reciclaje (Enns y Huhn, (2008) Neurosurg. Focus 24:E12). Esto conduce a diversos grados de
- 50 deterioro físico y/o mental progresivos y se cree que el suministro de estas enzimas deficientes en el cerebro puede resultar en el tratamiento de estas enfermedades. Varias enzimas implicadas en enfermedades de almacenamiento lisosomal o enzimas que pueden cumplir la función de las enzimas deficientes pueden liberarse utilizando los métodos de la presente invención.
- 55 Los complejos de polipéptido descritos en el presente documento se pueden usar como modalidad de tratamiento contra la toxicidad neural aguda por agentes nocivos basado en el suministro en el cerebro de butirilcolinesterasa o acetilcolinesterasa, reactivadores de la colinesterasa (por ejemplo, compuestos oxima), secuestrantes de organofosfatos e inhibidores de carbamatos. Dado que la butirilcolinesterasa (BChE) también hidroliza muchos fármacos que contienen éster, tales como cocaína y succinilcolina, la BChE dentro de los complejos de la presente invención tiene valor terapéutico contra la adicción a la cocaína y contra la toxicidad (por ejemplo, Carmona et al.)
- 60 invención tiene valor terapéutico contra la adicción a la cocaína y contra la toxicidad (por ejemplo, Carmona et al. (1999) Drug Metab. Dispos., 28:367-371; Carmona (2005) Eur. J. Pharmacol., 517:186-190).

Los métodos de la presente invención implican el uso de complejos de polipéptidos que contienen uno o varios polipéptidos útiles, o el uso de varios complejos que contienen diferentes polipéptidos que se pueden administrar solos o con las células, a la vez o por separado unos de otros. Los complejos pueden estar en la misma composición o pueden estar en composiciones separadas.

III. Administración

- Los complejos de polipéptido-poli-ion y las células que comprenden el complejo polipéptido-poli-ion descrito en el 5 presente documento se administrarán generalmente a un paciente como una preparación farmacéutica. El término "paciente", como se usa aquí se refiere a sujetos humanos o animales. Estos complejos de polipéptido-poli-ion y las células que comprenden los mismos pueden emplearse terapéuticamente, bajo la supervisión de un médico.
- La preparación farmacéutica que comprende los complejos de polipéptido-poli-ion y/o células cargadas con el 10 complejo polipéptido-poli-ion de la invención puede formularse convenientemente para la administración con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los complejos y las células se pueden formular con un medio aceptable, tal como agua, solución salina tamponada, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, líquido polietilenglicol y similares), dimetilsulfóxido de (DMSO), aceites, detergentes, agentes de suspensión o mezclas adecuadas de los mismos. La concentración de los complejos de polipéptido-poli-ion y/o las células en el
- medio elegido pueden variarse y el medio puede elegirse sobre la base de la vía administración deseada de la 15 preparación farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los complejos de polipéptido-poli-ion o células a administrar, se contempla su uso en la preparación farmacéutica.
- 20 El régimen de dosis y la dosis de los complejos de polipéptido-poli-ion y/o células de acuerdo con la invención que son adecuadas para la administración a un paciente particular pueden determinarla un médico teniendo en cuenta la edad del paciente, el sexo, el peso, estado médico general y la afección específica para la que se está administrando el complejo de polipéptido-poli-ion o célula y la gravedad de los mismos. El médico también puede tener en cuenta la vía de administración, el vehículo farmacéutico, y la actividad biológica del complejo o polipéptido 25
- celular-poli-ion.

La selección de una preparación farmacéutica adecuada también dependerá del modo de administración elegido. Por ejemplo, el complejo de polipéptido-poli-ion o célula que comprende el complejo polipéptido-poli-ion de la invención se pueden administrar mediante inyección directa en una zona cercana a la barrera hematoencefálica. En este caso, una preparación farmacéutica que comprende el complejo de polipéptido-poli-ion o células dispersas en un medio que es compatible con el sitio de la inyección.

Los complejos de polipéptido-poli-ion o células de la presente invención se pueden administrar por cualquier método, tal como la inyección intravenosa en el torrente sanguíneo, administración oral o por inyección subcutánea, intramuscular o invección intraperitoneal. Las preparaciones farmacéuticas para invección se conocen en la técnica. 35 Si se selecciona la invección como un método para administrar el complejo polipéptido-poli-ion o células, se deben tomar medidas para asegurar que suficientes cantidades de las moléculas o células alcanzan sus células diana para ejercer un efecto biológico.

- 40 Las composiciones farmacéuticas que contienen un complejo o célula de la presente invención como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden preparar de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas según la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, intravenosa, oral, inyección directa, intracraneal o intravítrea.
- 45

55

30

Una preparación farmacéutica de la invención se puede formular en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, hace referencia a una unidad físicamente pequeña de la preparación farmacéutica adecuada para el paciente sometido a tratamiento. Cada dosis debe contener una cantidad de ingrediente activo calculada para

50 producir el efecto deseado en asociación con el vehículo farmacéutico seleccionado. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para determinar la unidad de dosificación adecuada.

Las unidades de dosificación pueden aumentarse o disminuirse de forma proporcionada en función del peso del paciente. Las concentraciones apropiadas para el alivio de un estado patológico particular, se pueden determinar por cálculos curva de concentración de la dosis, como se conoce en la técnica.

La unidad de dosificación apropiada para la administración de los complejos de polipéptido-poli-ion o células que contienen los complejos se puede determinar mediante la evaluación de la toxicidad de las moléculas o células en modelos animales. Varias concentraciones de los complejos de polipéptido-poli-ion o células en las preparaciones

- farmacéuticas se pueden administrar a los ratones, y las dosis mínima y máxima se pueden determinar basándose 60 en los resultados beneficiosos y los efectos secundarios observados como resultado del tratamiento. La unidad de dosificación adecuada también se puede determinar mediante la evaluación de la eficacia del tratamiento con el complejo de polipéptido-poli-ion o células en combinación con otros fármacos estándar. Las unidades de dosificación del complejo de polipéptido-poli-ion pueden determinarse por separado o en combinación con cada tratamiento de
- 65 acuerdo con el efecto detectado. La preparación farmacéutica que comprende los complejos de polipéptido-poli-ion o células puede administrarse a

intervalos apropiados, por ejemplo, al menos dos veces al día o más, hasta que los síntomas patológicos se reducen o aliviada, después de lo cual la dosis puede reducirse a un nivel de mantenimiento. El intervalo adecuado en un caso particular normalmente dependerá de la afección del paciente.

5 Los siguientes proporcionan métodos ilustrativos de poner en práctica la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1:

- La necesidad de administración de polipéptidos terapéuticos en los tejidos cerebrales afectados en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EA y EP) (Brinton, R.D. (1999) Int. J. Fertil. Womens Med., 44:174-85; Gozes, I. (2001) Trends Neurosci., 24:700-5; Kroll et al. (1998) Neurosurgery 42:1083-100), infecciones (meningitis, encefalitis, enfermedad por priones y demencia relacionada con el VIH (Bachis et al. (2005) Ann. N. Y. Acad. Sci., 1053:247-57; Wang et al. (2003) Virology 305:66-76), accidente cerebrovascular (Koliatsos et al. (1991) Ann.
- Neurol., 30:831-40; Dogrukol-Ak et al. (2003) Peptides 24:437-44), almacenamiento lisosomal (Desnick et al. (2002) Nat. Rev. Genet., 3:954-66; Urayama et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci., 101:12658-63), obesidad (Banks, W. (2003) Curr. Pharm. Des., 9:801-809; Banks et al. (2002) J. Drug Target., 10:297-308), y otras enfermedades metabólicas e inflamatorias del SNC es inmediata y no puede ser exagerada.
- 20 Un componente importante de las enfermedades metabólicas y enfermedades degenerativas del sistema nervioso implica inflamación (Perry et al. (1995) Curr. Opin. Neurobiol., 5:636-41). Tales actividades inflamatorias son profundas, ya que conducen a la producción excesiva de productos proinflamatorios y especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen en parte, a la muerte celular y la neurodegeneración. Al afectar a las actividades neuroinflamatorias durante la enfermedad, tal como mediante el uso de antioxidantes o fármacos dirigidos que inhiben la producción o la formación de citocinas proinflamatorias y eicosanoides, los niveles de ROS, así como
- 25 initiberi la producción o la formación de chocinas promitamatorias y elcosanoides, los inveles de ROS, así como otras neurotoxinas pueden reducirse, dando lugar a una mejora de los desenlaces de la enfermedad (Prasad, et al. (1999) Curr. Opin. Neurol., 12:761-70). Sin embargo, estos enfoques han sido limitados, ya que los fármacos no sólo deben penetrar en la BHE sino que también se encuentran en concentraciones suficientes como para afectar a los mecanismos de la enfermedad en curso. Además, como los mecanismos inflamatorios son un evento temprano
- 30 probable de la enfermedad, las modalidades terapéuticas se deben utilizar temprano y con frecuencia. La limitación del suministro de fármacos es uno de los principales obstáculos con los que se enfrenta el desarrollo de nuevos paradigmas de tratamiento para los trastornos del sistema nervioso.
- Una de estas enfermedades es la PD, el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente en personas de más de 65 años de edad. Esta enfermedad se caracteriza por la falta del neurotransmisor dopamina debido a una pérdida de neuronas dopaminérgicas en el SNC y sus inervaciones con el cuerpo estriado. La neuropatología de IA EP consiste en la inflamación del cerebro, la activación de la microglía, y las posteriores actividades neurotóxicas secretoras, incluyendo la producción de ROS, que desempeñan papeles cruciales en el daño y muerte celular (McGeer et al. (1988) Neurology 38:1285-91; Busciglio et al. (1995) Nature 378:776-9; Ebadi et al. (1996) Prog.
- 40 Neurobiol., 48:1-19; Wu et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:6145-50). Los cerebros de EP muestran niveles de enzimas antioxidantes y antioxidantes (Ambani et al. (1975) Arch. Neurol., 32:114-8; Riederer et al. (1989) J. Neurochem., 52:515-20; Abraham et al. (2005) Indian J. Med. Res., 121:111-5) lo que da lugar a una reducción de la capacidad para manejar el estrés oxidativo asociado y la neurodegeneración. La cada vez más abundante evidencia apoya la idea de que los antioxidantes pueden inhibir las respuestas inflamatorias y proteger a las neuronas
- 45 dopaminérgicas en modelos animales y en laboratorio de EP (Wu et al. (2002) J. Neurosci., 22:1763-71; Du et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., 98:14669-74; Kurkowska-Jastrzebska et al. (2002) Int. Immunopharmacol., 2:1213-8; Teismann et al. (2001) Synapse 39:167-74; Ferger et al. (1999) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 360:256-61; Ferger et al. (1998) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 358:351-9; Peng et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:29194-8). La catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno, un ROS conocido, en agua y oxígeno
- 50 molecular con una de las tasas de recambio más altas de todas las enzimas conocidas. La cada vez más abundante evidencia sugiere que los antioxidantes pueden inhibir la respuesta inflamatoria y proteger hasta el 90 % de las neuronas dopaminérgicas *in vitro* and *in vivo* (Wu et al. (2002) J. Neurosci., 22:1763-71; Du et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., 98:14669-74; Kurkowska-Jastrzebska et al. (2002) Int. Immunopharmacol., 2:1213-8; Teismann et al. (2001) Synapse 39:167-74; Ferger et al. (1999) Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 360:256-61; Ferger et al.
- (1998) Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 358:351-9; Peng et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:29194-8). En un modelo *in vitro* de EP, se demostró que la catalasa rescataba las células granulares del cerebelo en cultivo primario de los efectos tóxicos de las ROS (Prasad et al. (1999) Curr. Opin. Neurol., 12:761-70; González-Polo et al. (2004) Cell Biol. Int., 28:373-80). Por otra parte, un activador de la catalasa a baja masa molecular, rasagilina, indujo neuroprotección en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson (Maruyama et al. (2002) Neurotoxicol.
- 60 Teratol., 24:675-82). Se han realizado pocos ensayos clínicos utilizando antioxidantes de bajo peso molecular, de los cuales el más utilizado es R-tocoferol y deprenilo, para inhibir la tasa de progresión de la EP (Group, T.P.S. (1993) N. Engl. J., 328:176-183). Sin embargo, y como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los ensayos no mostraron mejoras significativas a causa de transporte restringido de R-tocoferol través de la BHE y el tiempo después de la enfermedad que se utilizaron los fármacos (Pappert et al. (1996) Neurology, 47:1037-42).
- 65

Materiales y métodos

Materiales La catalasa de hígado de bovino, polietilenimina (PEI) (2K, ramificada, solución acuosa al 50 %), sulforodamina-B (SRB), dodecilsulfato de sodio (SDS), Sephadex G-25, y Triton X-100 se adquirieron en Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Metoxipoli (etilenglicol) epoxi (Me-PEG-epoxi) se adquirió en Shearwater Polymer Inc., Huntsville, AL.

MPTP. Como receptores de la intoxicación con 1-metil-4-fenil-12,3,6-tetrahidropiridina (MPT), los ratones 57BL/6 se trataron como se ha descrito (Benner et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci., 101:9435-40). Después de 12 horas, se inyectó a los ratones tratados con MPTP iv con el 50 μCi/ ratón de ¹²⁵ complejo polipéptido-poli-ion marcado con ¹²⁵I. Después de 24 horas, se sacrificó a los ratones y se detectó la cantidad de radiactividad en los principales órganos (cerebro, bazo, hígado, pulmones y riñones) mediante 1el asistente 3 de contador gamma (Perkin Elmer Life

- 10 Después de 24 horas, se sacrificó a los ratones y se detectó la cantidad de radiactividad en los principales órganos (cerebro, bazo, hígado, pulmones y riñones) mediante 1el asistente 3 de contador gamma (Perkin Elmer Life Sciences, Shelton, CT). La cantidad de la enzima liberada se expresó como un porcentaje de la dosis inyectada para todo el órgano.
- 15 Conjugados de PEI-PEG. El copolímero se sintetizó usando un procedimiento modificado (Nguyen et al (2000) Gene Ther., 7:126-38) mediante conjugación de PEI y Me-PEG-epoxi. Brevemente, se añadió una solución de agua Me-PEG-epoxi a 5 % de PEI en agua y se incubó durante la noche a la temperatura ambiente. Para purificar del exceso de PEI (así como de los residuos de bajo peso molecular), los conjugados obtenidos se dializaron en tubos de membrana Spectrapore con punto de corte 6000 a 8000 Da contra agua (reemplazada dos veces) durante 48 horas
- y después se concentró al vacío. Para la purificación final, el conjugado se disolvió en 20 ml de metanol al 100 % y después se añadió gota a gota a 400 ml de éter. El precipitado se centrifugó (400 g, 5 minutos), se lavó dos veces con éter, y se secó en un desecador. La caracterización detallada del producto se realizó mediante espectrofotometría y espectrometría de masas como se informó (Nguyen et al. (2000) Gene Ther., 7:126-38).
- 25 Complejos de ionómero de bloque. Cantidades dadas de la catalasa (1 mg/ml) y el copolímero de bloque (2 mg/ml) se disolvieron por separado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente. Se añadió una solución de la enzima gota a gota a la solución del copolímero bloque en agitación constante. La relación de carga +/- (Z) se calculó dividiendo la cantidad de grupos amino del PEI-PEG protonado a pH 7,4 (Vinogradov et al. (1998) Bioconjugate Chem., 9:805-812) por la cantidad total de Gln y Asp en la catalasa. Una combinación de métodos
- fisicoquímicos (retención electroforética, dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopia de transmisión electrónica (TEM)) se utilizó para caracterizar la composición, el tamaño, la estabilidad de la dispersión, la morfología, la forma y estructura de las nanopartículas obtenidas, como se ha descrito anteriormente (Vinogradov et al. (1999) Bioconjugate Chem., 10:851-60; Lemieux et al. (2000) J. Drug Target., 8:91-105; Vinogradov et al. (2004) J. Drug Target., 12:517-26; Vinogradov et al. (2005) J. Controlled Release, 107:143-57).
- 35 Retención electroforética. La formación de complejos de poli-ion se examinó mediante ensayo de desplazamiento en gel de acrilamida. Complejos enzimáticos en diversas Z se cargaron en un gel de acrilamida al 7,5 % con Tris 5mM, glicina 50 mM, pH 8,3, en condiciones no desnaturalizantes (en ausencia de SDS) para preservar el complejo. Las bandas de proteínas se visualizaron con anticuerpos policionales anticatalasa de conejo (Ac 1877, Abcam Inc,
- 40 Cambridge, MA; 1:6000) y Ac secundarios anti-conejo con peroxidasa de rábano (Amersham Life Sciences, Cleveland, OH; 1:1500). Las bandas de proteína específicas se visualizaron usando un kit de quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, IL).
- Mediciones de dispersión de luz. El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de los complejos de polipéptido-poli ion se midieron mediante espectroscopia de correlación de fotones usando 'ZetaPlus' Zeta Potential Analyzer
 (Brookhaven Instruments, Santa Barbara, CA) como se ha descrito anteriormente (Bronich et al. (2000) J. Am.
 Chem. Soc., 122:8339-8343; Vinogradov et al. (1999) Colloids Surf. B-Biointerfaces 16:291-304).
- *TEM.* Se colocó una gota de la dispersión de catalasa/PEI-PEG (Z = 1) en PBS en rejilla de cobre recubierta con
 Formvar (malla 150, Ted Pella Inc., Redding, CA). La rejilla de secado que contenía complejos de polipéptido-poliion se tiñó con sulfato de vanadio y se visualizó usando un microscopio electrónico de transmisión Philips 201 (Philips/FEI Inc., Briarcliff Manor, NY).
- Actividad catalasa y catalasa. La actividad de la enzima en nanopartículas de polímeros se estudió usando la velocidad de reacción de la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa o complejos de catalasa en diferentes relaciones de carga y se determinó mediante la monitorización el cambio en la absorbancia a 240 nm (el coeficiente de extinción de H₂O₂ es 44 X 10⁶ M⁻¹ cm¹).
- Marcaje con ¹²⁵I del complejo de catalasa-poli-ion. Para obtener el complejo catalasa-poli-ion marcado con ¹²⁵I, la solución de proteínas en PBS (1 mg/ml) se incubó durante 15 minutos con Na ¹²⁵ I (1 mCi) en presencia de reactivo de yodación con esferas de yodo Pierce, Rockford, IL) después se purificó a partir del marcador no conjugado usando columnas desalación D-sal (Pierce, Rockford, IL). La catalasa marcada con ¹²⁵ I (400 µCi/ml, 0,7 mg/ml) se complementó con copolímero de bloque PEI-PEG (Z = 1).

5

Análisis estadístico. Para los todos los experimentos, los datos se presentan como la media ± SEM. Las pruebas de diferencias significativas entre los grupos se realizaron utilizando ANOVA de una vía con comparaciones múltiples (comparaciones por pares de Fisher) utilizando GraphPad Prism 4.0 (software GraphPad, San Diego, CA). Un valor de p mínimo de 0,05 se consideró el nivel de significación para todas las pruebas.

Resultados

5

10

Se formaron complejos de ionómero de bloque espontáneamente mediante mezcla de ionómeros de bloque, ya sea con agentes tensioactivos o polielectrolitos con carga opuesta (Harada et al. (2001) J. Controlled Release 72:85-91; Kabanov et al. (1995) Bioconjugate Chem., 6:639-643; Harada et al. (1995) Macromolecules 28:5294-5299; Bronich et al. (1997) Macromolecules 30:3519-3525). La neutralización de las cargas de poli-ion conduce a la formación de dominios hidrófobos, que se segregan en medios acuosos en un núcleo de micelas complejas de poli-ion. Los segmentos no iónicos solubles en agua de ionómeros de bloque (por ejemplo, PEG) previenen la agregación y separación de fases macroscópicas. Como resultado, estos complejos se autoensamblan en partículas de tamaño

de nanoescala y forman dispersiones acuosas estables (Figura 1A). La catalasa tiene una carga neta negativa en 15 condiciones fisiológicas. Por lo tanto, los complejos de poli-iones se obtuvieron en tampón de fosfato (pH 7,4) mediante la mezcla de la enzima (1 mg/ml) y PEI-PEG (2 mg /ml), que está cargada positivamente.

Se obtuvieron complejos de catalasa y PEI-PEG con relaciones diferentes de carga +/- (Z = 0 a 4). Se sometieron a 20 electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las bandas de proteínas se visualizaron con anticuerpos frente a la catalasa (Figura 1B). La intensidad de la banda disminuyó a medida que aumentó el copolímero. Esto sugirió que los complejos formados eran incapaces de entrar en el gel y se confirmó mediante DLS. La adición de PEI-PEG a la solución de catalasa (1 mg/ml) dio como resultado partículas de tamaño nanométrico con un índice de polidispersidad relativamente bajo (aproximadamente 0,1-0,2), 25 mientras que no se detectaron partículas de catalasa sola.

- El tamaño de las partículas dependió de la relación de carga, la fuerza iónica, y el pH (Figura 1, partes C, D, y E). En PBS, el diámetro efectivo aumentó a medida que la relación de la carga aumentaba y después estabilizó a aproximadamente 90 a 100 nm en la relación de carga (Z) de 1 y superiores (Figura 1C). El potencial zeta se
- 30 incrementó al aumentar la cantidad del copolímero de bloque (Figura 1C). En una relación de carga constante (Z = 1) se formaron agregados grandes de más de 600 nm en ausencia de sal (Figura ID). La adición de sal disminuyó el tamaño de partícula, que se estabilizó en aproximadamente 90 nm, a medida que la concentración de NaCl alcanzaba los 0,15 M. Es probable que se formaran agregados grandes de complejos de polielectrolito en ausencia equilibrio al mezclar las soluciones catalasa y PEI-PEG. En ausencia de sal, estos agregados no pudieron
- equilibrarse y se mantuvieron "congelados" debido a una tasa baja de intercambio del poli-ion (Kabanov, V. (1994) 35 Polym. Sci., 36:143-156; Kabanov, V. (2003) Fundamentals of Polyelectrolyte Complexes in Solution and the Bulk. En Multilayer Thin Films (Decher, G., y Schlenoff, J., Eds.) pág. 47-86, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim). A medida que se añadió sal, el intercambio de poli-iones se aceleró, lo que dio lugar a la formación de pequeñas partículas (en equilibrio). Estas partículas eran estables en un intervalo aproximado de pH 7,4 a 11,5 pero
- 40 se agregaron de forma irreversible cuando el pH se redujo por debajo o aumentó por encima de este intervalo (Figura 1E). Dentro de este intervalo, la catalasa y PEI-PEG tenían cargas opuestas. La agregación de los complejos se unió a la protonación y la inversión de carga de la catalasa a (pl = 6,5) desprotonación de PEI a pH alto. En general, las partículas de complejo polipéptido-poli-ion fueron estables en pH y fuerza iónica fisiológicos. En estas condiciones, las partículas tenían una forma casi esférica (figura 1F). No se observaron cambios en la actividad 45 enzimática de catalasa en las relaciones de carga utilizadas para los posteriores estudios de carga, suministro y liberación de células (Figura 1G).
- Para determinar si los complejos de polipéptido-poli-ion podrían alcanzar subregiones del cerebro con enfermedad neuroinflamatoria activa reflejo de la EP humana, se utilizó el modelo MPTP. La MPTP provoca un síndrome 50 parkinsoniano grave e irreversible en los seres humanos y en primates no humanos (Langston et al. (1986) Clin. Neuropharmacol. 9:485-507), iniciando un proceso de auto-perpetuación nigroestriatal (Langston et al. (1999) Ann. Neurol. 46:598-605). En ratones, el MPTP reproduce la mayor parte de las características bioquímicas y patológicas de la EP, incluyendo la degeneración específica de neuronas dopaminérgicas en el SNpc y el cuerpo estriado correspondiente (Schmidt et al. (2001) J. Neural. Transm. 108:1263-82) e inflamación glial (Gao et al. (2003) Trends
- 55 Pharmacol. Sci., 24:395-401).

Se inyectó a los ratones C57B1/6 intoxicados con MPTP por vía intravenosa complejos de polipéptido-poli-ion libres que contenían catalasa marcada con ¹²⁵I. Veinticuatro horas después de la inyección, la radiactividad fue detectable en el cerebro, así como otros tejidos.

Ejemplo 2

60

Se usó ionómero de bloque catiónico de la arquitectura de injerto, poli-L-lisina-injerto-poli (óxido de etileno), PLL-g-PEO (2), que contenía aproximadamente 1,4 cadenas de PEO injertadas en una estructura principal de PLL, para preparar complejos de butirilcolina esterasa BChE/PLL-g-PEO. Una masa molecular estimada de PLL-g-PEO (2) es 65 de aproximadamente 24,000 g/mol de acuerdo con el análisis de RMN de 1H. En este estudio se usaron ambas

14

muestras de BChE (Hu BChE) y BChE humana de suero equino (Hor BChE).

Los complejos de Hu BChE con PLL-g-PEO (2) se prepararon mediante mezcla simple de soluciones tamponadas (tampón de fosfato, 10 mM, pH 7,4) de los componentes de ionómero de bloque y de proteínas. Se estudiaron composiciones de mezclas cerca de relación de carga estequiométrica entre los componentes y se presentaron en la Tabla 1. Las composiciones de mezcla se expresaron en términos de relación molar SA/Lys (calculada dividiendo la concentración de grupos amino de PLL-g-PEO (2) por la concentración de unidades de ácido siálico en BChE). La composición de las mezclas de BChE/PLL-g-PEO (2) también se expresó en términos de cantidad total de grupos carboxílicos (GIU, Asp, y ácido siálico) en proteínas y se calculó como una proporción de la concentración de grupo

10 amino en PLL- g-PEO (2) con la concentración total de grupos carboxílicos en la proteína (Z+/-).

Tabla 1			
Muestra	Hu BChE/PLL-g-PEO(2) (relación molar SA/Lys)	Z+/-	
1	1:1	0,24	
2	1:3	0,7	
3	1:5	1,2	

La extensión de la incorporación de Hu BChE en los complejos de ionómero de bloque se controló mediante
 electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE). La figura 2A presenta el patrón de electroforesis en gel observada para mezclas de Hu BChE and PLL-g-PEO(2). La intensidad de las bandas de Hu BChE se redujo significativamente a medida que se incrementaba la cantidad del copolímero en la mezcla. Esto demostró que el copolímero PLL-g-PEO(2) estaba unido a Hu BChE, neutralizando su carga. Se observó un retraso prácticamente completo de la migración del complejo en la composición de mezclas de Hu BChE/PLL-g-PEO(2) en las
 proximidades de Z +/- = 1,0.

Los complejos de Hor BChE and PLL-g-PEO(2) se prepararon de una manera similar y las composiciones de las mezclas se presentan en la Tabla 2. El grado de incorporación de Hor BChE en los complejos de ionómero de bloque se controló mediante PAGE no desnaturalizante. La figura 2B presenta el patrón de electroforesis en gel observada para mezclas de Hor BChE and PLL-g-PEO(2). Se observó inmovilización completa de Hor BChE en los

25 observada para mezclas de Hor BChE and PLL-g-PEO(2). Se observó inmovilización completa de Hor BChE en los complejos en el exceso de ionómero de bloque en las mezclas de (Z +/- = 6,2). Se obtuvieron datos similares para los complejos de Hor BChE y copolímero de PLL-g-PEO con una densidad de injerto de PEO de aproximadamente 6,6 cadenas por cadena de PLL (designado PLL-g-PEO (7))

20		
211	^	\sim
	- 4	()
00	ັ	U.

Tabla	2
-------	---

Muestra	Hor BChE/PLL-g-PEO(2) (relación molar SA/Lys)	Z+/-
1	1:5	1,2
2	1:10	2,3
3	1:15	3,4
4	1:27	6,2
5	1:36	8,2
6	1:45	10,3

Los complejos de BChE de ambos tipos y PLL-g-PEO (2) se caracterizaron además mediante dispersión de luz dinámica. Los datos para todos los tipos de estudios complejos se resumen en la Figura 3. Las partículas de tamaño ligeramente más grande que la proteína solo se detectaron en todas las mezclas de BChE /ionómero de bloque.

35

La masa molecular (Mw) para los complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2) se midió mediante análisis de sedimentación en equilibrio. Todas las mediciones se realizaron a 20 °C a una velocidad de rotor de 4.000 rpm durante el tiempo de sedimentación de 24 horas. El patrón de equilibrio de la sedimentación resultante se registró con un sistema óptico de absorbancia UV. Se usó un volumen específico parcial de proteínas promedio de 0,73 cm³ para el cálculo de los pesos moleculares a partir de los equilibrios de sedimentación medidos. Las masas moleculares calculadas se

40 pesos moleculares a partir de los equilibrios de sedimentación medidos. Las masas moleculares calculadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3					
Muestra	Z+/-	Mw	Varianza		
Hu BChE	-	364.215	1,14 x 10⁻⁵		
Hu BChE/PLL-g-PEO(2)	1,2	420.489	1,18 x 10 ⁻⁵		
Hu BChE/PLL-g-PEO(2)	6,2	450.509	1,0 x 10 ⁻⁵		

- 45 Estos datos también sugieren que los complejos formados a partir de Hu BChE y PLL-g-PEO (2) consisten en una molécula de proteína. El aumento observado de la masa molecular de los complejos en comparación con la proteína sola corresponde a la unión de aproximadamente 2-3 cadenas de copolímero PLL-g-PEO (2) por tetrámero de proteínas.
- 50 La actividad de BChE Hu incorporado en los complejos se determinó usando el ensayo basado en la hidrólisis de

yoduro de butiriltiocolina y se presenta en la Tabla 4. No hubo cambios en la actividad enzimática de BChE incorporado en los complejos, ni siguiera en presencia del exceso de ionómero de bloque. Dado que las concentraciones muy bajas de enzima o complejo (0,0025 mg/ml basado en BChE) son necesarias para la determinación de la actividad de BChE, fue necesario confirmar que los complejos mantienen su integridad a estas diluciones los complejos en diversos diluciones o en complejos mantienen su integridad a estas

5 diluciones. Los complejos en diversas diluciones se examinaron utilizando la técnica PAGE seguido de tinción en gel de la actividad de Karnovsky y Roots (Karnovsky y L. Roots (1964) J. Histochem, Cytochem, 12:219-221). Este método de tiocolina "de coloración directa" es altamente sensible a concentraciones bajas de BChE. Un patrón típico de electroforesis en gel se presenta en la Figura 4A. Estos datos indican que los complejos de BChE e ionómero de bloque se disocian cuando están muy diluidos.

10

Tabla 4				
Z+/-	Actividad (unidades/mg)			
	Hu BChE/PLL-g-PEO(2)	Hor BChE/PLL-g-PEO(2)		
BChE solo	353	923		
1,2	347	840		
2,3	357	867		
3,4	353	890		
6,2	363	947		
8,2	373	930		
10,3	390	913		
12,1	420	933		

La estructura de núcleo-cubierta multimolecular de los complejos de bloque de ionómero puede reforzarse mediante la formación de enlaces cruzados entre las cadenas del polímero. Los complejos reticulados resultantes son, en esencia, moléculas individuales de tamaño nanométrico que son estables tras la dilución y pueden resistir los desafíos ambientales, tales como cambios en el pH, la fuerza iónica, la composición del disolvente y las fuerzas de corte sin deterioro estructural. Por lo tanto, para aumentar aún más la estabilidad de los BChE/complejos de ionómero de bloque se introdujeron las reticulaciones en la estructura compleja. En estos estudios se usó glutaraldehído (GA), un reticulante homofuncional reactivo con amina. La reticulación se produce debido a la

20 formación de iminas (base de Schiff) entre los grupos aldehído de GA y los grupos amino primarios de los segmentos de proteínas y de polilisina del ionómero de bloque.

Para introducir reticulación en los complejos, los complejos de Hu BChE/PLL-g-PEO (2) (Z +/- = 1,2, 0,15 mg/ml en la base de BChE) en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) se trataron con una solución al 0,25 % de GA en agua. La cantidad de GA se calculó sobre la base de la relación de reticulación objetivo (85 %) se define como la cantidad total de grupos aldehído en la solución de GA frente al número total de residuos de Lys en al copolímero de PLL-g-PEO. Las soluciones reticuladas de los complejos se mantuvieron durante 5 horas a temperatura ambiente. La estabilidad de los complejos reticulados frente a la dilución se evaluó mediante el método de Karnovsky y Roots. El complejo reticulado se diluyó a 1000, 5000, y 250 cronometrado, respectivamente. Hu BChE y el complejo no reticulado original, diluido en la misma media se utilizaron como controles. Un patrón de electroforesis en gel se

presenta en la Figura 4B. No se observaron bandas de BChE en las calles correspondientes a los complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2) reticulados a una dilución de hasta 1000 veces. Por el contrario, la dilución de los complejosprecursores dio lugar a la disociación completa y la liberación de BchE libre. Estos datos sugieren que la estabilidad de los complejos de ionómero de bloque que atrapan BchE en el núcleo se puede aumentar significativamente mediante la introducción de reticulación en el núcleo de los complejos.

La actividad enzimática de Hu BChE incorporado en los complejos reticulados se evaluó utilizando yoduro de butiriltiocolina como sustrato. Es una molécula suficientemente pequeña como para penetrar en los complejos reticulados para reaccionar con la enzima atrapada. Los datos se presentan en la Tabla 5. Estos datos indican que la reticulación de los complejos de BChE/PLL-g-PEO dio como resultado la pérdida de la actividad enzimática de BChE atrapada en el complejo (por ejemplo, se observó un 75 % de disminución en la actividad específica inicial de BChE) En general, la reticulación del núcleo de los complejos de BChE/PLL-g-PEO da lugar a una resistencia suficiente de los complejos de BChE/PLL-g-PEO resultantes a la dilución.

45

50

Tabla 5	
Sistemas	Actividad (unidades/mg)
Hu BChE	320
Hu BChE/PLL-g-PEO(2) (Z _{+/-} = 1.2)	313
Hu BChE/PLL-g-PEO(2) reticulado (Z _{+/-} = 1,2)	76

Para introducir diversa reticulación en los complejos, los complejos de Hu BChE/PLL-g-PEO (2) (Z +/- = 1,2, 0,15 mg/ml en la base de BChE) en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) se trataron con una solución de GA en agua. Se añadieron 3 µl de soluciones de GA con diversas concentraciones a 120 µl de la solución compleja tal como se presenta en la Tabla 6. La cantidad de GA se calculó sobre la base de la relación de reticulación específica definida como la cantidad total de grupos aldehído en la solución de GA en comparación con el número total de residuos de

Lys en el copolímero PLL-g-PEO. Es de destacar que el grado de reticulación específica representa la cantidad teórica máxima de reticulación que puede tener lugar, en lugar de la medida precisa de amidación, que se espera que sea menor. El grado específico de reticulación se varió de 10 % a 100 %. Las mezclas se mantuvieron durante 5 horas a temperatura ambiente.

Relación de reticulación objetivo (%)	C _{GA} (mg/ml)	GA (mmol)*
100	0,25	1,9 x 10⁻⁵
85	0,25	1,6 x 10⁻⁵
40	0,125	3,75 x 10⁻ ⁶
20	0,062	1,9 x 10⁻ ⁶
10	0,031	9,4 x 10 ⁻⁷

Tabla 6 - *Cantidad de residuos de Lys fue de 1,9 x 10⁻⁵ mmol.

La estabilidad de los complejos reticulados frente a la dilución se evaluó mediante el método de Karnovsky y Roots.

- Los complejos reticulados se diluyeron a 1:1000, 1:500, y 1:250. Hu BChE y complejos no reticulados originales diluidos en la misma medida se utilizaron como controles. Los patrones de electroforesis en gel representativos para los complejos con diversas relaciones de reticulación (85 %, 40 % y 20 %) se muestran en las Figuras 5A-5C. Los 10 complejos preparados a una relación de reticulación objetivo de 85 % y el 40 % eran estables y no se disociaron tras la dilución hasta 1000 veces. No se observaron bandas de BChE en las calles correspondientes a los complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2) reticulados con reticulación objetivo de 85 % (Figura 5A) y 40 4 (Figura 5B). La dilución de los
- 15 complejos-precursores dio lugar a la disociación completa y la liberación de BchE libre (calles B). Los complejos preparados según una relación de reticulación objetivo de 20 % se disociaron parcialmente a diluciones más altas (Figura 5C). De hecho, se observó una banda correspondiente a BChE libre en las calles correspondientes a los complejos reticulados a una dilución de 250 veces.
- 20 La Figura 6 presenta el patrón de electroforesis en gel observado para los complejos BChE/PLL-g-PEO (2) complejos de (Z +/- = 1,2) preparados en diversas relaciones de reticulación y diluidos 500 veces. La banda de BChE libre apareció en las calles correspondientes a los complejos reticulados con relación de reticulación del 30 % y menores. Estos datos sugieren que la reticulación se introduce preferentemente en los complejos BChE/PLL-g-PE0 (2) a una relación de reticulación objetivo de al menos 40 % para evitar la degradación de los complejos tras la 25 dilución.

La masa molecular (Mw) de os complejos Hu BChE/PLL-g-PEO (2) reticulados se midió mediante análisis de sedimentación en equilibrio. Todas las mediciones se realizaron a 20 °C a una velocidad de rotor de 6000 rpm durante el tiempo de sedimentación de 24 horas. El patrón de equilibrio de la sedimentación resultante se registró con un sistema óptico de absorbancia UV. Se usó un volumen específico parcial de proteínas promedio de 0,73 cm³ para el cálculo de los pesos moleculares a partir de los equilibrios de sedimentación medidos. Las masas moleculares calculadas se presentan en la Tabla 7. La masa molecular de los complejos reticulados es comparable con los de los complejos-precursor. Estos datos sugieren que las reacciones de reticulación procedieron dentro de las partículas individuales complejas y no dieron lugar a reticulación entre partículas y la agregación de complejos.

35

30

5

	Tabla	7	
Muestra	Mw	Varianza	Número de cadenas poliméricas por tetrámero de BChE
Hu BChE solo	364,215	1,14 x 10⁻ ₅	-
Hu BChE/PLL-g-PEO(2), (Z+/-=1,2)	420,489	1,18 x 10⁻ ₅	2,25
Relación de reticulación objetivo de Hu BChE/PLL-g-PEO(2), (Z+/-=1,2), 40%	450,509	1,0 x 10 ⁻⁵	3,12

40

45

La actividad enzimática de Hu BChE incorporado en los complejos reticulados se evaluó utilizando yoduro de butiriltiocolina como sustrato. Los datos se presentan en la Tabla 8. Estos datos indicaron que la reticulación de los complejos BChE/PLL-g-PEO afectaba a la actividad de BChE incorporado en el núcleo del complejo. El aumento de la relación de reticulación dio como resultado la pérdida de actividad enzimática. Por ejemplo, se observó una disminución del 75 % en la actividad específica inicial de BChE en relación de reticulación objetivo del 85 % y se determinó ausencia de actividad a una reticulación del 100 %. Por el contrario, con la relación de reticulación del 40 %, la disminución observada en la actividad era bastante pequeña (20 %). conclusión, reticulación química del núcleo de complejos de BChE/PLL-g-PEO representan una herramienta eficaz para ajustar la estabilidad de los complejos frente a la dilución preservando al mismo tiempo una actividad de proteína incorporada en el núcleo iónico

de los complejos. Tabla 8

Tabla o				
Sistema	Relación de reticulación objetivo (%)	Actividad (unidades/mg)		
Hu BChE	0	320		

Hu BChE/PLL-g-PEO(2) (Z _{+/-} = 1.2)	0	313
Hu BChE/PLL-g-PEO(2) reticulado (Z _{+/-} = 1,2)	100	0
	85	76
	40	253
	20	248
	10	257

La migración y localización de BChE liberado por medio de complejos de polímero se evaluó en ratones nulicigotos para la butirilcolinesterasa (BChE -/-) utilizando formación de imágenes ópticas. Los ratones defectivos BChE-/- se produjeron mediante deleción dirigida al gen de una porción del gen de BCHE. (número de acceso M99492; Li et. al. (2008) L Pharm Exp. Ther. 324:1146-1154). Se usó una sonda fluorescente en el infrarrojo cercano IRDve®800CW

- 5 (2008) J. Pharm. Exp. Ther., 324:1146-1154). Se usó una sonda fluorescente en el infrarrojo cercano IRDye®800CW (Li-cor, Lincoln, NE) para marcar Hor BChE. El grado de etiquetado se calculó que era una molécula de colorante por tetrámero de proteínas. Para preparar los complejos que contienen Hor BChE (Hor BChE/IRDye) marcado 16 µl de solución de Hor BChE/IRDye se mezclaron con 57 µl de solución de PLL-g-PEO(2) (10 mg/ml) y 8 µl de tampón de 10X PBS (tampón fosfato 0,1 M, C(NaCl)=1,4 M, pH 7,4). Los complejos resultantes se reticularon adicionalmente
- 10 usando glutaraldehído. La cantidad de glutaraldehído añadido se calculó sobre la base de 40 % de grado objetivo de reticulación. La mezcla se mantuvo durante 5 horas a temperatura ambiente. El complejo Hor BChE/IRDye/ PLL-g-PEO(2) reticulado fue estable frente a la dilución como se confirmó mediante el método de Karnovsky y Roots. Una disminución global observada de la actividad enzimática de Hor BChE/IRDye incorporada en el complejo polimérico debido al procedimiento de reticulación fue de aproximadamente el 35%.
- 15

Antes de las imágenes, el pelo de las secciones ventral y dorsal del animal se retiró usando la crema Fair. Se mantuvo a los ratones con una dieta purificada especial para reducir las señales de fluorescencia de interferencia en el estómago y el intestino inducidas por la comida estándar de los animales. Se usaron dos vías de inyección intratecal (IT) e intramuscular (IM). Se anestesió a los animales y después se administró la proteína marcada o Hor

20 BChE/IRDye incorporada en el complejo reticulado. Usando el formador de imágenes IVIS 200, se rastreó la fluorescencia un vivo para Hor BChE/IRDye en un período de 48 horas. Se observó acumulación de Hor BChE/IRDye incorporado en el complejo de polímero en el cerebro en 2,5 horas después de la inyección IT del complejo. La señal de fluorescencia correspondiente a Hor BChE/IRDye también se detectó en el cerebro del ratón en 48 horas después de la inyección intramuscular del complejo.

25

Para determinar la actividad final de las enzimas de BChE liberadas en el cerebro, se sacrificó a los ratones y los tejidos del cerebro se extirpan para el análisis. La actividad de BChE asociada al cerebro se determinó usando el ensayo Ellman (Duysen, et al. (2001) J. Pharm. Exp. Ther. 299:528-535). Las unidades de la actividad se define como micromoles de butiriltiocolina hidrolizado por minuto a pH 7,0, 25 °C, y Los datos se presentan en la Tabla 9.

30

35

 Tabla 9: Estos datos demuestran que la enzima BChE liberada dentro de los complejos de polímero se acumula y retiene su actividad en el teiido cerebral de los animales analizados.

Tratamiento	Dosis (BChE,mg)	Actividad (unidades/g de tejido)
BChE/IRDye solo, IT	0,05	0,09
c/BChE/IRDye/PLL-g-PEO(2), IT	0,019	0,07
c/BChE/IRDye/PLL-g-PEO(2), IM	0,075	0,01

Ejemplo 3

El siguiente procedimiento se utilizó para estudiar la biodistribución del complejo de CuZnSOD-poli-ion en animales vivos.

- Marcaje de proteínas. Se disolvió CuZn superóxido dismutasa (CuZnSOD; 2 mg) en 1 ml de solución salina
 tamponada con fosfato (PBS: fosfato de potasio 0,1 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4) a temperatura ambiente. 100 μl de tampón de fosfato de potasio 1 M (K₂H₂PO₄) se añadió a la solución para elevar el pH a 8,5. La solución obtenida se transfirió al vial con colorante reactivo, Alexa 680 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, n.º de ca. A-20172), y se incubó con agitación durante una hora a temperatura ambiente.
- 45 Purificación de CuZnSOD marcada. Se aplicó una mezcla de reacción (1 ml) se aplicó en una columna de Sephadex G-25 (0,5 x 26 cm) y tampón fosfato (10 mM, pH 7,4) como tampón de elución. Dos bandas de colores representaron la separación de la proteína marcada de colorante no conjugado. Se recogió la primera banda de color (azul claro) en aproximadamente 30 minutos en ocho fracciones (150 µl cada fracción). La concentración de proteína, determinada según el ensayo BCA Pierce, fue de 0,75 mg/ml. La solución de proteína marcada se liofilizó y se almacenó a -20 °C.

Preparación de complejos de poli-iones incorporados en proteínas. Para obtener el complejo CuZnSOD-poli-ion con una relación de carga (+/-Z) = 2: 1, se añadieron gota a gota a 830 µl de CuZnSOD (1 mg/ml) marcada con Alexa 680 en tampón fisiológico a 830 µl de solución de poli(etilenimina) (PEI) y copolímero de bloque de poli (etilenglicol) (PEG) (PEL-PEG, 2 mg/ml) con agitación La relación de carga +/- (Z) se calculó dividiendo la cantidad de grupos

55 (PEG) (PEI-PEG, 2 mg/ml) con agitación. La relación de carga +/- (Z) se calculó dividiendo la cantidad de grupos

amino del PEI-PEG protonado a pH 7,4 por la cantidad total de GIn y Asp en CuZnSOD. La solución del complejo de CuZnSOD-poli-ion obtenido se incubó al menos 1 hora antes de su uso posterior.

Visualización de la biodistribución del complejo de CuZnSOD-poli-ion en ratones. Antes del experimento, se anestesió a los ratones Balb/C hembra con inyecciones i.p. de pentobarbital a la dosis de peso corporal 30-40 mg/kg de peso corporal, se les afeitó y depiló (para reducir el bloqueo de la fluorescencia por el pelo). Se mantuvo a los ratones con dieta líquida durante 72 horas (para eliminar la autofluorescencia en el estómago y el intestino de alimentos sólidos). Se inyectó a ratones en la vena de la cola complejos de CuZnSOD-poli-ion marcados con Alexa-680. Después, se anestesió los ratones con una mezcla de isoflurano 1,5 % con óxido nitroso al 66 % y el resto del

- 10 oxígeno y se colocaron en la cámara de formación de imágenes. La biodistribución de los complejos de CuZnSODpoli-ion se determinó midiendo la fluorescencia *in vivo* de Alexa-680 detectado mediante un sistema de formación de imágenes IVIS 200 Series Imaging Gas Anasthesia System. Los complejos de CuZnSOD-poli-ion marcados con Alexa 680 comenzaron a acumularse en el cerebro 1 hora después de la inyección i.v. alcanzaron un máximo 7 horas después de la inyección y permanecieron elevados durante al menos 24 horas después de la inyección
- 15 (Figura 7). Estos datos indican que los complejos de CuZnSOD-poli-ion administrados periféricamente se localizan en el cerebro.

Ejemplo 4

- 20 Los copolímeros PLL-PEO que tienen una arquitectura de bloques se utilizaron para incorporar BChE en complejos de copolímeros de bloque. Se sintetizó poli-L-lisina-injerto-poli (óxido de etileno) (PLL-b-PEO) (véase, por ejemplo, Harada et al. (1995) Macromolecules 28:5294). Se usó α-metoxi-ω-amino-poli(etilenglicol) con un peso molecular de 5.600 g/mol y la distribución de peso molecular más bien estrecha de 1,27 (Biotech GmbH, Alemania) como macroiniciador para la síntesis de copolímero de bloque. PLL-b-PEO se caracterizó mediante espectroscopia RMN
- 25 de ¹H usando D₂O como disolvente en un espectrómetro Varian 500 MHz. La longitud del segmento de PLL se calculó que era 25. Se estimó una masa molecular de PLL-g-PEO de aproximadamente 24.000 g/mol. Este polímero se designó como PLL-b-PEO. La relación de intensidad máxima de los protones de metileno de PEO (OCH₂CH₂: δ = 3,62 ppm) y los protones de ε-metileno de PLL ((CH₂)₃CH₂NH₃: δ = 2,9 ppm) midió para calcular el valor del grado de polimerización para el segmento de PLL, que se determinó que era 36. Se estimó una masa molecular de PLL-b-
- 30 PEO de aproximadamente 10.200 g/mol. Este polímero se designó como PLL-b-PEO.

Se llevó a cabo una titulación inversa para determinar la concentración del grupo amino en solución de PLL-b-PEO. Se calculó que la concentración de grupos amino en solución de 5 mg/ml de PLL-b-PEO se calculó era 6,1 mM.

- Para preparar complejos con PLL-b-PEO se usaron ambas muestras de BChE (Hu BChE) y BChE humana de suero equino (Hor BChE). Los complejos se prepararon mediante simple mezcla de soluciones tamponadas (tampón de fosfato, 10 mM, pH 7,4) del copolímero de bloque y los componentes de la proteína en diferentes composiciones de mezcla y se presentaron en la Tabla 10. Las composiciones de las mezclas de BChE/PLL-b-PEO se expresaron en términos de la cantidad total de grupos carboxílicos (Glu, Asp, y ácido siálico) en la proteína y se calculó como la relación entre la concentración de grupo amino en PLL-b-PEO y la concentración total de grupos carboxílicos en la
- 40 relacion entre la concentracion de grupo amino en PLL-b-PEO y la concentracion total de grupos carboxilicos e proteína (Z +/-).

Tabla 10		
Muestra		
(Hu BChE/PLL- <i>b</i> -PEO o Hor BChE/PLL- <i>b</i> -PEO)	Z+/-	
1	0,5	
2	1,0	
3	2,0	
4	3,0	

_

- 45 La extensión de la incorporación d BChE en los complejos de ionómero de bloque se controló mediante PAGE no desnaturalizante. Las figuras 8A y 8B presentan patrones de electroforesis en gel observados para las mezclas BChE/PLL-b-PEO y Hor BChE/PLL-b-PEO, respectivamente. En ambos casos, la intensidad de las bandas de BChE disminuyó a medida que aumentaba la cantidad de copolímero de bloque en la mezcla. Esto demostró que el copolímero de bloque PLL-b-PEO estaba unido BChE, neutralizando su carga. Se observó un retraso prácticamente 50 completo de la migración del complejo en los geles en la proximidad de Z +/- = 2,0 para las mezclas tanto Hu
- 50 completo de la migración del complejo en los geles en la proximidad de Z +/- = 2,0 para las mezclas tanto Hu BChE/PLL-b-PEO como Hor BChE /PLL-b-PEO. Es de destacar que una incorporación de BChE de suero equino (Hor BChE) en los complejos de ionómero de bloque utilizando copolímeros de PLL-PEO de la arquitectura de injerto (PLL-g-PE0 (2) o PLL-g-PE0 (7)) requiere la presencia del exceso del copolímero en las mezclas de (Z +/- = 6,22).
- 55 Los complejos de BChE de ambos tipos y PLL-b-PEO) se caracterizaron además mediante dispersión de luz dinámica. Los datos para todos los tipos de estudios complejos se resumen en la Tabla 11. Las partículas de tamaño ligeramente más grande que la proteína solo se detectaron en todas las mezclas de BChE /copolímero de bloque.

Tabla 11			
Muestra	Z+/-	Diámetro, nm	
Hu BChE	-	13,30	
Hu BChE/PLL-b-PEO	1,0	14,63	
Hu BChE/PLL-b-PEO	2,0	14,35	
Hor BChE	-	12,20	
Hor BChE/PLL-b-PEO	1,0	13,92	
Hor BChE/PLL-b-PEO	2,0	13,20	

El efecto de la reticulación del núcleo de los complejos de BChE/PLL-b-PEO sobre la estabilidad de los complejos se explicará adicionalmente. En estos estudios se usó glutaraldehído (GA), un reticulante homofuncional reactivo con amina. Para introducir reticulación en los complejos, los complejos Hu BChE/PLL-b-PEO y Hor BChE/PLL-b-PEO (Z

- 5 amina. Para introducir reticulación en los complejos, los complejos Hu BChE/PLL-b-PEO y Hor BChE/PLL-b-PEO (Z +/- = 1,0, 0,15 mg/ml en la base de BChE) en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) se trataron con una solución al 0,008 % de GA en agua. La cantidad de GA se calculó sobre la base de la relación de reticulación objetivo (40%) se define como la cantidad total de grupos aldehído en la solución de GA frente al número total de residuos de Lys en al copolímero de PLL-b-PEO. Las soluciones de los complejos con reticulante añadido se mantuvieron durante 5 horas
- 10 a temperatura ambiente. La estabilidad de los complejos reticulados frente a la dilución se evaluó mediante el método de Karnovsky y Roots. Los complejos reticulados se diluyeron 500 veces. Las muestras de BChE y los complejos no reticulado originales diluidos en la misma medida se utilizaron como controles. El patrón de electroforesis en gel se presenta en la Figura 9A. Estos datos indican que los complejos de BChE/PLL-b-PEO preparados a una composición de Z +/- = 1,0 y a una relación de reticulación objetivo del 40 % no pudieron resistir la
- 15 dilución que llevó a su disociación. Se observó una banda correspondiente a BChE libre en todas las calles correspondientes a los complejos reticulados (calles C y F de la Fig. 9A, respectivamente) y sus precursores no reticulados (calles B y E de la Fig. 9A, respectivamente).
- En otra serie de experimentos, los complejos Hu BChE/PLL-b-PEO and Hor BChE/PLL-b-PEO preparados a Z +/- = 2,0 (0,15 mg/ml en la base de BChE) se trataron con una solución al 0,016 % de GA para lograr un grado de reticulación objetivo del 40 %. Los complejos reticulados se diluyeron 500 veces. Las muestras de BChE y los complejos no reticulado originales diluidos en la misma medida se utilizaron como controles. El patrón de electroforesis en gel se presenta en la Figura 9B. Como se ve en la Figura 9B, no se observaron bandas de BChE en las calles C y F correspondientes a los complejos Hu BChE/PLL-b-PEO y Hor BChE/PLL-b-PEO reticulados con
- 25 Z +/- = 2,0, respectivamente. Por el contrario, la dilución de los complejos-precursores dio lugar a la disociación completa y la liberación de BchE libre (calles B y E de la Fig. 9B). Por el contrario, parece que un pequeño exceso de copolímero de bloque en los complejos BChE/PLL-b-PEO podría ser necesario para el éxito de la reticulación del núcleo del complejo.
- 30 La actividad enzimática de BChE incorporada en los complejos BChE/PLL-b-PEO no reticulados y reticulados se evaluó adicionalmente utilizando yoduro de butiriltiocolina como sustrato. Los datos se presentan en la Tabla 12. Prácticamente no se encontraron cambios en la actividad enzimática de Hor BChE incorporado en el complejo BChE/PLL-b-PEO reticulado (Z +/- = 2). Adicionalmente, no se observó disminución de la actividad enzimática de Hu BchE en el caso de los complejos Hu BChE/PLL-b-PEO reticulados en comparación con la actividad de BChE medida en las soluciones de los complejos no reticulados.

Sistemas	Actividad (unidades/mg)	
Hu BChE	437	
Hu BChE/PLL-b-PEO, Z _{+/-} = 2	260	
Hu BChE/PLL- <i>b</i> -PEO reticulado, Z _{+/-} = 2	260	
Hor BChE	573	
Hor BChE/PLL-b-PEO, Z+/-= 2	547	
Hor BChE/PLL- <i>b</i> -PEO reticulado, $Z_{+/-}= 2$	610	

Tabla 12

Ejemplo 5

40

La entrada en el cerebro se produce como consecuencia de la creación de un gradiente de quimiocinas inducido a través de respuestas neuroinflamatorias (Kadiu et al. (2005) Neurotox. Res., 8:25-50; Gorantla et al. (2006) J. Leukocyte Biol., 80:1165-1174). Por lo tanto, se desarrolló un sistema modelo de EP para probar la utilidad del suministro basado en células. En primer lugar, se utilizaron señales inflamatorias divergentes para estimular la producción de ROS por la microglía y se incluyó alfa-sinucleína nitrada (N-α-syn), que se piensa que se libera extracelularmente en la EP y provoca la activación inmune (Gendelman, H. (2006) Neurotoxicology 27:1162; Mosley et al. (2006) Clin. Neurosci. Res., 6:261-281; El-Agnaf et al. (2003) FASEB J., 17:1945-7). En segundo lugar, la inflamación inducida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) sirvió como gradiente para la entrada de BMM en el cerebro. Está bien documentado que, tras las señales inflamatorias, los leucocitos son reclutados para el

50 cerebro a través de diapedesis y quimiotaxis (Anthony et al. (1997) Brain 120:435-44; Anthony et al. (2001) Prog. Brain Res., 132:507-24; Blamire et al. (2000) J. Neurosci., 20:8153-9; Persidsky et al. (1999) Am. J. Pathol.,

155:1599-611; Kuby, J. (1994) Immunology; Freeman, WH. and Co., Nueva York). Los monocitos-macrófagos pueden migrar a través de los espacios paracelulares del cerebro que atraviesan complejos de unión de las células endoteliales del cerebro (Pawlowski et al. (1988) J. Exp. Med., 168:1865-82; Lossinsky et al. (2004) Histol. Histopathol., 19:535-64). Su arsenal de combate consiste en engulir las partículas extrañas y liberar las sustancias encontractor que atravies encontractor en engulir las partículas extrañas y liberar las sustancias encontractor en encontractor encontr

- 5 engullidas por exocitosis. En conjunto, estas características hacen posible la explotación de los macrófagos como vehículos para afectar a los procesos neuroinflamatorios (Daleke et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1024:352-66; Lee et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1103:185-97; Nishikawa et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:5226-31; Fujiwara et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1278:59-67).
- 10 En el presente documento, se usó BMM como vehículo para el transporte de concentraciones terapéuticas de la catalasa en el cerebro. Un obstáculo importante para el éxito de este enfoque es que los macrófagos disgregan de manera eficiente las partículas engullidas (Fujiwara et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1278:59-67). Por lo tanto, es fundamental proteger la actividad de la enzima en el interior de la célula transportadora. La incorporación en nanoportadores poliméricos (nanoesferas, liposomas, micelas, nanopartículas) puede proporcionar dicha protección
- (Aoki et al. (2004) Int. J. Hypertherm., 20:595-605; Calvo et al. (2001) Pharm. Res., 18:1157-1166; Gref et al.; (1994) Science 263:1600-1603; Harada et al. (1999) Science 283:65-7; Jaturanpinyo (2004) Bioconjugate Chem., 15:344-8; Kabanov et al. (2002) J. Controlled Release 82:189-212; Kwon, G.S. (2003) Crit. ReV. Ther. Drug Carrier Syst., 20:357-403; Mora et al. (2002) Pharm. Res., 19:1430-8; Rousseau et al. (1999) Exp. Brain Res., 125:255-64; Torchilin, V.P. (2000) Eur. J. Pharm. Sci., 11:S81-91; Vinogradov et al. (2004) Bioconjugate Chem., 15:50-60). En
- 20 trabajos anteriores se ha demostrado que el uso de complejos interpolielectrolitos puede inmovilizar enzimas (Kabanov et al. (1977) Mol. Biol. (Russian), 11:582-596; Kabanov, V. (1994) Polym. Sci., 36:183-197; Kabanov et al. (2004) J. Phys. Chem. B, 108:1485-1490). Los complejos de polielectrolitos enzimáticos se pueden preparar a escala nanométrica mediante autoensamblaje de las enzimas con polielectrolitos de bloque con carga opuesta que contienen bloques iónicos y no iónicos solubles en agua (Harada et al. (2001) J. Controlled Release 72:85-91;
- Harada et al. (2003) J. Am. Chem. Soc., 125:15306-7). Las nanopartículas resultantes contienen un núcleo del complejo de proteína-polielectrolito rodeado por una cubierta de polímero no iónico soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG). En el trabajo actual, la catalasa se inmovilizó mediante su reacción con un copolímero de bloque catiónico, polietilenimina-poli(etilenglicol) (PEI-PEG), previamente utilizado para el suministro de polinucleótidos (Vinogradov et al. (1998) Bioconjugate Chem., 9:805-812). Los complejos de ionómero de bloque
- 30 resultantes de catalasa son captados por los BMM. En el presente documento se presentan pruebas de que tal modificación protege a la catalasa contra la degradación en los BMM, de que los BMM liberan complejos de polipéptido-poli-ion en el medio externo durante al menos 4-5 días y que los BMM pueden llevar a los complejos de polipéptido-poli-ion al cerebro, como en el modelo de MPTP de la EP.
- 35 <u>Materiales y métodos</u>

Materiales. Igual que en el ejemplo 1. BMM. Células de la médula ósea extraídas de fémures murinos (ratones C57BL/6 hembras), como se ha descrito (Dou et al. (2006) Blood 108:2827-35) se cultivaron durante 10 días en los medios suplementados con 1000 U/ml del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) (Wyeth Pharmaceutical, Cambridge, MA). La pureza del cultivo de monocitos se determinó mediante citometría de flujo usando FACSCalibur ((BD Biosciences, San Jose, CA).

Microglía. Se extirparon los cerebros de ratones C57BL/6 recién nacidos (1-3 días de edad), se lavaron con HBSS enfriado con hielo y se trituraron en trozos pequeños. El sobrenadante se reemplazó por 2,5 % de tripsina y solución de ADNasa (1 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, y, después, se añadió 1 ml de FBS enfriado con hielo con 10 ml de HBSS. Se centrifugó la mezcla (5 minutos, 1.500 rpm, 4 °C) y se añadió al sedimento medio completo con MCSF. Las células se cultivaron hasta la maduración (normalmente 10 días).

MPTP. Igual que en el ejemplo 1.

50 Conjugados de PEI-PEG. Igual que en el ejemplo 1.

60

40

Complejos de ionómero de bloque. Igual que en el ejemplo 1.

55 Retención electroforética. Igual que en el ejemplo 1.

Mediciones de dispersión de luz. Igual que en el ejemplo 1.

TEM. Igual que en el ejemplo 1.

65 tampón de carbonato de sodio 0,1 M, pH 8,5 (1 mg/ml) y se trató con RITC (10 mg/ml) en DMSO durante 2 horas a temperatura ambiente. La catalasa marcada se purificó a partir de residuos de bajo peso molecular mediante

Actividad catalasa y catalasa. Igual que en el ejemplo 1. Marcaje de catalasa con Alexa Fluor 594 e isotiocianato de rodamina (RITC). Para los estudios de carga y de liberación, la enzima se marcó con el kit de marcaje Alexa Fluor 594 Protein Labeling Kit (A10239, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) según el protocolo de los fabricantes. Para los estudios de microscopia confocal, la catalasa se marcó con RITC. En pocas palabras, la catalasa se disolvió en

filtración en gel en una columna Sephadex G-25 (1 x 20 cm) en PBS a velocidad de elución de 0,5 ml min⁻¹ y se liofilizó.

- Acumulación y liberación de complejos de polipéptido-poli-ion en BMM. Los BMM cultivados en placas de 24 pocillos
 (2,5 x 10 ⁶ células/placa) (Batrakova et al. (1998) Pharm. Res., 15:1525-1532; Batrakova et al. (2005) Bioconjugate Chem., 16:793-802) se preincubaron con tampón de ensayo (NaCl 122 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 10 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, K₂HPO₄ 0,4 mM, CaCl₂ 1,4 mM y HEPES 10 mM) durante 20 minutos. Después de la preincubación, las células se trataron con la enzima marcada con Alexa-Fluor 594 (0,7 mg/ml) en tampón de ensayo solo o complejos de polipéptido-poli-ion para varios puntos de tiempo. Después de la incubación, las células se
- 10 lavaron tres veces con PBS enfriado en hielo y se solubilizaron en Triton X 100 (1 %). Para las medidas de los complejos de polipéptido-poli-ion liberados de los BMM, los BMM cargados se incubaron con medio fresco a varios puntos de tiempo. La fluorescencia en cada muestra se midió mediante un espectrofotómetro de fluorescencia Shimadzu RF5000 (λ_{ex}) 580 nm, λ_{em}) 617 nm). La cantidad de complejos de polipéptido-poli-ion se normalizó según el contenido de proteínas y se expresó en μg de enzima por mg de la proteína para los experimentos de carga y μg
- 15 de enzima por mI de medio como la media ± SEM (n = 4).

Localización intracelular de los complejos de polipéptido-poli-ion. Los monocitos cultivados en los portaobjetos de la cámara (Kabanov et al. (1995) Bioconjugate Chem., 6:639-643) fueron expuestos a complejos de polipéptido-poli-ion marcados con RITC (Z = 1) durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación, las células se fijaron en paraformaldehído

- 20 al 4 % y se tiñeron con faloidina Oregon Green 488 específica de F-actina y tinción nuclear, ToPro-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Las células marcadas se examinaron mediante un sistema de microscopia de fluorescencia confocal ACAS-570 (Meridian Instruments, Okimos, MI) con láser de iones de argón (longitud de onda de excitación, 488 nm) y el conjunto de filtro correspondiente. Las imágenes digitales se obtuvieron usando la cámara CCD (Photometrics, Tuscon, AZ) y el software Adobe Photoshop.
- 25

Medidas de la actividad antioxidante. Los BMM de ratón maduros se cargaron con la enzima sola o con complejos de enzima-poli-ion (Z = 1) durante 1 hora y se lavaron con PBS y se añadió medio fresco a las células. Después de varios intervalos de tiempo, se recogió el medio y la actividad antioxidante de la enzima liberada de los BMM se analizó según la velocidad de descomposición de peróxido de hidrógeno.

30

Ensayo de fluorescencia con colorante Ampex Red. Las células de microglía murinas sembradas en placas de 96 pocillos ($0,1 \times 10^6$ células/pocillo) se estimularon con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (200 ng/ml) durante 48 horas o con alfa-sinucleína nitrada (N-alfa -syn) ($0,5 \mu$ M) para inducir producción de ROS. En paralelo, los BMM cultivados en placas de 24 pocillos se cargaron con catalasa "desnuda" (1 mg/ml) o complejos de catalasa-poli-ion durante 1 horas u desnuéa e insubaser cargaron con catalasa (N-alfa -syn) ($0,5 \mu$ M) para inducir producción de ROS. En paralelo, los BMM cultivados en placas de 24 pocillos se cargaron con catalasa "desnuda" (1 mg/ml) o complejos de catalasa-poli-ion

- 35 durante 1 hora y después se incubaron con tampón de Krebs-Ringer (NaCl 145 mM, KCl 4,86 mM, glucosa 5,5 mM, NaHH₂PO₄ 5.7 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgCl₂ 1,22 mM, pH 7,4) durante 2 horas para recoger la catalasa liberada de las células en el sobrenadante. Después de la incubación, los sobrenadantes recogidos de los BMM cargados con catalasa "desnuda" o complejo de catalasa-poli-ion se complementaron con solución madre de colorante Ampex Red (10 U/ml de HRP, Ampex rojo 10 mM). Para la estimulación de N-α-syn de la microglía, los sobrenadantes también
- 40 se complementaron con N-α-syn agregada 0,5 μM. Las soluciones obtenidas se añadieron a las células microgliales activadas y la descomposición de ROS por la catalasa "desnuda" o el complejo de catalasa-poli-ion se midió mediante fluorescencia a λ_{ex} = 563 nm, λ_{em} = 587 nm. El efecto de los sobrenadantes recogidos de los BMM no cargados o cargados con PEI-PEG solo sobre la descomposición de ROS se evaluó en comparación con los experimentos de control.
- 45

*Marcaje con*¹²⁵*I del complejo de catalasa polipéptido-poli-ion.* Igual que en el ejemplo 1. La catalasa marcada con ¹²⁵*I* (400 µCi/mI, 0,7 mg/mI) se suplementó con copolímero de bloque PEI-PEG (Z = 1) y se cargó en monocitos maduros (80 x 10⁶ de BMM en 1 mI de medio) durante 2 horas a 37 °C. Después de la incubación, los monocitos cargados se lavaron tres veces con PBS enfriado en hielo.

50

Análisis estadístico. Igual que en el ejemplo 1.

<u>Resultados</u>

- La fabricación de los complejos de polipéptido-poli-ion se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Inicialmente, utilizando el ensayo de viabilidad celular con sulforodamina-B (SRB), se demostró que los complejos de polipéptido-poli-ion (así como la catalasa o el copolímero por separado) no inducían citotoxicidad de los BMM en un amplio intervalo de concentraciones (de 0,03 a 1.000 µg por ml de catalasa; Figura 10). La cinética de acumulación sugirió una captación rápida tanto de la catalasa libre como del complejo polipéptido-poli-ion en los BMM (Figura 11A).
- 60 Cabe destacar que la enzima libre fue captada por los BMM casi el doble de rápido que el complejo de polipéptidopoli-ion. En el punto de tiempo de 60 minutos, la carga de BMM con el complejo de polipéptido-poli-ion fue de aproximadamente 30 µg de catalasa/10⁶ células. La captación del complejo de polipéptido-poli-ion en el punto de tiempo de 60 minutos disminuyó a medida que la relación de carga aumentó (Figura 11B), que puede deberse al efecto de la corona de PEG. Los datos de microscopia confocal sugirieron localización vesicular y/o citoplasmática
- 65 de la catalasa marcada con RITC administrada a los BBM en el complejo de polipéptido-poli-ion (Figura 11C).

Los BMM maduros se precargaron con el complejo de catalasa marcada con Alexa Fluor 594-poli-ion (60 minutos) y después se cultivaron en el medio fresco durante diferentes intervalos de tiempo. Los BMM cargados liberaron catalasa en los medios externos durante al menos 4-5 días (Figura 12A). Durante el mismo período, la cantidad de la enzima asociada a las células se redujo proporcionalmente. La exposición de los BMM cargados con el complejo de

- 5 polipéptido-poli-ion a acetato de forbol miristato (PMA) 10 μM, un potente activador de la vía de la proteína quinasa C y generación de ROS (Chang et al. (1993) Immunology 80:360-366), potenciaron la liberación de la enzima en el medio en aproximadamente 50 % (Figura 12B). Esto sugirió que la liberación del complejo de polipéptido-poli-ion a partir de los BMM puede depender de la activación celular.
- 10 Los BBM cargados con catalasa "desnuda" o el complejo de la catalasa-poli-ion se colocaron en un medio recién preparado y se determinó la actividad de la enzima liberada en el medio a diferentes intervalos de tiempo de incubación. Al contrario que los BMM cargados con catalasa libre que estaba prácticamente inactiva después de la liberación, las células cargadas con el complejo catalasa-poli-ion liberaron la enzima activa durante al menos 24 horas (Figura 13A). Se observó que la actividad máxima de la enzima liberada para los BMM cargados con el
- 15 complejo de catalasa-poli-ion preparado a la relación estequiométrica, Z = 1 (Figura 13B). En conjunto, esto indica que la incorporación de catalasa en un complejo de ionómero de bloque con PEI-PEG da como resultado protección y liberación sostenida de catalasa activa desde los BMM.
- Para evaluar la capacidad antioxidante de las nanoformulaciones de catalasa en la producción de ROS de la microglía, los BMM cargados con catalasa "desnuda" o el complejo de la catalasa-poli-ion se incubaron durante 2 horas en tampón de Krebs-Ringer y, a continuación, se recogió el sobrenadante reluctante y se añadió a las células de microglía estimuladas con TNF-α (200 ng/ml). La catalasa en los sobrenadantes recogidos de los BMM cargados con catalasa o con el complejo de catalasa-poli-ion descompuso el peróxido de hidrógeno por la microglía (Figura 14A). Se observó un mayor efecto por el complejo catalasa-poli-ion, que era consistente con su capacidad de
- 25 preservar la actividad enzimática en las células portadoras. Además, los sobrenadantes recogidos de los BMM no cargados (Figura 14B) o de los BMM cargados con PEI-PEG solo (Fig. 14C) tenía poco efecto, si lo hay, sobre el nivel de peróxido de hidrógeno. Para determinar si estos resultados podrían reproducirse en la microglía activada por estímulos que se encuentran normalmente en la EP, las células se estimularon con N-α-syn 0,5 M. La N-α-syn agregada presente como cuerpos citoplasmáticos en la EP se liberan después de la muerte de las neuronas
- 30 dopaminérgicas y son un componente importante de los cuerpos de Lewy (Zhang et al. (2005) FASEB J., 19:533-42). Se ha planteado la hipótesis de que estas proteínas agregadas sirven como un estímulo para la activación microglial (Gendelman, H. (2006) Neurotoxicology 27:1162; Thomas et al. (2007) J. Neurochem. 100:503-19). Una vez más, el nivel de peróxido de hidrógeno se redujo significativamente con la adición de sobrenadantes de los BMM cargados con el complejo de catalasa-poli-ion (Figura 14D). En conjunto, este estudio sugiere que el complejo
- 35 catalasa-poli-ion liberado de los BMM puede atenuar el estrés oxidativo resultante de la activación de la microglía. De hecho, el complejo catalasa-poli-ion liberado de los BMM disminuyó la cantidad de H₂O₂ significativamente más que la catalasa "desnuda", lo que indica que los complejos de poli-iones preserva eficazmente la actividad enzimática de la catalasa en los BMM.
- 40 Para determinar si los BMM portadores del complejo de catalasa-poli-ion podrían alcanzar subregiones del cerebro con enfermedad neuroinflamatoria activa reflejo de la EP humana, se utilizó el modelo MPTP. En dos grupos de ratones C57B1/6 intoxicados con MPTP se inyectó por vía intravenosa el complejo de polipéptido libre-poli-ion libre que contenía catalasa marcada con ¹²⁵I o recibió los BMM cargados con el complejo de catalasa-poli-ion transferido de forma adoptiva. Veinticuatro horas después de la inyección se produjeron aumentos significativos en los niveles
- 45 de radiactividad en el bazo, el hígado, el pulmón, el riñón y el cerebro en los grupos que recibieron la transferencia adoptiva en comparación con los grupos tratados con el complejo de catalasa-poli-ion de forma individual (Figura 15). Es de destacar que después de la transferencia adoptiva se encontró aproximadamente un 0,6 % de la dosis inyectada en el cerebro, lo que fue dos veces lo encontrado en los animales a los que se inyectó complejo de catalasa-poli-ion libre. En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que la transferencia adoptiva de BMM
- 50 cargados con el complejo enzima-poli-ion cargado puede aumentar la entrega de la enzima en el cerebro, así como en otros tejidos periféricos que se sabe que son sitios de migración tisular de macrófagos.

Se requiere un transporte eficiente de polipéptidos terapéuticos al cerebro para el éxito de las terapias para enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias. Con este fin, se examinó si los BMM podrían utilizarse como vehículos para el suministro de un potente antioxidante, catalasa. De hecho, hace tiempo se sabe que los macrófagos y la microglía, así como otros fagocitos mononucleares pueden endocitar nanomateriales coloidales, por ejemplo, liposomas o nanosuspensiones, y, posteriormente, llevar y liberar el fármaco en el sitio de la lesión tisular, infección o enfermedad (Dou et al. (2006) Blood 108:2827-35; Dou et al. (2007) Virology 358:148-158; Gorantla et al. (2006) J. Leukocyte Biol., 80:1165-1174; Daleke et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1024:352-66; Jain et al. (2003)
60 Int. J. Pharm., 261:43-55).

Además, también se investigaron las capacidades de los BMM para cruzar la BHE (Lawson et al. (1992) Neuroscience 48:405-15; Simard et al. (2004) FASEB J., 18:998-1000; Male et al. (2001) Prog. Brain Res., 132:81-93; Streit et al. (1999) Prog. Neurobiol., 57:563-81; Kokovay et al. (2005) Neurobiol. Dis., 19:471-8; Kurkowska-Jastrzebska et al. (1999) Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 59:1-8; Kurkowska-Jastrzebska et al. (1999) Exp. Neurol., 156:50-61; Simard et al. (2006) Mol. Psychiatry 11:327-35). En particular, se demostró que los monocitos se infiltran

65

23

en el cerebro en el modelo de MPTP de ratón de EP (Kokovay et al. (2005) Neurobiol. Dis., 19:471-8; Kurkowska-Jastrzebska et al. (1999) Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 59:1-8; Kurkowska-Jastrzebska et al. (1999) Exp. Neurol., 156:50-61). De hecho, la toxicidad de MPTP estimuló aumentos transitorios y globales de la tasa de infiltración de monocitos en el mesencéfalo, el estrato, el tabique, y el hipocampo. En estos estudios previos, la acumulación máxima de los monocitos-macrófagos en el cerebro se observó 1 día después del tratamiento con MPTP. Sobre la

- 5 máxima de los monocitos-macrófagos en el cerebro se observó 1 día después del tratamiento con MPTP. Sobre la base de estos datos, parece que los monocitos cargados con catalasa se transfirieron de forma adoptiva en ratones tratados con MPTP pueden liberar la enzima a las regiones del cerebro más afectadas en la EP, incluyendo la sustancia negra y el cuerpo estriado.
- Para proteger contra la degradación por la catalasa dentro de los BMM, la proteína se inmovilizó en el complejo de ionómero de bloque con un copolímero de bloque catiónico, PEI-PEG. Las nanopartículas resultantes tenían un tamaño de aproximadamente 60 a 100 nm y eran estables en condiciones fisiológicas (pH, fuerza iónica). La composición y la estructura de los complejos de catalasa-poli-ion se alteraron para lograr una carga alta en los BMM y preservar la actividad de catalasa. La internalización de partículas extrañas, así como la secreción mediante
- 15 exocitosis, es una de las funciones más básicas en los macrófagos (Stout et al. (1997) Front. Biosci., 2:d197-206). En el presente documento se ha demostrado que los BMM pueden acumular una cantidad significativa del complejo de polipéptido-poli-ion (aproximadamente 30 µg de catalasa/10⁶ células) en un período de tiempo relativamente corto (aproximadamente 40-60 minutos), seguido de su liberación sostenida durante 4- 5 días en el medio externo. Esto también sugiere que las células cargadas con el complejo de catalasa-poli-ion después de la transferencia
- 20 adoptiva pueden tener el tiempo suficiente para llegar al cerebro y liberar catalasa. Además, se informó (Schorlemmer et al. (1977) Clin. Exp. Immunol., 27:198-207; Allison et al. (1974) Symp. Soc. Exp. Biol., 419-46; Cardella et al. (1974) Nature 247:46-8) que la exocitosis se puede estimular mediante la activación de monocitos y macrófagos. Los experimentos anteriores muestran que la liberación del complejo de polipéptido-poli-ion por BMM se puede mejorar mediante la estimulación con PMA. También se ha demostrado anteriormente que el complejo de
- 25 ionómero de bloque protege la actividad de catalasa en el interior de las células huésped. En particular, los BMM cargados con el complejo de enzima-poli-ion liberó la enzima activa en el medio durante al menos 24 horas. Además, los sobrenadantes de cultivo recogidos de los BMM cargados con complejo de polipéptido-poli-ion tenían potentes efectos antioxidantes en el ensayo de ROS producidas por microglía activada, ya sea con N-α-syn o TNF-α. Por lo tanto, estos modelos de cultivo celular indican que el los BMM cargados con complejo de polipéptido-poli-ion
- 30 pueden mitigar el estrés oxidativo asociado con el proceso neurodegenerativo. Finalmente, las pruebas *in vivo* indican que la transferencia adoptiva de los BMM cargados con complejo de polipéptido-poli-ion pueden aumentar el suministro de enzima marcada en los tejidos, incluyendo una duplicación de la cantidad de la enzima en el cerebro en ratones tratados con MPTP. Curiosamente, se encontró una cantidad considerable de la enzima marcada también en el cerebro después de la inyección del complejo de polipéptido-poli-ion solo. Es posible que el complejo 35 de polipéptido-poli-ion pueda ser captado por los monocitos circulantes, que después transportan la enzima en el
- 35 de polipéptido-poli-ion pueda ser captado por los monocitos circulantes, que después transportan la enzima en e cerebro.

Ejemplo 6

- 40 Visualización de imágenes y estudios del sistema de formación de imágenes in vivo (IVIS): En ratones BALB/C se inyectó MPTP (para inducir neuroinflamación relacionada con la EP) y se les afeitó (para reducir el bloqueo de la fluorescencia por el pelo). El complejo de polipéptido-poli-ion (PEI-PEO; Z = 1) marcado con Alexa 680 se cargó en BMM y, a continuación, se administraron los monocitos i.v. a los ratones tratados con MPTP (50 ml/ratón). Se realizaron imágenes de los ratones utilizando el IVIS a varios intervalos de tiempo (Fig. 16). Se encontró una cantidad significativa del complejo de polipéptido-poli-ion en el cerebro intoxicado con MPTP. De manera
- 45 Cantidad significativa del complejo de polipeptido-poli-ion en el cerebro intoxicado con MPTP. De manera significativa, no se detectó fluorescencia en el cerebro de los ratones de control no tratados con MPTP, lo que indica que los BMM facilitaron el suministro del complejo de polipéptido-poli-ion en los puntos de inflamación a través de la BHE.
- 50 Evaluación histopatológica de la toxicidad de los BMM cargados con el complejo de polipéptido-poli-ion in vivo. Se inyectó a ratones C57BL/6 sanos monocitos cargados con el complejo de polipéptido-poli-ion (10 ml/ratón) o PBS (grupo de control). 48 horas después se extrajeron el cerebro, el hígado, el bazo y los riñones en la necropsia. Las secciones de los órganos teñidos con H y E codificados se examinaron mediante microscopia óptica. No se encontraron signos de apoptosis, rotura de la BHE, respuesta neuroinflamatoria de la muerte de las células neuronales en el cerebro; esteatosis macrovesicular y necrosis de los hepatocitos; signos de colestasis en el hígado;
- o signos de necrosis tubular aguda en los riñones.

Neuroprotección del complejo de polipéptido-poli-ion cargado en BMM contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP en ratones. Para evaluar el efecto neuroprotector del complejo de polipéptidopoli-ion, se inyectó a los ratones intoxicados con MPTP i.v. BMM cargados con el complejo de polipéptido-poli-ion y se controlaron los niveles del metabolito neuronal cerebral N-acetil aspartato (NAA) en el SNpc y el cuerpo estriado (las regiones más afectadas en la enfermedad humana) al séptimo día del tratamiento. Las inyecciones de MPTP causaron una pérdida significativa de NAA en SNpc y el cuerpo estriado de los ratones de control (Fig. 17). Por el contrario, no hubo una reducción de los niveles de NAA en los ratones intoxicados con MPTP tratados con el complejo polipéptido-poli-ion cargado en los BMM. En estudios adicionales, se observó que los cerebros, particularmente la SNpc y el cuerpo estriado, de los ratones intoxicados con MPTP y, que después habían recibido

24

BMM cargados con complejos de catalasa-poli-ion, niveles reducidos de inflamación, medida por astrocitosis frente a los niveles de control de los ratones después de dos días. Lo anterior indica que el complejo catalasa-poli-ion tiene una capacidad neuroprotectora durante la neurodegeneración dopaminérgica inducida por MPTP.

5 Ejemplo 7

La administración periférica del complejo CuZnSOD-poli-ion inhibe la respuesta de la presión arterial aguda de Angll administrada centralmente.

- El complejo CuZnSOD-poli-ion descrito en el Ejemplo 3 se utilizó para proporcionar evidencia de que el complejo 10 CuZnSOD-poli-ion administrado periféricamente puede modular la señalización de Angll en el cerebro. Específicamente, el experimento estudió los efectos del complejo CuZnSOD-poli-ion administrado periféricamente (intracarótidea) sobre el aumento agudo de la presión arterial inducido por Angll (100 ng) administrado ICV. Los cambios inducidos por Angll ICV en la presión arterial media (PAM) se registraron en coneios 0, 1, 2 y 5 días
- 15 después de la administración intracarotídea del complejo CuZnSOD-poli-ion o CuZnSOD libre. El cambio en la PAM tras la administración de Angll ICV se redujo drásticamente 1 y 2 días después del tratamiento con el complejo CuZnSOD-poli-ion EN comparación con la respuesta el día 0 (Fig. 18). Por el contrario, el tratamiento con la proteína CuZnSOD libre, que es activa pero incapaz de atravesar las membranas celulares, no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de la presión arterial inducida por Angll ICV (Fig. 18). Estos datos indican que el complejo CuZnSOD-poli-
- 20 ion administrado periféricamente es capaz de entrar en las neuronas sensibles a Angll en el SNC y modular las respuestas cardiovasculares centrales mediadas por AngIII. De hecho, en el presente documento se describen métodos de tratar la hipertensión en un paciente, que comprenden la administración de una composición que comprende
- 25 a) Al menos un complejo que comprende superóxido dismutasa de cobre cinc (CuZnSOD) y un polímero sintético que comprende al menos una carga opuesta a la carga de la CuZnSOD, y b) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El complejo que comprende CuZnSOD y un polímero sintético que comprende al menos una carga opuesta a la carga de la CuZnSOD puede está contenido dentro de una célula, que se administra a un paciente.

Ejemplo 8

30

35

45

El factor de neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una proteína neurotrófica básica de peso molecular de 27,3 kDa con el punto isoeléctrico de 10,23. El BDNF tiene una red de carga positiva (+ 9,5) a pH neutro (Philo et al (1994) J. Biol Chem., 269:... 27840 a 27846). Por lo tanto, se utilizó un copolímero de bloque aniónico, PEO-b-poli

(metacrilato de sodio) (PEO-b-PMA) (el pKa del grupo carboxílico es 5,2) para incorporar BDNF en el complejo de poli-ion. Los complejos se preparan mediante simple mezcla de soluciones acuosas tamponadas de los componentes del copolímero de bloque y la proteína. La relación de polímero/proteína en las mezclas se calculó dividiendo la concentración total calculada de los grupos carboxílicos de PEO-b-PMA por la concentración del total 40 de residuos de Lys y Arg en la proteína. Tras la mezcla, estos sistemas permanecieron transparentes y no se observó precipitación.

Herceptin (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-humano frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/c-erbB2). Se ha demostrado que Herceptin es eficaz contra los cánceres de mama metastásicos primario y extracraneal que sobreexpresan HER2. Sin embargo, en pacientes con metástasis cerebral, la barrera hematoencefálica limita su uso (Kinoshita et. al. (2006) PNAS, 103:11719-11723).

Herceptin es una proteína básica de peso molecular de 145,5 kDa con punto isoeléctrico de 8,45. Herceptin tiene una carga neta positiva (+ 12) a pH neutro. Se utilizó un copolímero de blogue aniónico, PEO-b-poli (metacrilato de 50 sodio) (PEO-b-PMA) (el pKa del grupo carboxílico es 5,2) para incorporar Herceptin en el complejo de poli-ion. Los complejos se preparan mediante simple mezcla de soluciones acuosas tamponadas de los componentes del copolímero de bloque y la proteína. La relación de polímero/proteína en las mezclas se calculó dividiendo la concentración total calculada de los grupos carboxílicos de PEO-b-PMA por la concentración del total de residuos de Lys y Arg en la proteína. Tras la mezcla, estos sistemas permanecieron transparentes y no se observó precipitación.

55

La leptina es una hormona proteica de 18,7 kDa que desempeña un papel clave en la regulación de la ingesta de energía y el gasto de energía, incluyendo la regulación (disminución) del apetito y (aumento) del metabolismo. La leptina tiene un punto isoeléctrico de 5,85 y una carga neta negativa (aproximadamente -2) a pH fisiológico. Se usó ionómero de bloque catiónico de la arquitectura de injerto, poli-L-lisina-injerto-poli (óxido de etileno), PLL-g-PEO (2),

que contenía aproximadamente 1,4 cadenas PEO injertadas sobre una estructura principal de PLL, para preparar 60 complejos de leptina-poli-ion. Los complejos se prepararon mediante simple mezcla de soluciones acuosas tamponadas de los componentes del copolímero de injerto y la proteína. La relación de polímero/proteína en las mezclas se calculó dividiendo la concentración total de aminoácidos de PLL-g-PEO(2) por la concentración del total de residuos de Asp y Glu en la proteína. Tras la mezcla, estos sistemas permanecieron transparentes y no se

65 observó precipitación.

Ejemplo 9

Prevención de inflamación en ratones intoxicados con MPTP por monocitos cargados con complejos de catalasapoli-ion.

5

Para la inducción de cambios patológicos caracterizados por EP, se administró a ratones C7BL/6 macho receptores 18 mg de MPTP de base libre/kg de peso corporal liberado en PBS por 4 inyecciones intraperitoneales administradas cada dos horas (MPTP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)). Se inyectó a los ratones de control solución salina i.v. 18 horas más tarde, se inyectó a la mitad de los ratones intoxicados con MPTP i.v. monocitos

- 10 cargados con complejo de catalasa-poli-ion (10 ml/ratón) y a la otra mitad se inyectó solución salina i.v. La fase activa de la muerte neuronal y el máximo de las actividades neuroinflamatorias se produce aproximadamente 2 días después de la inyección de MPTP Por lo tanto, dos días más tarde, se aislaron las áreas del mesencéfalo de ratones intactos, intoxicados con MPTP intoxicados con MPTP y tratados después con monocitos cargados con catalasa, los cerebros se congelaron rápidamente, y se incluyeron en el medio OCT. El análisis inmunohistoquímico se realizó en
- 15 láminas intactas de 30 µm de espesor fijado en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas y después se fijó en solución de sacarosa durante 48 horas a 4 °C. Las láminas de tejido se almacenaron en azida sódica al 0,01 % en PBS y se lavaron en PBS tres veces antes de la tinción. Después, las láminas de tejido se bloquearon durante 1 hora en suero de cabra normal al 7 % (NGS).
- 20 Para la activación de la microglía (tinción Mac-1), los tejidos seccionados se inmunotiñeron con anticuerpo primario CD11b (AbD Serotec, Raleigh, NC) diluido a 1: 200 en 7 % de NGS durante la noche a 4 °C. Las muestras se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-rata Alexa Fluor 594 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), diluido a 1:200 en 7 % de NGS durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Para la astrocitosis, secciones de tejido se permeabilizaron con 1 % de Triton X-100 en 5 % de NGS (suero de cabra normal) en PBS durante 10 minutos y se bloquearon durante 1 hora con 5 % de NGS, después se incubaron con Ac primarios de la proteína ácida fibrilar antiglial de conejo diluidos a1:1000 en 5 % de NGS durante 18 horas a 4 °C. Las muestras se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo 488 (Molecular Probes), diluido a 1:200 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las láminas se montaron en Aquamount. La inmunorreactividad se evaluó mediante análisis fluorescente. La intensidad de fluorescencia se calculó utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud; NIH). El área se midió como la función del nivel de expresión de CD11b utilizando el software

Grupos de tratamiento	Intensidad de la fluorescencia (píxeles)	
	Activación de microglía	Astrocitosis (tinción
	(tinción Mac-1)	con GFAP)
Ratones intactos (inyección de solución salina)	28,3 ± 13,0	209,3 ± 3,8
Intoxicados con MPTP	4059,9 ± 1413,0	316,9 ± 4,6
Intoxicados con MPTP y después tratados con el complejo	70,9 ± 36,8	95,3 ± 8,3
catalasa-poli-ion cargado en los BMM		

Tabla 13: Análisis inmunohistoquímico para la activación de la microglía y astrocitosis en el sistema nigroestriado

35

Imagen.

Los datos presentados en la Tabla 13 indican claramente que las inyecciones de MPTP producen una inflamación importante dentro del pars compacta de la sustancia negra y dio lugar a la activación de la microglía y astrocitosis. Por el contrario, el tratamiento de los ratones inyectados con MPTP con monocitos cargados con catalasa evitó la neuroinflamación al nivel en animales sanos (Tabla 13)

40

Efecto de neuroprotección de los monocitos cargadas con complejo de catalasa-poli-ion contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP en ratones

- Para evaluar de forma cuantitativa y no invasiva el efecto de la neuroprotección aumentada por catalasa en la sustancia negra y el cuerpo estriado causada por la progresión de la EP en ratones intoxicados con MPTP, se obtuvieron nuevas lecturas de neuroimagen que evalúan los niveles de aspartato N-acetil neuronal (NAA) mediante magnética imágenes espectroscópicas de resonancia (MRSI).
- Con este propósito, primero, los ratones se pre-escaneados antes de las inyecciones de MPTP. Después, se inyectó a la mitad de los ratones BMM cargados con el complejo de catalasa-poli-ion (25 millones de de BMM/100 µl/ratón). Los ratones tratados con MPTP a los que se inyectó PBS sirvieron como controles para la máxima neurodegeneración. El metabolito neuronal aspartato N-acetil (NAA) en el cerebro en el SNpc y el cuerpo estriado se evaluaron por MRSI al séptimo día de tratamiento. La MRI y la MRSI se adquirieron en un sistema de Bruker Avance cm 7T/21 que funciona a 300,41 MHz usando transmisión en bobina en volumen 72 mm con desacoplamiento activo
- y una bobina de superficie receptora de 1,25 x 1,5 cm integrada en el laboratorio. Las imágenes de RM se adquirieron con un FOV de 20 mm, 25 cortes contiguos de 0,5 mm de espesor, orden de lámina intercalada, 128 x 128 matriz, ocho ecos, 12 ms de espaciamiento de eco, reorientados con la fase de CPMG ciclado con pulsos de reenfoque de RF para formar ocho imágenes utilizadas para el mapeo T2 y corregistró con la histología. Las

imágenes espectroscópicas se obtuvieron utilizando una excitación binomial numéricamente optimizada reenfocada utilizando tres pulsos de reenfoque selectivos de láminas ortogonales (excitación binomial con reenfoque selectivo de volumen, BEVR). Las imágenes espectroscópicas se obtuvieron mediante la selección de un volumen de 8 x 4,2 x 1,5 mm de interés, usando 24 x 24 de codificación espacial sobre un campo de 20 mm de visión (FOV), con cuatro

- 5 promedios en la lámina contiene el SNpc produciendo un tamaño de vóxel nominal de 1 µl. El tiempo total de adquisición es de 80 min. Procesamiento de MRSI. Las imágenes espectroscópicas fueron transformadas de Fourier en las dimensiones de codificación de fase y reformateadas mediante Matlab (Mathworks Inc, Nantick, MA). Los espectros se ajusta utilizando AMARES en el paquete jMRUI. Los parámetros del modelo y las limitaciones se generaron utilizando espectros de fantasmas.
- 10

Las imágenes espectroscópicas de agua no suprimida se obtuvieron con los parámetros de los espectros de metabolito idénticos a excepción de: TR = 1 s, NA = 1 y = ganancia del receptor 1000. TR = 1 s, NA = 1 y ganancia del receptor = 1000. El agua no suprimida se utiliza como patrón interno para cada vóxel con el fin de cuantificar las concentraciones del metabolito de los datos de MRSI con supresión de agua. Un tecnólogo, cegados a la fuente de

- 15 datos, ajusta los datos. La calibración de la relación de metabolito de la amplitud de señal de agua en las respectivas ganancias del receptor se midió en estudios con fantasmas. Los cálculos se realizaron utilizando Matlab (The MathWorks Inc, Nantick, MA) y las concentraciones del metabolito se obtuvieron como mapas de metabolitos ASCII (para el desarrollo de bases de datos) y binarios (para superposición en resonancia magnética superposición).
- 20 Como se ve en la Figura 19, las inyecciones de MPTP causaron una pérdida significativa de NAA en el SNpc y el cuerpo estriado de los ratones de control. Por el contrario, no hubo una reducción de los niveles de NAA en los ratones intoxicados con MPTP tratados con el complejo polipéptido-poli-ion cargado en los BMM. Estos resultados indicaron que las células cargadas pueden llegar a la región dañada del cerebro a niveles significativos y liberar catalasa activa para causar efectos neuroprotectores posteriores en un modelo murino de EP.

25 Ejemplo 10

Acumulación del complejo de catalasa-poli-ion en diversos tipos de portadores de células.

- 30 Además de los BMM, otros portadores de células, como las células dendríticas (DC) o los linfocitos T, que también se demostró que infiltraban el cerebro en condiciones inflamatorias, se pueden utilizar para el suministro del complejo catalasa-poli-ion. Los experimentos se realizaron de carga similares a los de BMM. Brevemente, las CD o los linfocitos T se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1x10⁶ células/pocillo y se incubaron con el complejo de catalasa-poli-ion marcado con Alexa Fluor 594 (relación de carga +/- (Z) = 1) para diversos intervalos de
- 35 tiempo. Después, las células se lavaron y se rompieron con 1 % de Triton X100. La cantidad de fluorescencia acumulada en los BMM se analizó y se normalizó para la cantidad de células (Tabla 14).

Tiempo (min)	Cantidad de la catalasa cargada (µg/mg prot.)		
	BMM	CD	Linfocitos T
5	104,75 ± 25,1	419,78 ± 25,1	118,96 ± 34,8
15	277,45 ± 20,3	986,22 ± 108,98	279,93 ± 31,8
30	455,26 ± 45,1	1766,52 ± 206,07	411,89 ± 71,38
45	502,24 ± 84,7	1824,12 ± 132,75	271,58 ± 8,36
60	513,4 ± 25,1	1798,14 ± 78,91	564,31 ± 94,17
90	630,2 ± 46,5	2796,92 ± 62,56	542,19 ± 35,95

Tabla 14: Acumulación del complejo catalasa-poli-ion en BMM, CD y linfocitos T.

40 Se demuestra que, similar a los BMM, ambas células rápidamente (en 1 hora) captan una cantidad significativa de nanopartículas de catalasa (112 µg, 21 µg y 30 µg por 10⁶ CD, linfocitos T y BMM, respectivamente). Esto permite el uso de varios sistemas portadores de células para asegurar el suministro exitoso del complejo de catalasa-poli-ion en el cerebro.

45 Ejemplo 11

Reticulación del complejo de catalasa/ poli-ion

Para estabilizar los complejos se han usado diversos agentes enlazadores de entrecruzamiento del copolímero de bloque con la proteína.

Glutaraldehído

Para obtener el complejo catalasa poli-ion, se mezclaron 0,5 ml de solución de catalasa (0,5 mg/ml) en tampón de fosfato 60 mM a pH = 7,4 con 0,5 ml de solución de copolímero de bloque (0,25 mg/ml) en el mismo tampón. Después, se añadieron 4 µl (100 x exceso (una cantidad de grupos NH₂-) de glutaraldehído (Fluka, # 49632, solución acuosa al 25 %) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura

ambiente. A continuación se añadieron 7,5 µl de solución de borohidruro de sodio (5x10⁻² M) en NaOH 1M en dos porciones separadas por 20 minutos. La mezcla se incubó adicionalmente durante una hora a temperatura ambiente, y se purificó por filtración en gel en una columna de Sephadex G25.

5 N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)

El complejo de catalasa poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 1,5 mg de EDC (30 x exceso (una cantidad de grupos COO-) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.

Sal de sodio de bis-(sulfosuccinimidil)suberato (BS3)

- El compleio de catalasa poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 2 mg de BS3 15 (7 x exceso (una cantidad de grupos lisina) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.
- Una reticulación de complejos de catalasa poli-ion se confirmó mediante transferencia Western. Las muestras se 20 sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS) que destruyó el complejo no unido. A continuación, los geles se transfirieron y las bandas de proteínas se visualizaron con el anticuerpo primario frente a catalasa (abcam, ac 1877). La Figura 20 proporciona imágenes de los complejos de catalasa/poli-ion reticulados utilizando diversos enlazadores. Calle 1: Ultimo; calle 2: catalasa sola; calle 3: complejo catalasa-poli-ion unido con EDC; calle 4: complejo catalasa-poli-ion unido con GA; calle 5: complejo de 25
- catalasa poli-ion unido a BS3.

catalasa libre (calle 2).

Como se ve en la figura 20 se alcanzó la conjugación completa con GA, lo que dio lugar a la ausencia de la banda de catalasa debido a los complejos grandes que no entraron en el gel (calle 4, sin banda de catalasa). El uso de EDC como agente enlazador (línea 3) también dio como resultado reticulación aunque no se alcanzó la conjugación completa en estas condiciones, ya que está presente alguna banda de catalasa libre. La unión con BS3 (calle 5) produjo complejos más pequeños que entraron en el gel, aunque con retardo en comparación con la banda de

Reticulación del complejo de superóxido dismutasa (SOD)/ poli-ion

Se obtuvieron complejos de reticulación similares con SOD y el copolímero de bloque.

GA:

10

30

35

40 Para obtener el complejo poli-ion SO, se mezclaron 0,5 ml de solución de SOD (1 mg/ml) en tampón de fosfato 60 mM a pH = 7,4 con 0,5 ml de solución de copolímero de bloque (0,25 mg/ml) en el mismo tampón. Después, se añadieron 10 µl (100 x exceso (una cantidad de grupos NH2-) de GA a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 5 µl de solución de borohidruro de sodio (5x10-2 M) en NaOH 1M en dos porciones separadas por 20 minutos. La mezcla se incubó adicionalmente 45 durante una hora a temperatura ambiente, y se purificó por filtración en gel en una columna de Sephadex G25.

EDC

El compleio de SOD poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 1.5 mg de EDC 50 (12 x exceso (una cantidad de grupos COO-) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.

BS3 55

> El complejo de SOD poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 1,7 mg de BS3 (4,5 x exceso (una cantidad de grupos lisina) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.

60

Una reticulación de complejos de poli-ion SOD se confirmó mediante transferencia Western. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS) que destruyó el complejo no unido. A continuación, los geles se transfirieron y las bandas de proteínas se visualizaron con el anticuerpo primario frente a SOD (Calbiochaem, # 574597). La Figura 21 proporciona imágenes de los

65 complejos de SOD/poli-ion reticulados utilizando diversos enlazadores. Calle 1: Ultimo; calle 2: SOD sola; calle 3: Poli-ion SDO no unido; calle 4: complejo de poli-ion SOD unido con EDC; calle 5: complejo de poli-ion SOD unido con GA; calle 6: complejo de poli-ion SOD unido a BS3.

Como se ve en la figura 21, la reticulación con EDC (línea 4) no logró la conjugación completa en estas condiciones específicas porque hay alguna banda de SOD libre presente. Por el contrario, la conjugación completa se logró con GA (calle 5) y BS3 (calle 6), que dio como resultado la ausencia de la banda de SOD debido a los grandes complejos obtenidos que no entraron en el gel.

Reticulación del complejo de catalasa/ poli-ion SOD

- 10 En general, para obtener el complejo de catalasa/poli-ion SOD mixto, primero, se mezclaron catalasa y SOD a pH 6,8 (la catalasa está cargado negativamente (PI 7,28) y la SOD está cargada positivamente (PI 6,32) a este pH). Después, se añadió el copolímero de bloque y se usaron diversos enlazadores para conjugar el copolímero de bloque con las proteínas similares a la síntesis descrita anteriormente.
- 15 GA:

5

Para obtener el complejo catalasa/poli-ion SOD, se disolvieron 1 mg de catalasa y 1,33 mg de SOD en tampón de fosfato 60 mM, pH = 6,8. A continuación, 1,3 mg del copolímero de bloque se añadieron a la mezcla y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 5 μ l (9 x exceso (una cantidad de grupos NH₂-)

20 de GA a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante la noche (8 horas) a 4 °C. A continuación, 6,5 μl de solución de borohidruro de sodio (5x10⁻² M) en NaOH 1 M se añadió por dos porciones de 20 minutos de diferencia. La mezcla se incubó adicionalmente durante una hora a temperatura ambiente, y se purificó por filtración en gel en una columna de Sephadex G25.

25 EDC

El complejo de catalasa/SOD poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 10 mg de EDC (20 x exceso (una cantidad de grupos COO-) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se incubó durante la noche (8 horas) a 4 °C. Tras la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.

BS3

El complejo de catalasa/SOD poli-ion se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Después, se añadieron 8,6 mg de BS3 (10 x exceso (una cantidad de grupos lisina) a la mezcla con agitación enérgica. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente mediante filtración en gel en columna de Sephadex G25.

EDC-sulfo-NHS

40

45

30

Para estabilizar el complejo intermedio de EDC se usó sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS). Para este propósito, se obtuvo catalasa complejo poli-ion/SOD como se describe anteriormente. Entonces, (20 x exceso (una cantidad de grupos COO-) se añadieron 10 mg de EDC a la mezcla con agitación enérgica. Después de la adición de EDC, se añadieron 2 mg de sulfo-NHS, y la mezcla de reacción se incubó durante 3 horas a la habitación temperatura. Después de la incubación, la mezcla se purificó adicionalmente por filtración en gel en una columna de Sephadex G25.

Una reticulación de complejos de Catalasa/poli-ion SOD se confirmó mediante transferencia Western. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel en gel de poliacrilamida (10 %) bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS).
A continuación, los geles se transfirieron y las bandas de proteínas se visualizaron con el anticuerpo primario a la catalasa y SOD por separado. La Figura 22A proporciona imágenes de los complejos de catalasa/SOD/poli-ion reticulados utilizando diversos enlazadores marcados con ac para la catalasa. Calle 1: complejo no unido de poli-ion catalasa/SOD; complejos de catalasa/SOD /poli-ion unidos con GA (EDC; calle. 5: complejo poli-ion SOD unido a GA (calle 2), EDC (calle 3); BS3 (calle 4); EDC-S-NHS (calle 5).

55

La Figura 22B proporciona imagines de complejos de catalasa/SOD/poli-ion reticulados usando varios enlazadores marcados con ac frente a SOD. Calle 1: Complejo no unido de catalasa/poli-ion de SOD, complejos de catalasa/poli-ion de SOD unidos con GA (EDC; calle 5: Complejo unido de catalasa/poli-ion con GA (calle 2); EDC (calle 3); BS3 (calle 4); EDC-S-NHS (calle 5).

60

Los resultados confirmaron los datos a partir del gel teñido con ac para la catalasa. Una conjugación completa se logra con GA (calle 2); reticulación con EDC (calle 3) dio lugar a la conjugación no completa (hay tinción significativa de SOD libre presente). Mediante el uso del enlazador BS3 (línea 4) y sulfo-N-hidroxisuccinimida junto con EDC (línea 5) dio lugar a la conjugación casi completa.

65

Ejemplo 12

Visualización de la biodistribución de BMM en ratones intoxicados con MPTP

- 5 Antes del experimento, se anestesió a los ratones Balb/c hembra con inyecciones i.p. de pentobarbital a la dosis de peso corporal 30-40 mg/kg de peso corporal, se les afeitó y depiló (para reducir el bloqueo de la fluorescencia por el pelo). Se mantuvo a los ratones con dieta líquida durante 72 horas (para eliminar la autofluorescencia en el estómago y el intestino de alimentos sólidos). Se administró a ratones C7BL/6 macho receptores 18 mg de MPTP de base libre/kg de peso corporal liberado en PBS por 4 inyecciones intraperitoneales administradas cada dos horas
- 10 (MPTP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)). 18 horas después, se invectó en la vena de la cola de los ratones BMM marcados con Li-COR (50 ml/ratón) cargados con el complejo de catalasa-poli-ion. Después, se anestesió los ratones con una mezcla de isoflurano 1,5 % con óxido nitroso al 66 % y el resto del oxígeno y se colocaron en la cámara de formación de imágenes. La biodistribución de los BMM marcados cargados con el complejo de catalasapoli-ion se determinó midiendo la fluorescencia *in vivo* de Li-COR detectado mediante un sistema de formación de
- 15 imágenes IVIS 200 Series Imaging Gas Anasthesia System. Los BMM marcados con Li-COR cargados con complejos de catalasa-poli-ion marcados con Alexa 680 comenzaron a acumularse en el cerebro 2 horas después de la inyección i.v. alcanzaron un máximo 4 horas después de la inyección y permanecieron elevados durante al menos 48 horas después de la inyección (Figura 23). Estos datos indican que se los BMM cargados con complejo de catalasa-poli-ion administrados periféricamente fueron capaces de alcanzar y acumularse en el cerebro de ratones 20 intoxicado con MPTP en cantidades significativas.

Si bien se han descrito algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención y se ilustran específicamente anteriormente, no se pretende que la invención esté limitada a dichas realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico del sistema nervioso central, comprendiendo dicha composición:

5

10

a) al menos un complejo que comprende un polipéptido terapéutico y un polímero sintético, en donde dicho polímero sintético es un copolímero de bloque que comprende al menos un segmento no iónico soluble en agua y al menos un segmento de poli-ion, en donde dicho complejo se autoensambla en nanopartículas que tienen una morfología de núcleo-cubierta, en la que el núcleo comprende el polipéptido terapéutico y el segmento de poli-ion del copolímero de bloque, y en donde dicho segmento de poli-ion comprende al menos una carga opuesta a la carga del polipéptido terapéutico, y

b) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho al menos un complejo está
 comprendido dentro de una célula aislada.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polímero sintético está cargado negativamente y dicho polipéptido terapéutico tiene una carga positiva neta a pH 7,4 o en la que dicho polímero sintético está cargado positivamente y dicho polipéptido terapéutico tiene una carga negativa neta a pH 7,4.

4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho segmento de poli-ion se selecciona del grupo que consiste en polialquilenimina, polilisina, poliarginina, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, ácido poliacrílico, polialquileno acrílico y sus copolímeros.

25

20

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un anticuerpo, una hormona y un factor de crecimiento.

30 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido terapéutico exhibe actividad terapéutica en el sistema nervioso central.

 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en factores endocrinos, factores de crecimiento, factores
 35 liberadores hipotalámicos, factores neurotróficos, factores paracrinos, polipéptidos neurotransmisores, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, citocinas, endorfinas, antagonistas de polipéptidos, agonistas para un receptor expresado por una célula del SNC, polipéptidos de enfermedad de almacenamiento lisosomal y proteínas antiapoptóticas.

40 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en butirilcolinesterasa, acetilcolinesterasa, reactivadores de colinesterasa, eliminadores de organofosfato e inhibidores de carbamato.

10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha célula se aísla del paciente que se va a tratar.

50 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha célula aislada es una célula inmune.

12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha célula inmune se selecciona del grupo que consiste en monocitos de médula ósea, monocitos, macrófagos, monocitos derivados de médula ósea,
 células dendríticas, linfocitos, células T, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho trastorno neurológico es una enfermedad o un trastorno neuroinflamatorios y dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

60

45

14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad o dicho trastorno neuroinflamatorios son la enfermedad de Parkinson.

15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho segmento no iónico soluble en agua es poli(óxido de etileno). 16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha composición se formula para administración intravenosa.



Figura 1



Figura 1G

ES 2 609 913 T3



Figura 2A



Figura 2B



Figura 3



Figura 4A



Figura 4B



Figura 5A



Figura 5B



Figura 5C



Figura 6



Figura 7



Figura 8A



Figura 8B



Figura 9A



Figura 9B



Figura 10



Figura 11



Figura 12A



Figura 12B



Figura 13



Figura 14



Figura 15



Figura 16



Figura 17



Figura 18



Figura 19



Figura 20



Figura 21



Figura 22A



Figura 22B

2 h



Figura 23