

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 226**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 31/4172 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2014 PCT/US2014/018426**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14134070**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2014 E 14714815 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2961426**

54 Título: **Tratamiento de trastornos del sistema nervioso central mediante administración intranasal de inmunoglobulina G**

30 Prioridad:

26.02.2013 US 201361769673 P
06.08.2013 US 201361862814 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

FREY, WILLIAM, H.;
HANSON, LEAH RANAE, BRESIN;
POKROPINSKI, SHARON y
RAUSA, FRANCISCO, M., III

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 759 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de trastornos del sistema nervioso central mediante administración intranasal de inmunoglobulina G

5 **Antecedentes de la invención**

El sistema nervioso central (SNC) es el centro de procesamiento del sistema nervioso. Los trastornos del SNC pueden afectar al cerebro, la médula espinal y las terminaciones nerviosas, dando como resultado trastornos neurológicos y/o psiquiátricos. Los trastornos del SNC pueden estar provocados por herencia genética, traumatismo, infección, trastornos autoinmunitarios, defectos estructurales, tumores y accidente cerebrovascular. Determinados trastornos del SNC se caracterizan como enfermedades neurodegenerativas, muchas de las cuales son enfermedades genéticas hereditarias. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Huntington, ELA, hemiplejía espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, enfermedad por repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson. El tratamiento de los trastornos del SNC, por ejemplo, enfermedades genéticas del cerebro, tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer, sigue siendo un problema continuado.

La enfermedad de Alzheimer es una forma habitual de demencia asociada a la edad que provoca la pérdida gradual de la función cognitiva, incluyendo la memoria y las capacidades de pensamiento crítico. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica clínicamente a través de un hallazgo de pérdida progresiva de memoria y disminución de las capacidades cognitivas. Sin embargo, la confirmación de la enfermedad de Alzheimer no se produce hasta después de la muerte.

La enfermedad de Alzheimer es cada vez más prevalente en los países desarrollados, en los que se ha producido un aumento de la población de personas mayores debido en parte a la mejora de la atención sanitaria. Aunque menos del 1% de la población menor de 60 años se ve afectada por la enfermedad de Alzheimer, se estima que del 25% al 33% de las personas desarrollan alguna forma de Alzheimer a la edad de 85 años. A partir de 2012, a 5,4 millones de estadounidenses se les diagnosticó Alzheimer. A medida que la esperanza de vida continúa aumentando en todo el mundo, la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias asociadas a la edad también debería seguir creciendo.

La enfermedad de Alzheimer se clasifica generalmente o bien como de "inicio temprano", que se refiere a casos que comienzan a manifestarse entre los 30 y 60 años de edad en los individuos afectados, y el Alzheimer más habitual de "inicio tardío", en el que los síntomas se vuelven aparentes después de la edad de 60 años. Aunque sólo aproximadamente el 10% de todos los casos de Alzheimer son familiares, la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano se ha relacionado con mutaciones en la proteína precursora de amiloide (*app*), presenilina 1 (*pSEN1*) y presenilina 2 (*pSEN2*), mientras que la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío se ha relacionado con mutaciones en el gen de la apolipoproteína E (*apoE*) (Ertekin-Taner N., *Neurol Clin.*, 25:611-667 (2007)).

Histopatológicamente, esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la formación de placas de amiloide, ovillos neurofibrilares, angiopatía amiloide y degeneración granulovacuolar en la corteza cerebral (Mirra *et al.*, *Arch Pathol Lab Med.*, 117:132-144 (1993); Perl DP, *Neurol Clin.*, 18: 847-864 (2000)). Las placas de amiloide características, usadas para confirmar la enfermedad de Alzheimer en la autopsia, se forman en gran medida por la deposición de un pequeño péptido beta-amiloide (A β) derivado de la proteína precursora de amiloide (APP).

Hasta la fecha, la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado dos tipos de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: inhibidores de la colinesterasa, incluyendo donepezilo (por ejemplo, ARICEPT®), rivastigmina (por ejemplo, EXELON®), galantamina (por ejemplo, RAZADYNE®) y tacrina (por ejemplo, COGNEX®); y el inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA memantina (comercializado con varias marcas diferentes). Aunque no se ha identificado una cura para la enfermedad de Alzheimer, estas terapias sirven para aliviar los síntomas cognitivos, tales como pérdida de memoria, confusión y pérdida de las capacidades de pensamiento crítico en sujetos a los que se les diagnostica demencia asociada a la edad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). En total, se estima que el gasto en atención sanitaria en la enfermedad de Alzheimer y las demencias asociadas a la edad relacionadas en 2012 será de 200 mil millones de \$ sólo en los Estados Unidos (Factsheet, Alzheimer's Association, marzo de 2012).

Además de estas terapias aprobadas, varios estudios han sugerido que la inmunoglobulina intravenosa (IGIV) agrupada es eficaz para retrasar la progresión de los síntomas en pacientes con Alzheimer (Dodel RC *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Oct; 75(10):1472-4 (2004); Magga J. *et al.*, *J Neuroinflammation*, 7 de diciembre; 7:90 (1997); Relkin NR *et al.*, *Neurobiol Aging*, 30(11):1728-36 (2008); Puli L. *et al.*, *J Neuroinflammation* 29 de mayo; 9:105 (2012)).

Los productos de inmunoglobulina de plasma humano se usaron por primera vez en 1952 para tratar la deficiencia inmunitaria. Inicialmente, la administración intramuscular o subcutánea de inmunoglobulina isotipo G (IgG) aislada del plasma fueron los métodos de elección. Sin embargo, se desarrollaron posteriormente productos de IgG que podían administrarse por vía intravenosa, conocidos como inmunoglobulina intravenosa (IGIV), para permitir la administración

de mayores cantidades de IgG necesarias para el tratamiento eficaz de diversas enfermedades. Habitualmente, IGIV contiene las inmunoglobulinas de inmunoglobulina G (IgG) agrupadas del plasma de múltiples donantes, por ejemplo, más de cien o más de mil donantes de sangre. Estos productos de IgG purificados se usan principalmente en el tratamiento de tres categorías principales de estados médicos: (1) deficiencias inmunitarias: agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia (deficiencias inmunitarias primarias) y estados de inmunidad comprometida adquiridos (deficiencias inmunitarias secundarias), que presentan bajos niveles de anticuerpos; (2) enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y (3) infecciones agudas.

Específicamente, muchas personas con trastornos de inmunodeficiencia primaria carecen de los anticuerpos necesarios para resistir la infección. En determinados casos, estas deficiencias pueden complementarse mediante la infusión de IgG purificada, habitualmente a través de administración intravenosa (es decir, terapia con IGIV). Varios trastornos de inmunodeficiencia primaria se tratan habitualmente de ese modo, incluyendo agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), inmunodeficiencia común variable (IDCV), síndrome de hiper-IgM (HIM), inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) y algunas deficiencias de la subclase de IgG (Blaese y Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

Aunque el tratamiento con IgG puede ser muy eficaz para tratar trastornos de inmunodeficiencia primaria, esta terapia es sólo un reemplazo temporal de los anticuerpos que no se producen en el cuerpo, en lugar de una cura para la enfermedad. Por consiguiente, los pacientes dependen de dosis repetidas de terapia con IgG, generalmente alrededor de una vez al mes de por vida. Esta terapia impone una gran demanda en la producción continuada de composiciones de IgG. Sin embargo, a diferencia de otros productos biológicos que se producen a través de la expresión *in vitro* de vectores de ADN recombinante, la IgG se fracciona a partir de donaciones de sangre y plasma humanos. Por tanto, el nivel de IgG disponible comercialmente está limitado por el suministro disponible de donaciones de sangre y plasma.

Varios factores impulsan la demanda de IgG, incluyendo la aceptación de tratamientos con IgG, la identificación de indicaciones adicionales para las cuales la terapia con IgG es eficaz y el aumento del diagnóstico de pacientes y la prescripción de IgG. En particular, la demanda global de IgG aumentó más de cuatro veces entre 1990 y 2009, y continúa aumentando a una tasa anual de entre el 7% y el 10% (Robert P., *Pharmaceutical Policy and Law*, 11 (2009) 359-367). Por ejemplo, la Autoridad Nacional de Sangre de Australia informó que la demanda de IgG en Australia creció en el 11,1% para el ejercicio fiscal 2010-2011 (Informe anual de la Autoridad Nacional de Sangre de Australia 2010-2011).

Se ha informado que en 2007, se fraccionaron 26,5 millones de litros de plasma, generando 75,2 toneladas métricas de IgG, con un rendimiento de producción promedio de 2,8 gramos por litro (Robert P., citado anteriormente). Este mismo informe estimó que se espera que los rendimientos mundiales de IgG aumenten hasta aproximadamente 3,43 gramos por litro para 2012. Sin embargo, debido al crecimiento continuado de la demanda mundial de IgG, proyectado entre aproximadamente el 7% y el 14% anual entre ahora y 2015, será necesaria una mejora adicional del rendimiento global de IgG para satisfacer la demanda mundial. Uno de los factores que puede impulsar un aumento de la demanda de inmunoglobulinas humanas agrupadas (por ejemplo, IGIV) a lo largo de la próxima década es si la IgG se aprueba o no para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se estima que si estos tratamientos los aprueban los principales organismos públicos, se observará un aumento adicional del 5% en la demanda de IGIV (Robert P., citado anteriormente).

Debido en parte a la creciente demanda mundial y a las fluctuaciones en el suministro disponible de productos de inmunoglobulina, varios países, incluyendo Australia e Inglaterra, han implementado programas de gestión de la demanda para proteger los suministros de estos productos para los pacientes de mayor demanda en tiempos de escasez de productos. Por tanto, el desarrollo de metodologías que reduzcan la cantidad de inmunoglobulina G agrupada necesaria para tratar diversas indicaciones será fundamental a medida que el aumento de la demanda de inmunoglobulina agrupada comience a superar el aumento de la producción mundial de fabricación.

La inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada se fabrica según diferentes procedimientos dependiendo del fabricante específico. Sin embargo, el origen de la mayoría de los procedimientos de fabricación se encuentra en la cuarta entrega de una serie de artículos fundamentales publicados sobre la preparación y las propiedades de las proteínas séricas y plasmáticas, Cohn *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475). Este artículo describió por primera vez un método para el fraccionamiento con alcohol de proteínas plasmáticas (método 6), que permite el aislamiento de una fracción enriquecida en IgG de plasma humano.

Los procedimientos de Cohn se desarrollaron inicialmente para obtener albúmina con una pureza relativamente alta (95%) mediante precipitación fraccionada con alcohol. Sin embargo, Oncley *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550), Deutsch *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 1946, 164, 109-118) y Kistler y Nitschmann (*Vox Sang.*, 1962, 7, 414-424), se dieron cuenta de que precipitados de proteína particulares (fracción II y fracción II + III) del método Cohn podían usarse como material de partida para la purificación de composiciones de inmunoglobulina altamente enriquecidas. Para lograr la mayor pureza y seguridad requeridas para la administración intravenosa de composiciones de IgG, se han añadido varias etapas de purificación y pulido (por ejemplo, adsorción en general o todas las técnicas cromatográficas diferentes, filtración de flujo cruzado, etc.) a los procedimientos de fabricación de IgG después de las

etapas de fraccionamiento con alcohol.

Los fabricantes actuales de IgG se basan normalmente en un precipitado de la fracción II + III del método 6 de Cohn o en un precipitado A de Kistler-Nitschmann como material de partida para el procesamiento posterior. Ambas fracciones se forman mediante un procedimiento en dos etapas en el que se retiran proteínas tales como fibrinógeno y factor XIII mediante una etapa de precipitación inicial (precipitación de la fracción I) realizada a alto pH (7,2) con baja concentración de etanol (al 8-10% v/v), seguido de una segunda etapa de precipitación en la que se precipita IgG del sobrenadante de la fracción I a pH 6,8 con etanol al 20-25% (v/v) (fracción II + III) o a pH 5,85 con etanol al 19% (v/v) (precipitado A), mientras que la albúmina y una parte significativa de A1PI permanecen en el sobrenadante.

Estos métodos, aunque sentaron las bases para toda una industria de proteínas sanguíneas derivadas del plasma, no pudieron proporcionar preparaciones de IgG que tuviesen una pureza suficientemente alta para el tratamiento prolongado de varias enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, incluyendo síndrome de Kawasaki, púrpura trombocitopénica inmunitaria y deficiencias inmunitarias primarias, sin una aparición indebida de efectos secundarios graves. Como tal, se desarrollaron metodologías adicionales que empleaban diversas técnicas, tales como cromatografía de intercambio iónico, para proporcionar formulaciones de IgG de mayor pureza. Hoppe *et al.* (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749-1752), Falksveden (patente sueca n.º 348942) y Falksveden y Lundblad (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980) estuvieron entre los primeros en emplear la cromatografía de intercambio iónico con este propósito.

Es una práctica habitual administrar IgG mediante inyección intravenosa (I.V.) (Imbach *et al.*, Lancet 1(8232): 1228-31 (1981)). La IgG intravenosa (IGIV) puede administrarse sola o en combinación con otras composiciones. La IGIV se administra a menudo a lo largo de un periodo de 2 a 5 horas, una vez al día durante de 2 a 7 días, con dosis de seguimiento cada 10 a 21 días o cada 3 a 4 semanas. Tal régimen de administración lleva mucho tiempo y es inconveniente para muchos pacientes. Esta inconveniencia puede agravarse en el caso de pacientes con Alzheimer, que pueden tener dificultades para sentarse tranquilamente durante el periodo de infusión, y pueden tener que depender de su cuidador para llevarlos a un centro de infusiones o supervisar su infusión.

La administración sistémica de IGIV puede provocar efectos secundarios adversos. Por ejemplo, la IGIV puede provocar dolor de espalda, cefalea, migraña, dolor articular o muscular, sensación general de incomodidad, calambres en las piernas, sarpullido, dolor en el lugar de la inyección, urticaria, mareos, fatiga o cansancio o debilidad inusuales, escalofríos, fiebre, sudoración, aumento de la frecuencia cardíaca, aumento de la tensión arterial, tos, enrojecimiento de la cara, malestar estomacal, dolor de la parte superior del abdomen y vómitos. Los efectos adversos inmediatos tras la administración de IGIV que se han observado incluyen cefalea, sofocos, malestar, opresión en el pecho, fiebre, escalofríos, mialgia, fatiga, disnea, dolor de espalda, náuseas, vómitos, diarrea, cambios en la tensión arterial, taquicardia y reacciones anafilácticas. Orbach *et al.*, Clin. Rev. Allergy Immunol., 29(3): 173-84 (2005).

Además, los efectos secundarios adversos pueden variar según el fabricante de IGIV. Las preparaciones de la mayoría de los fabricantes contienen entre el 90% y el 99% de IgG purificada en combinación con estabilizadores y líquido(s) para la reconstitución. Orange *et al.* 2006 (J. Allergy Clin. Immunol. 117 (4 Supl.): S525); Vo *et al.* 2006 (Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 1(4): 844; Stiehm *et al.* 2006 (J. Pediatr. 148(1): 6). Por ejemplo, algunos fabricantes usan maltosa como estabilizador, mientras que otros usan sacarosa o aminoácidos.

El contenido de sodio y azúcar en IGIV, junto con cantidades variables de IgA y productos químicos adicionales usados en la producción de IGIV pueden afectar a la tolerabilidad y la eficacia de la marca de IGIV en pacientes. Específicamente, los pacientes de edad avanzada experimentan a menudo estados de comorbilidad que aumentan el riesgo de efectos secundarios adversos de IGIV. Por ejemplo, los sujetos con trastornos renales, trastornos vasculares o diabetes también corren un mayor riesgo de insuficiencia renal y acontecimientos trombóticos después de la administración de IGIV porque las composiciones de IGIV son habitualmente hiperviscosas y contienen altas concentraciones de azúcar y sal.

IGIV también conlleva el riesgo de infección relacionada con el catéter, es decir, una infección en la que el catéter o la aguja se introduce en la vena o piel de un sujeto. Ejemplos de infección relacionada con el catéter son dolor a la palpación, calor, irritación, drenaje, enrojecimiento, hinchazón y dolor en el sitio del catéter. Por consiguiente, serían beneficiosos modos de administración alternativos desde el punto de vista del tiempo, la conveniencia y los efectos secundarios adversos.

Además de los efectos secundarios adversos de la administración sistémica de IGIV, se ha demostrado que la penetración de IGIV a través de la barrera hematoencefálica es impredecible y puede ser necesaria IgG intraventricular o intratecal. Por ejemplo, Haley *et al.* administraron IGIV en el tratamiento de inflamación meníngea provocada por encefalitis del virus del Nilo Occidental. Haley *et al.* descubrieron que la penetración de IGIV era impredecible y postularon que podría requerirse la administración intratecal o intraventricular. Haley *et al.* 2003 (Clin. Inf. Diseases 37: e88-90).

Es difícil el direccionamiento al SNC con composiciones terapéuticas de administración I.V. debido a la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE proporciona una barrera eficiente, impidiendo y/o limitando el acceso al SNC de

composiciones terapéuticas administradas por vía intravenosa en la circulación periférica. Específicamente, la BHE impide la difusión de la mayoría de las composiciones terapéuticas, especialmente las composiciones polares, al cerebro desde la sangre en circulación.

5 Se han desarrollado al menos tres métodos para aumentar el paso de moléculas a través de la BHE. En primer lugar, se han desarrollado compuestos lipófilos tales como fármacos liposolubles y fármacos polares encerrados en una membrana lipídica. Los compuestos lipófilos con un peso molecular de menos de 600 Da pueden difundir a través de la BHE. En segundo lugar, pueden unirse compuestos terapéuticos a moléculas transportadoras que pueden atravesar la BHE a través de un sistema transportador saturable. Ejemplos de moléculas transportadoras saturables son
10 transferrina, insulina, IGF-1 y leptina. En tercer lugar, algunos compuestos terapéuticos pueden atravesar la BHE uniendo los compuestos terapéuticos a moléculas policationicas tales como proteínas cargadas positivamente que se unen preferentemente a la superficie endotelial cargada negativamente de la BHE. Patridge *et al.* 2003 (Mol. Interv. 3(2): 90-105); Patridge *et al.* 2002 (Nature Reviews-Drug Discovery 1:131-139). Sin embargo, cada uno de los enfoques descritos anteriormente para aumentar la administración de productos terapéuticos a través de la BHE para
15 obtener acceso al SNC son limitados. Una de tales limitaciones es que los enfoques descritos anteriormente se basan en sistemas de administración sistémica, por ejemplo, la administración directa o indirectamente al torrente sanguíneo, lo que da como resultado la administración inespecífica del agente terapéutico a otras partes del cuerpo, lo que aumenta la posibilidad de efectos secundarios adversos.

20 La administración intranasal de productos terapéuticos se ha convertido en un método cada vez más explorado para administrar agentes terapéuticos al cerebro porque sortea la BHE y es un método de administración no invasivo y localizado. Además, la administración intranasal ofrece las ventajas, con respecto a métodos de administración más tradicionales (por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, oral, transmucosa, oral o rectal), de ser fácil de administrar, proporcionar un rápido inicio de la acción y evitar el metabolismo de primer paso. Desafortunadamente,
25 la administración intranasal sólo ha demostrado ser eficaz para el transporte de moléculas pequeñas y, en cierta medida, proteínas de fusión de Fc más pequeñas, al cerebro. La administración de moléculas más grandes, tales como anticuerpos intactos, aún no se ha demostrado. Se cree que la dificultad para transportar proteínas más grandes se debe a la limitada permeabilidad de las uniones estrechas presentes en los epitelios olfativos, lo que probablemente excluye las moléculas globulares que tienen un radio hidrodinámico de más de 3,6 Å (Stevenson BR, *et al.*, Mol Cell Biochem., octubre de 1988; 83(2):129-45).

La patente estadounidense n.º 5.624.898 concedida a Frey describe composiciones y métodos para transportar agentes neurológicos, que promueven el crecimiento y la supervivencia de células nerviosas o aumentan la actividad de las células funcionales, al cerebro por medio de la ruta neural olfativa. Los agentes neurológicos de la patente '898
35 se transportan hasta el cerebro por medio del sistema nervioso, en lugar del sistema circulatorio, de modo que pueden administrarse agentes potencialmente terapéuticos que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica a neuronas dañadas en el cerebro. Las composiciones descritas en la patente '898 incluyen un agente neurológico en combinación con un portador farmacéutico y/o aditivo que promueve la transferencia del agente dentro del sistema olfativo. La patente '898 no enseña la administración intranasal de inmunoglobulinas humanas agrupadas.

40 Las publicaciones PCT WO 2006/091332 y WO 2009/058957, ambas de Bentz *et al.*, describen métodos para la administración de polipéptidos terapéuticos al cerebro fusionando el polipéptido a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y administrando la proteína de fusión resultante por vía intranasal. Aunque los ejemplos de las publicaciones PCT '332 y '957 sugieren que los "mimeticuerpos" de fusión de Fc pueden administrarse por vía
45 intranasal, ninguna publicación demuestra la administración de anticuerpos intactos más grandes. De hecho, la publicación PCT '957, publicada tres años después de la publicación PCT '332, afirma que "[e]n estudios de administración publicados hasta la fecha, la eficacia de administración intranasal al SNC ha sido muy baja y la administración de macromoléculas globulares grandes, tales como anticuerpos y sus fragmentos, no se ha demostrado". La publicación PCT '957 pretende resolver este problema mediante el uso de un potenciador de la permeabilidad (por ejemplo, fluidificantes de membrana, moduladores de unión estrecha y ácidos grasos de longitud
50 de cadena media y sales y ésteres de los mismos, tal como se describe a continuación), lo que mejora la administración intranasal al sistema nervioso central. Ninguna publicación PCT enseña la administración intranasal de inmunoglobulinas humanas agrupadas.

55 La publicación PCT WO 2003/028668 de Barstow *et al.*, describe el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmunitario mediante administración alimenticia (es decir, administración al tubo digestivo) de inmunoglobulinas agrupadas. Aunque la publicación PCT '668 divulga la administración nasal de una composición de inmunoglobulinas agrupadas, es en el contexto de administrar la composición al tubo digestivo. La publicación PCT '668 no enseña la administración de inmunoglobulinas humanas agrupadas al cerebro a través de administración
60 intranasal.

La publicación PCT WO 2001/60420 de Adjei *et al.*, describe formulaciones en aerosol de polipéptidos terapéuticos, incluyendo inmunoglobulinas, para la administración pulmonar. Estas composiciones aerosolizables están formuladas de tal manera que después de la inhalación oral o nasal, el agente terapéutico se administra eficazmente a los
65 pulmones del paciente. La publicación PCT '420 no enseña la administración de agentes terapéuticos al cerebro a través de administración intranasal.

5 Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de métodos para tratar trastornos del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer, usando inmunoglobulina G humana agrupada, que proporcionen un direccionamiento específico al SNC (por ejemplo, administración principalmente al cerebro), reduzcan la distribución sistémica de las inmunoglobulinas agrupadas y disminuyan la dosis terapéuticamente eficaz necesaria para la administración.

10 El documento WO 2009/111240 A1 se refiere a la actividad anti- β amiloide de inmunoglobulina intravenosa (IGIV) *in vitro*.

10 Dodel *et al.*, Lancet Neurology, marzo de 2013, vol. 12, n.º 3, 31 de enero de 2013, páginas 233-243, se refieren a la inmunoglobulina intravenosa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada: un ensayo de búsqueda de dosis de fase 2, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.

15 Fillit *et al.* (2009), Neurology, vol. 73(3), páginas 180-185, se refieren a la inmunoglobulina I.V. asociada con un riesgo reducido de enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados.

Breve resumen de la invención

20 La presente invención se define, entre otros, mediante los siguientes puntos:

25 1. Una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada para su uso en un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, en la que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición al cerebro del sujeto; en la que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio nasal del sujeto, y en la que al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.

30 2. La composición según el punto 1 para el uso según el punto 1, en la que al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.

3. La composición según el punto 1 para el uso según el punto 1, en la que al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.

35 4. La composición según el punto 1 para el uso según el punto 1, en la que el epitelio nasal es el epitelio olfativo del sujeto.

40 5. La composición según el punto 1 para el uso según el punto 1, en la que el epitelio nasal es un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.

6. La composición según el punto 1 para el uso según el punto 1, en la que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

45 7. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 6 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el trastorno del SNC es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central.

8. La composición según el punto 7 para el uso según el punto 7, en la que el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Alzheimer.

50 9. La composición según el punto 7 para el uso según el punto 7, en la que el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Parkinson.

55 10. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 6 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que el trastorno del SNC es un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central.

11. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 10 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en la que la administración intranasal de la composición comprende la administración dirigida de un aerosol de la composición al epitelio nasal.

60 12. La composición según el punto 11 para el uso según el punto 11, en la que el aerosol de la composición es un aerosol de líquido.

65 13. La composición según el punto 11 para el uso según el punto 11, en la que el aerosol de la composición es un aerosol de polvo.

14. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 12 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 12,

en la que la IgG humana agrupada es una composición acuosa que comprende:

(a) IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y

5 (b) glicina desde 50 mM hasta 500 mM.

15. La composición según el punto 13 para el uso según el punto 13, en la que la composición de polvo seco de IgG agrupada se prepara a partir de una disolución acuosa que comprende:

10 (a) IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y

(b) glicina desde 50 mM hasta 500 mM.

15 16. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 15 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,08 mg hasta 100 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

20 17. La composición según el punto 15 para el uso según el punto 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,2 mg hasta 40 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

25 18. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 15 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 50 mg hasta 10 g de IgG humana agrupada.

19. La composición según uno cualquiera de los puntos 1 a 18 para el uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 18, que comprende además administrar una segunda terapia para el trastorno del SNC al sujeto que lo necesita.

30 20. La composición según el punto 19 para el uso según el punto 19, en la que la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor de la colinesterasa.

21. La composición según el punto 19 para el uso según el punto 19, en la que la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA.

35 La presente divulgación proporciona soluciones a estos y otros problemas proporcionando métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central a través de la administración intranasal de inmunoglobulina G humana agrupada. Ventajosamente, la administración intranasal proporciona la administración dirigida de IgG agrupada al cerebro, sorteando el requisito de que atraviese la barrera hematoencefálica (BHE). Tal como se muestra en el presente documento, la administración intranasal permite la administración de IgG intacta al cerebro. Esto da como resultado una mayor eficiencia para el tratamiento y reduce la dosis de IgG necesaria que debe administrarse para lograr el efecto deseado. Como la IgG humana agrupada se aísla del plasma humano donado, la IgG agrupada es un recurso limitado. La reducción de la dosis eficaz de IgG proporcionada por la presente divulgación aumenta eficazmente el potencial terapéutico proporcionado por la administración mundial de IgG humana agrupada. Además, tal como se demuestra en el presente documento, la administración intranasal de IgG casi elimina la exposición sistémica provocada por la administración intravenosa, mejorando el perfil de seguridad global del tratamiento. Finalmente, se descubrió sorprendentemente que la IgG se transporta eficientemente al cerebro cuando se administra por vía intranasal en ausencia de potenciadores de la permeabilidad, algunos de los cuales tienen efectos neuroestimuladores por sí mismos.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro incluye administrar por vía intranasal la composición directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro incluye administrar por vía intranasal la composición a un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro incluye administrar por vía intranasal la composición al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

65

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro incluye administrar por vía intranasal la composición a uno o ambos senos maxilares del sujeto.

5 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central, una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central, un trastorno extrapiramidal y de movimiento, un trastorno desmielinizante del sistema central sistema nervioso, un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central, un síndrome paralítico del sistema nervioso central, un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central, un trastorno mental orgánico, un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas, un trastorno esquizofrénico, esquizotípico o delirante, un trastorno del estado de ánimo (afectivo), trastorno neurótico, relacionado con el estrés o somatoforme, un síndrome conductual, un trastorno de personalidad o conductual de un adulto, un trastorno del desarrollo psicológico y trastorno conductual o emocional de inicio infantil.

15 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, parálisis cerebral, trastorno bipolar, esquizofrenia y síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS, por sus siglas en inglés).

20 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS, por sus siglas en inglés) y síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).

25 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson.

30 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el trastorno del SNC es enfermedad de Alzheimer.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye el uso de un dispositivo de administración intranasal no invasivo.

35 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye la administración de una gota de líquido de la composición directamente sobre el epitelio nasal, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino o el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

40 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye la administración dirigida de un aerosol de la composición al epitelio nasal, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino o el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el aerosol de la composición es un aerosol de líquido.

45 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el aerosol de la composición es un aerosol de polvo.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto, el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.

50 En una realización de los métodos descritos anteriormente, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.

55 En una realización de los métodos descritos anteriormente, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.

60 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada no contiene un potenciador de la permeabilidad.

65 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada consiste esencialmente en IgG humana agrupada y un aminoácido.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en glicina, histidina y prolina. En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el aminoácido es glicina.

5 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada es una composición acuosa.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada incluye IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml y glicina desde 50 mM hasta 500 mM.

10 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.

15 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada es una composición de polvo seco.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que incluye IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml y glicina desde 50 mM hasta 500 mM.

20 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que tiene un pH de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,08 mg hasta 100 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,2 mg hasta 40 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 5 mg hasta 20 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 5 mg hasta 10 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 1 mg hasta 5 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

30 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 50 mg hasta 10 g de IgG humana agrupada. En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 100 mg hasta 5,0 g de IgG humana agrupada. En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 500 mg hasta 2,5 g de IgG humana agrupada.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al mes. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez a la semana. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces a la semana. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez al día. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al día.

55 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada incluye al menos el 0,1% de IgG anti- β amiloide.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el método incluye además administrar una segunda terapia para el trastorno del SNC al sujeto que lo necesita.

60 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor de la colinesterasa. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el inhibidor de la colinesterasa se selecciona del grupo que consiste en donepezilo (por ejemplo, ARICEPT®), rivastigmina (por ejemplo, EXELON®), galantamina (por ejemplo, RAZADYNE®) y tacrina (por ejemplo, COGNEX®).

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, el inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA es memantina.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita mediante administración intranasal.

10 En algunas realizaciones de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal incluye la administración al epitelio nasal del sujeto. En otras realizaciones de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal comprende la administración al epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto. En otras realizaciones de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal incluye la administración a un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino. En otras realizaciones de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal incluye la administración al tercio superior del epitelio nasal de la cavidad nasal del sujeto. En aún otras realizaciones, de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal incluye la administración a uno o ambos senos maxilares del sujeto.

20 En una realización de los usos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central, una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central, un trastorno extrapiramidal y de movimiento, un trastorno desmielinizante del sistema central sistema nervioso, un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central, un síndrome paralítico del sistema nervioso central, un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central, un trastorno mental orgánico, un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas, esquizofrenia, un trastorno esquizotípico o delirante, un trastorno del estado de ánimo (afectivo), un trastorno neurótico, relacionado con el estrés o somatoforme, un síndrome conductual, un trastorno de personalidad o conductual de un adulto, un trastorno del desarrollo psicológico y un trastorno conductual o emocional de inicio infantil.

25 En una realización de los usos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, parálisis cerebral, trastorno bipolar, esquizofrenia y síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).

30 En una realización de los usos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS) y síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).

35 En una realización de los usos descritos anteriormente, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson.

40 En una realización de los usos descritos anteriormente, el trastorno del SNC es enfermedad de Alzheimer.

45 En una realización de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye el uso de un dispositivo de administración intranasal no invasivo.

50 En una realización de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye la administración de una gota de líquido de la composición directamente sobre el epitelio nasal, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino o el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

55 En una realización de los usos descritos anteriormente, la administración intranasal de la composición incluye la administración dirigida de un aerosol de la composición al epitelio nasal, el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino o el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.

60 En una realización de los usos descritos anteriormente, el aerosol de la composición es un aerosol de líquido.

65 En una realización de los usos descritos anteriormente, el aerosol de la composición es un aerosol de polvo.

En una realización de los usos descritos anteriormente, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto, el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.

En una realización de los usos descritos anteriormente, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto, el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.

ES 2 759 226 T3

- 5 En una realización de los usos descritos anteriormente, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto, el epitelio olfativo de la cavidad nasal del sujeto, un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino, el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto o uno o ambos senos maxilares del sujeto.
- En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada no contiene un potenciador de la permeabilidad.
- 10 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada consiste esencialmente en IgG humana agrupada y un aminoácido.
- En una realización de los usos descritos anteriormente, el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en glicina, histidina y prolina. En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, el aminoácido es glicina.
- 15 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada es una composición acuosa.
- 20 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada incluye IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml y glicina desde 50 mM hasta 500 mM.
- En una realización de los usos descritos anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización de los usos descritos anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.
- 25 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada es una composición de polvo seco.
- 30 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que incluye IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml y glicina desde 50 mM hasta 500 mM.
- En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que tiene un pH de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización de los usos descritos anteriormente, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización de los usos descritos anteriormente, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.
- 35 En una realización de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,08 mg hasta 100 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,2 mg hasta 40 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 5 mg hasta 20 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).
- 40 En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 5 mg hasta 10 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg). En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 1 mg hasta 5 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).
- 45 En una realización de los usos descritos anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 50 mg hasta 10 g de IgG humana agrupada. En una realización específica de los usos proporcionados anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 100 mg hasta 5,0 g de IgG humana agrupada. En una realización específica de los usos proporcionados anteriormente, el uso incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 500 mg hasta 2,5 g de IgG humana agrupada.
- 50 En una realización de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al mes. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez a la semana. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces a la semana. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez al día. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al día.
- 55 En una realización de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al mes. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez a la semana. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces a la semana. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez al día. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al día.
- 60 En una realización de los usos descritos anteriormente, la composición de IgG humana agrupada incluye al menos el 0,1% de IgG anti- β amiloide.
- 65

En una realización de los usos descritos anteriormente, el método incluye además administrar una segunda terapia para el trastorno del SNC al sujeto que lo necesita.

5 En una realización de los usos descritos anteriormente, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor de la colinesterasa. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el inhibidor de la colinesterasa se selecciona del grupo que consiste en donepezilo (por ejemplo, ARICEPT®), rivastigmina (por ejemplo, EXELON®), galantamina (por ejemplo, RAZADYNE®) o tacrina (por ejemplo, COGNEX®).

10 En una realización de los usos descritos anteriormente, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA. En una realización específica de los usos descritos anteriormente, el inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA es memantina.

Breve descripción de los dibujos

15 Las figuras 1A-1F muestran cortes de cerebro de ratas usadas para evaluar la biodistribución de IgG administrada por vía intranasal en el ejemplo 2. Se adquirieron seis cortes de 2 mm (3 rostrales con respecto al quiasma óptico y 3 caudales).

20 figura 1G ilustra un cerebro bisecado a lo largo de la línea media. El cerebro bisecado se disecciona adicionalmente en el mesencéfalo, la protuberancia, médula y el cerebelo para el análisis de biodistribución.

25 Las figuras 2A-2B ilustran los resultados de las concentraciones de ¹²⁵I-IgG (nM) en tejido cerebral promedio a los 30 y 90 minutos después de administración intranasal de IgG. La figura 2A ilustra los resultados de las concentraciones de ¹²⁵I-IgG (nM) en tejido cerebral a los 30 (n = 8) y 90 (n = 6) minutos después de la administración de una preparación líquida de proteína-IgG, normalizada a una dosis de 6,0 mg. La figura 2B ilustra los resultados de las concentraciones de ¹²⁵I-IgG (nM) en tejido cerebral a los 30 (n = 12) y 90 (n = 6) minutos después de la administración de una preparación sólida de IgG en microesferas, normalizada a una dosis de 6,0 mg.

30 Las figuras 3A-3E ilustran datos de IHC en cortes cerebrales corticales e hipocámpicos. Se determinó el contenido de placas para 12 ratones de cada cohorte (WT-Saline, WT-High, TG-Saline, TG-Low y TG-High; se muestran de izquierda a derecha en los gráficos, respectivamente). La figura 3A muestra el porcentaje de área cubierta por placas de beta-amiloide. Se analizaron cuatro cortes de la corteza de cada ratón usando el software ImageJ. Los datos se distribuyen en el intervalo dado por el tamaño del radio de placa (en micrómetros). Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento transgénicos se marcan en el gráfico con el valor de p. La figura 3B muestra el número promedio de placas de beta-amiloide. Se analizaron cuatro cortes de la corteza de cada ratón usando el software ImageJ. Los datos se distribuyen en el intervalo dado por el tamaño del radio de placa (en micrómetros). Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento transgénicos se marcan en el gráfico con el valor de p. La figura 3C muestra el número promedio de placas de beta-amiloide. Se analizaron cuatro cortes del hipocampo de cada ratón usando el software ImageJ. Los datos se distribuyen en el intervalo dado por el tamaño del radio de placa (en micrómetros). La figura 3D muestra el porcentaje de área cubierta por placas de beta-amiloide. Se analizaron cuatro cortes del hipocampo de cada ratón usando el software ImageJ. Los datos se distribuyen en el intervalo dado por el tamaño del radio de placa (en micrómetros). La figura 3E muestra la tinción inmunofluorescente de placas de amiloide en el hipocampo y la corteza de ratones transgénicos TG2576 de edad avanzada (campo de visión = 5,3 mm). Para la tinción inmunofluorescente, a los ratones se les administró solución salina por vía intravenosa, IgG a dosis baja o IgG a dosis alta tres veces a la semana a lo largo de un periodo de 8 meses. Cada valor se notifica como el valor medio para las cohortes ± error estándar.

50 La figura 4 ilustra una curva de Kaplan-Meier para las tasas de supervivencia de ratones transgénicos y de tipo natural a los que se les administró IgG por vía intranasal. Estos ratones pertenecen a una cohorte diferente a los ratones usados para el análisis de placas en la figura 3.

55 La figura 5 ilustra los siete cortes de cerebro frontales que se sometieron a hemisección de ratas tratadas con ¹²⁵I-IgG intranasal usadas para evaluar la administración en el SNC en el ejemplo 8.

Las figuras 6A-6B muestran resultados comparativos de la integridad de la IgG pulverizada a través de un dispositivo diseñado para administración intranasal con la de control no pulverizado. La figura 6A muestra un gel no reductor teñido con Coomassie de IgG pulverizada y no pulverizada (control). La figura 6B muestra una inmunotransferencia de tipo Western de un gel reductor tratado con sonda con un anticuerpo anti-IgG.

60 La figura 7 muestra resultados que demuestran el direccionamiento altamente eficiente al epitelio olfativo de la administración con el dispositivo I.N. en ratas. El panel superior muestra la deposición de IgG I.N. después de la administración mediante el dispositivo de 15 µl de disolución de IGIV al 25% con adiciones conocidas de un trazador de fluoresceína al 0,01% en una rata. El panel inferior muestra el patrón de deposición después de la deposición de 15 µl de disolución de IGIV al 25% con adiciones conocidas de un trazador de fluoresceína al 0,01% administrado a través de gotas nasales. OB = bulbo olfativo, OE = epitelio olfativo, RE = epitelio respiratorio, NS = narina.

65

Las figuras 8A-8C ilustran los datos que muestran una disminución de la carga de amiloide en los grupos de tratamiento intranasal con IgG baja e IgG alta. La figura 8A muestra el área de amiloide total (placa y vasculatura). La figura 8B muestra el número (#) de depósitos de amiloide (placa y vasculatura). La figura 8C muestra la intensidad total de todos los depósitos de amiloide (es decir, la intensidad de la suma).

Las figuras 9A-9C ilustran datos que muestran que una disminución de amiloide es el resultado de una disminución de la carga de placas. La figura 9A muestra el área de amiloide total (placa y vasculatura). La figura 9B muestra el número (#) de depósitos de amiloide (placa y vasculatura). La figura 9C muestra la intensidad total de todos los depósitos de amiloide (es decir, la intensidad de la suma).

Las figuras 10A-10C ilustran datos que muestran que el componente vascular del amiloide aumentó ligeramente cuando se observó una disminución del amiloide como resultado de una disminución de la carga de placas (figura 9). La figura 10A muestra el área de amiloide vascular. La figura 10B muestra el número (#) de depósitos vasculares. La figura 10C muestra la intensidad total de los depósitos vasculares (es decir, la intensidad de la suma).

Las figuras 11A-11B ilustran datos que muestran las proporciones relativas de amiloide vascular y de placas, como contribuye al amiloide total. La figura 11A muestra la contribución de placa relativa al amiloide total. La figura 11B muestra la contribución vascular relativa al amiloide total.

Las figuras 12A-12E muestran secciones sagitales teñidas con rojo Congo capturadas con microscopía fluorescente confocal. La figura 12A muestra una imagen de proyección de intensidad máxima de apilamiento en z creada a partir de cinco imágenes individuales a 10X con una resolución de 512 X 512. Las figuras 12B-12F muestran imágenes individuales creadas a partir de treinta proyecciones de pilas z tal como se muestra en la figura 12A, que abarca la sección de tejido completa que estaba en mosaico (6x5, 5% de solapamiento). Imágenes representativas de los grupos: TG-Saline con valores umbral, resolución total, parte de la corteza y el hipocampo (figura 12A); Tg-Low sin valores umbral (figura 12B); WT-Saline con valores umbral (figura 12C); TG-Saline con valores umbral (figura 12D); Tg-Low con valores umbral (figura 12E); y Tg-High con valores umbral (figura 12F).

Las figuras 13A-13B ilustran datos para la intensidad de tinción promedio para el marcador de astrocitos GFAP (figura 13A) y el marcador de microglía CD11b (figura 13B).

La figura 14 es una imagen de ejemplo de tinción de amiloide (azul), GFAP (verde) y CD11b (rojo) de un cerebro de ratón Tg2576 que se había tratado con una dosis alta de IgG I.N. La tinción de CD11b se observó a menudo alrededor de las placas de amiloide.

Descripción detallada de la invención

Introducción

La presente descripción proporciona métodos y composiciones para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto mediante la administración intranasal de una cantidad terapéuticamente eficaz de inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada directamente al epitelio de la cavidad nasal del sujeto. En una realización específica, la IgG humana agrupada se suministra directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal. En algunas realizaciones, la IgG agrupada se administra al tercio superior de la cavidad nasal, por ejemplo, por encima de los cornetes inferiores. En algunas realizaciones, la IgG agrupada se administra al cerebro a través del nervio trigémino después de administración intranasal al epitelio respiratorio nasal. En una realización específica, la IgG agrupada se administra al cerebro a través del nervio maxilar después de administración intranasal al epitelio respiratorio nasal. En otras realizaciones, la IgG agrupada se administra al cerebro después de administración al seno maxilar.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson mediante la administración intranasal de IgG humana agrupada. En otras realizaciones, los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento son útiles para el tratamiento del trastorno del SNC conocido por un experto en la técnica incluyendo, sin limitación, un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central, una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central, un trastorno extrapiramidal y de movimiento, un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central, un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central, un síndrome paralítico del sistema nervioso central, un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central, un trastorno mental orgánico, un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas, un trastorno esquizofrénico, esquizotípico o delirante, un trastorno del estado de ánimo (afectivo), un trastorno neurótico, relacionado con el estrés o somatoforme, un síndrome conductual, un trastorno de personalidad o conductual de un adulto, un trastorno del desarrollo psicológico o un trastorno conductual o emocional de inicio infantil. En algunas realizaciones, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, parálisis cerebral, trastorno bipolar, esquizofrenia o síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS). En algunas realizaciones, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad

de Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS) o síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).

5 Ventajosamente, se muestra en el presente documento que la administración intranasal de IgG aumentó el peso y el tiempo de supervivencia de modelos de ratones con enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 6 que la administración intranasal de IgG, a dosis o bien altas (0,8 g/kg una vez cada dos semanas) o bien bajas (0,4 g/kg una vez cada dos semanas), prolongó la longevidad de los ratones TG2576. Este resultado muestra que la administración intranasal de IgG es capaz de aumentar la longevidad en el modelo de ratón con Alzheimer, lo que indica la eficacia en el tratamiento de Alzheimer.

10 Además, la administración intranasal de IgG redujo significativamente las placas en la corteza cerebral del modelo de ratón con Alzheimer. Se muestra en el ejemplo 4 que el tratamiento con IgG humana agrupada redujo el porcentaje de área cubierta por placas en el modelo de ratón con Alzheimer en aproximadamente el 25%, cuando se administró por vía intranasal en una dosificación o bien baja (0,4 mg/kg/2 semanas; $p = 0,014$) o bien alta (0,8 mg/kg/2 semanas; $p = 0,037$). Esto es una indicación adicional de la eficacia de la administración intranasal de IgG en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

15 Tal como se demuestra adicionalmente en el presente documento, la administración intranasal da como resultado un suministro mucho más discriminatorio de IgG humana agrupada al cerebro, en comparación con la administración intravenosa. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 9 que la administración intranasal de la inmunoglobulina G humana combinada dio como resultado una exposición a sangre 6 veces menor en comparación con la administración intravenosa. La menor exposición sistémica de IgG proporcionada por la administración intranasal reduce ventajosamente el riesgo de efectos secundarios asociados con la exposición sistémica de IgG.

20 Ventajosamente, también se descubrió que la inmunoglobulina G humana agrupada se administraba de manera eficiente al cerebro tras administración intranasal en ausencia de un potenciador de la permeabilidad (por ejemplo, fluidificantes de membrana, moduladores de unión estrecha y ácidos grasos de longitud de cadena media y sales y ésteres de los mismos, tal como se describe a continuación). Informes anteriores han sugerido que para lograr un transporte eficiente de productos bioterapéuticos (por ejemplo, mimeticuerpos y fusiones de Fc) a través del epitelio olfativo, se requiere un potenciador de la permeabilidad (documento WO 2009/058957). Sin embargo, tal como se muestra en los ejemplos proporcionados en el presente documento, la IgG humana agrupada se administra eficientemente al cerebro cuando se administra por vía intranasal como un polvo líquido o seco formulado sólo con un aminoácido (por ejemplo, glicina).

25 Ventajosamente, también se muestra en el presente documento que la dosis de IgG humana agrupada puede reducirse significativamente cuando se administra por vía intranasal, en comparación con la administración intravenosa. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 9 que la administración de una dosis baja de IgG humana agrupada (0,002 g/kg de IgG) administrada por vía intranasal directamente al epitelio olfativo da como resultado que se administre sustancialmente la misma cantidad de IgG a los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro que para la administración intravenosa de una dosis diez veces mayor de IgG humana agrupada (0,02 g/kg de IgG; compárense los valores corregidos de AUC para la administración de IgG en el hemisferio derecho e izquierdo en la tabla 71 y la tabla 72). Una reducción de diez veces de la cantidad de IgG humana agrupada requerida para la administración es significativa debido al suministro limitado de IgG humana agrupada y el alto coste asociado con la misma.

30 Los resultados descritos anteriormente, que en conjunto sugieren que las dosis bajas de IgG humana agrupada administradas por vía intranasal son eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, son sorprendentes dada la dificultad de administrar inmunoglobulinas de longitud completa al cerebro mediante administración intranasal. En primer lugar, aunque se han administrado fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab) previamente por vía intranasal, los inventores no tienen conocimiento de ningún informe que demuestre la administración de anticuerpos de longitud completa al cerebro a través de administración intranasal. De hecho, se ha notificado que la administración de anticuerpos de longitud completa presenta una gran dificultad en el campo de la medicina (Harmsen MM *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol., 2007, 77(1): 13-22; Athwal GS, Innovations in Pharmaceutical Technology, julio de 2009; documentos WO 2006/091332; y WO 2009/058957). De manera acorde a estos informes, los solicitantes descubrieron que los *fragmentos de anticuerpo* se administran mucho más fácilmente al cerebro, en comparación con las inmunoglobulinas de longitud completa, después de administración intranasal. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 2 que, en promedio, la concentración de Fab en el tejido cerebral después de administración intranasal es 19 veces mayor que la concentración de inmunoglobulinas de longitud completa tras administración intranasal. Dada la administración significativamente menor de inmunoglobulinas de longitud completa al cerebro, es sorprendente que la administración intranasal de inmunoglobulinas agrupadas proporcione los resultados eficaces que se muestran en el presente documento.

35 Ventajosamente, la administración intranasal de la composición de IgG humana agrupada descrita en el presente documento puede lograrse por medios no invasivos, en comparación con la administración intravenosa, subcutánea e intramuscular, todas las cuales requieren la punción de la piel del sujeto. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 3 que la IgG humana agrupada puede administrarse eficientemente al cerebro usando gotas nasales o una pulverización nasal.

Otro beneficio proporcionado por los métodos y las composiciones proporcionados en el presente documento para la administración intranasal de IgG humana agrupada es el cumplimiento mejorado por parte del paciente. El tratamiento con IgG intravenosa (IGIV) requiere un largo periodo de administración bajo supervisión médica, teniendo lugar generalmente en hospitales y centros médicos. Por ejemplo, la administración inicial de IGIV se produce a lo largo de un periodo de 2 a 5 horas, una vez al día durante de 2 a 7 días consecutivos. Se requieren dosis de seguimiento, que también se administran normalmente en un hospital a lo largo de un periodo de 2 a 5 horas, cada 1 a 4 semanas, según la indicación que esté tratándose y el régimen de dosificación. Tal régimen de administración lleva mucho tiempo y es inconveniente para muchos pacientes. En comparación, la administración intranasal puede administrarse en el domicilio sin supervisión médica. Además, la administración intranasal puede realizarse rápidamente, a lo largo de varios minutos, dependiendo del número de gotas/pulverizaciones requeridas, en lugar de varias horas tal como se requiere para la administración intravenosa. Por tanto, el tratamiento puede prescribirse con mayor frecuencia a dosis menores para mantener un nivel eficaz de IgG en el SNC con un inconveniente mínimo porque la administración se realiza en el domicilio en un periodo de tiempo más corto.

Además, la terapia con IGIV requiere la colocación de un catéter que puede provocar molestias e infección en el sitio del catéter. Las disoluciones de IGIV a menudo son de alto contenido en sodio y glucosa para crear isotonicidad, lo que provoca un mayor riesgo para la población de edad avanzada, que ya tiene mayores tasas de diabetes e hipertensión arterial. Por otro lado, la administración intranasal no es invasiva, es decir no se produce la colocación de un catéter y no conlleva riesgos relacionados con procedimientos invasivos, tales como infección e incomodidad en el sitio del catéter. La administración intranasal de composiciones de IgG humana agrupada es un procedimiento mejorado para personas de edad avanzada porque no requiere perfusión I.V. y, por tanto, no crea un aumento sistémico de las concentraciones de sal o glucosa en la sangre.

Por tanto, en comparación con los modos usados actualmente para administrar IgG humana (por ejemplo, intravenosa, subcutánea e intramuscular), la administración intranasal aumenta la facilidad de administración, disminuye el tiempo de administración global, disminuye el número de visitas al hospital requeridas y elimina los riesgos asociados con la administración basada en catéter (por ejemplo, administración I.V.). Por tanto, la implementación de la administración intranasal de IgG humana agrupada dará como resultado un mejor cumplimiento por parte del paciente.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, los términos “trastorno del sistema nervioso central”, “trastorno en el sistema nervioso central”, “trastorno del SNC” y similares se refieren a un trastorno que afecta o bien a la médula espinal (por ejemplo, una mielopatía) o bien al cerebro (por ejemplo, una encefalopatía) de un sujeto, que habitualmente se presenta con síntomas neurológicos y/o psiquiátricos. Los trastornos del SNC incluyen muchas enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), hemiplejía espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, ataxias, enfermedad de Huntington, enfermedad por cuerpos de Lewy, enfermedad por repetición de poliglutamina y enfermedad de Parkinson) y trastornos psiquiátricos (por ejemplo, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenias y autismo). Los ejemplos no limitativos de ataxia incluyen ataxia de Friedreich y las ataxias espinocerebelosas. Específicamente para esta aplicación, los trastornos del SNC no incluyen trastornos resultantes de infecciones virales y bacterianas agudas.

Los ejemplos no limitativos de trastornos del SNC incluyen trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central, atrofas sistémicas que afectan principalmente al sistema nervioso central, trastornos extrapiramidales y de movimiento, trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central, trastornos episódicos o paroxísticos del sistema nervioso central, síndromes paralíticos de los trastornos del sistema nervioso central, trastornos de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central, trastornos mentales orgánicos, trastornos mentales o conductuales provocados por el uso de sustancias psicoactivas, trastornos esquizofrénicos, esquizotípicos o delirantes, trastornos del estado de ánimo (afectivos), trastornos neuróticos, relacionados con el estrés o somatoformes, síndromes conductuales, trastornos de personalidad o conductuales de adultos, trastornos del desarrollo psicológico y trastornos conductuales o emocionales de inicio infantil. (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 4ª edición (DSM-IV); La Organización Mundial de la Salud, Clasificación Internacional de Enfermedades, 10ª revisión (CIE-10), Capítulo V. A continuación se proporcionan más trastornos del SNC a modo de ejemplo.

Los trastornos neurodegenerativos del SNC se caracterizan normalmente por muerte celular y/o disfunción progresiva en el sistema nervioso central. El rasgo distintivo de muchos trastornos neurodegenerativos del SNC es la acumulación de proteínas con plegamiento erróneo, tales como beta-amiloide, tau, alfa-sinucleína y TDP-43, de manera tanto intracelular como extracelular. Muchas enfermedades neurodegenerativas también están asociadas con disfunción mitocondrial grave. Los ejemplos comunes de trastornos neurodegenerativos del SNC incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Los trastornos psiquiátricos (también conocidos como enfermedades mentales) se presentan habitualmente con déficits cognitivos y desregulación del estado de ánimo. Los trastornos psiquiátricos se definen generalmente por una combinación de cómo se siente, actúa, piensa o percibe una persona. Los sistemas bien establecidos para la

clasificación de los trastornos psiquiátricos incluyen la Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas de relacionados con la salud, 10ª revisión (Organización Mundial de la Salud, décima revisión (2010)) y el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV; Asociación Americana de Psiquiatría, DS-IV-TR (2000)). Los ejemplos comunes de trastornos psiquiátricos incluyen trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia y autismo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “inmunoglobulina G humana agrupada” e “IgG humana agrupada” se refieren a una composición que contiene inmunoglobulina G (IgG) polivalente purificada de la sangre/plasma de múltiples donantes, por ejemplo, más de cien o más de mil donantes de sangre. Normalmente, la composición será al menos el 80% de IgG (p/p, por ejemplo, IgG en peso por proteína total en peso), preferiblemente al menos el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de IgG (p/p). En determinadas realizaciones, la composición de IgG humana agrupada contiene inmunoglobulinas IgG intactas. En otras realizaciones, la composición de IgG humana agrupada contiene fragmentos de IgG, por ejemplo, los preparados mediante tratamiento de anticuerpos intactos con tripsina. En determinadas realizaciones, las composiciones de IgG humana agrupada usadas en los tratamientos divulgados en el presente documento contienen modificaciones naturales o sintéticas, por ejemplo, modificaciones postraduccionales y/o modificaciones químicas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título” e “IgG agrupada anti-β amiloide de alto título” se refieren a una composición que contiene inmunoglobulina G (IgG) polivalente purificada de la sangre/plasma de múltiples donantes, por ejemplo, más de cien o más de mil donantes de sangre, que tienen un título relativo de inmunoglobulina G anti-β amiloide que es mayor que el título esperado de inmunoglobulinas anti-β amiloide en una composición de IgG agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. Las preparaciones de inmunoglobulina G intravenosa (IGIV) disponibles comercialmente contienen IgG que reconocen específicamente epítomos de varios confórmers de β amiloide, por ejemplo, monómeros de β amiloide, fibrillas de β amiloide y especies de proteínas de β amiloide reticuladas (CAPS, por sus siglas en inglés). Se ha notificado que una preparación comercial de GAMMAGARD LIQUID® (infusión de inmunoglobulina (humana) al 10%; Baxter International Inc., Deerfield, IL) contiene el 0,1% de IgG anti-fibrilla de β amiloide, el 0,04% de IgG anti-CAPS y el 0,02% de IgG monomérica anti-β amiloide, que tienen afinidades de CE₅₀ de 40 nM, 40 nM y 350 nM por su confórmero de β amiloide diana, respectivamente (O’Nuallain B. *et al.*, *Biochemistry*, 25 de noviembre de 2008; 47(47): 12254-6). En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene un alto título de IgG específica para uno o más confórmers de β amiloide. En otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene un alto título de IgG específica para monómeros de β amiloide, fibrillas de β amiloide y especies de proteínas β de amiloide reticuladas (CAPS).

Por consiguiente, en una realización, una composición de inmunoglobulina G anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,1% de IgG anti-β amiloide (por ejemplo, el 0,1% IgG con afinidad específica por cualquier confórmero de β amiloide). En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,2% de IgG anti-β amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-β amiloide.

En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,1% de IgG anti-fibrilla de β amiloide. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,2% de IgG anti-fibrilla de β amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-fibrilla de β amiloide.

En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,04% de IgG anti-CAPS. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,08% de IgG anti-CAPS. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,04%, el 0,05%, el 0,06%, el 0,07%, el 0,08%, el 0,09%, el 0,1%, el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-CAPS.

En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,02% de IgG monomérica anti-β amiloide. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,04% de IgG monomérica anti-β amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-β amiloide de alto título contiene al menos el 0,02%, el 0,03%, el 0,04%, el 0,05%, el 0,06%, el 0,07%, el 0,08%, el 0,09%, el 0,1%, el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el

0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG monomérica anti-β amiloide.

- 5 La IgG agrupada anti-β amiloide de alto título puede prepararse según métodos convencionales para la fabricación de IgG agrupada partiendo de una agrupación convencional de sangre/plasma de múltiples donantes, por ejemplo, más de cien o más de mil donantes de sangre, y posteriormente enriquecerse para la inmunoglobulina G anti-β amiloide. Los métodos para el enriquecimiento de las moléculas de inmunoglobulina G específicas de diana se conocen bien en la técnica (por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0101909).
- 10 Alternativamente, puede prepararse IgG agrupada anti-β amiloide de alto título según métodos convencionales para la fabricación de IgG agrupada partiendo de una agrupación enriquecida de sangre/plasma de al menos cincuenta, cien, doscientos, quinientos o mil donantes que tiene un alto título relativo de inmunoglobulina G anti-β amiloide. En comparación con la fabricación de IgG convencional para administración intravenosa, las preparaciones de IgG hiperinmunitaria se preparan habitualmente a partir de agrupaciones de donantes más pequeñas. Estas agrupaciones
- 15 enriquecidas de sangre/plasma pueden formarse, por ejemplo, al agrupar selectivamente donaciones o donantes de sangre/plasma con un alto título relativo de inmunoglobulina G anti-β amiloide, por ejemplo, mediante la selección de donaciones o donantes de sangre/plasma de alto título. Alternativamente, puede formarse una agrupación enriquecida de sangre/plasma mediante la detección de donaciones o donantes de sangre/plasma con un título relativo bajo de
- 20 inmunoglobulina G anti-β amiloide y excluyendo estas donaciones o donantes de la agrupación de sangre/plasma inicial, por ejemplo, detección de donaciones o donantes de sangre/plasma de bajo título.

Tal como se usa en el presente documento, el término “integridad” se refiere a un porcentaje de agente terapéutico que no se ha degradado al menos parcialmente en un punto en el tiempo particular tras la administración. En una

25 realización, la integridad es una medida de la dosis administrada total del agente terapéutico que no se ha degradado al menos parcialmente en el punto en el tiempo particular (es decir, integridad sistémica). En otra realización, la integridad es una medida del agente terapéutico presente en un sitio particular del sujeto, por ejemplo, cerebro o torrente sanguíneo, que no se ha degradado al menos parcialmente (es decir, integridad local). En una realización, la integridad de la inmunoglobulina administrada (por ejemplo, IgG humana agrupada) se mide mediante espectroscopía

30 de masas. Por ejemplo, la integridad de las inmunoglobulinas administradas se determina analizando una muestra biológica del sujeto, o proteínas extraídas de la muestra biológica, mediante espectroscopía de masas. En algunas realizaciones, la integridad de las inmunoglobulinas administradas se determina separando las proteínas presentes en una muestra biológica del sujeto por peso molecular, tamaño o forma (por ejemplo, mediante electroforesis o cromatografía de exclusión molecular) y determinando la distribución de tamaño de las inmunoglobulinas administradas en la muestra.

35 En una realización, la integridad de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG humana agrupada) en el cerebro de un sujeto tras administración intranasal es de al menos el 40%. En realizaciones preferidas, la integridad de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG humana agrupada) en el cerebro de un sujeto tras administración intranasal es de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%. En determinadas realizaciones, la integridad de la inmunoglobulina (por ejemplo,

40 IgG humana agrupada) en el cerebro de un sujeto tras administración intranasal es de al menos el 35%, el 36%, el 37%, el 38%, el 39%, el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, o mayor.

45 Tal como se usa en el presente documento, los términos “administración intranasal” y “administración nasal” se refieren a la administración de una composición terapéutica a la cavidad nasal de un sujeto de tal manera que un agente terapéutico en la composición se suministra directamente a uno o más epitelios ubicados en la nariz. En determinadas realizaciones, la administración intranasal se logra usando una preparación líquida (por ejemplo, una preparación acuosa), una preparación aerosolizada, o una preparación de polvo seco, cada una de las cuales puede administrarse

50 a través de un dispositivo de administración nasal no invasivo de propulsión externa o autopropulsado (por ejemplo, por inhalación), o mediante un gel, una crema, pomada, loción o pasta aplicada directamente a uno o más epitelios nasales (por ejemplo, epitelio olfativo o epitelio respiratorio nasal).

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “epitelio nasal” se refiere a los tejidos que revisten la estructura interna de la cavidad nasal. El término epitelio nasal incluye tanto el epitelio respiratorio nasal, ubicado en los dos tercios inferiores de la cavidad nasal en humanos, como el epitelio olfativo, ubicado en el tercio superior de la cavidad nasal de los humanos.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “epitelio olfativo” se refiere a un tejido epitelial especializado en el interior de la cavidad nasal involucrado en el olfato. En humanos, el epitelio olfativo está ubicado en el tercio superior de la cavidad nasal.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “administración dirigida” se refiere a un procedimiento de administración preferente de un agente terapéutico a una primera ubicación en un sujeto en comparación con una segunda ubicación o distribución sistémica del agente. Por ejemplo, en una realización, la administración dirigida de un agente terapéutico da como resultado un aumento de al menos dos veces de la razón de agente terapéutico

administrado a un sitio direccionado con respecto a agente terapéutico administrado a un sitio no direccionado, en comparación con la razón tras administración sistémica o no dirigida. En otras realizaciones, la administración dirigida de un agente terapéutico da como resultado un aumento de al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 750 veces, 1000 veces o mayor de la razón de agente terapéutico administrado a un sitio direccionado con respecto a agente terapéutico administrado a un sitio no direccionado, en comparación con la razón tras administración sistémica o no dirigida. En una realización particular, la administración dirigida de un agente se contrasta con la administración intravenosa del agente. Por ejemplo, en una realización, la razón de agente terapéutico presente en un sitio direccionado con respecto a agente terapéutico presente en el torrente sanguíneo aumenta al menos dos veces cuando el agente está sujeto a administración dirigida (por ejemplo, mediante administración al cerebro por administración intranasal), en comparación con cuando el agente terapéutico se administra por vía intravenosa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dispositivo de administración nasal no invasivo” se refiere a un instrumento que es capaz de administrar una composición terapéutica (por ejemplo, IgG humana agrupada) a la cavidad nasal sin perforar el epitelio del sujeto. Los ejemplos no limitativos de dispositivos de administración nasal no invasivos incluyen tipos de propulsor (por ejemplo, un inhalador presurizado) y no propulsor (por ejemplo, un inhalador de tipo bomba) de dispositivos de aerosol o atomizador, dispositivos de dispersión de partículas, nebulizadores y dispositivos de administración olfativa presurizados para la administración de formulaciones líquidas o de polvo.

El término “tratamiento” o “terapia” significa generalmente obtener un efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o un estado o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una lesión, enfermedad o un estado y/o mejora de un efecto adverso atribuible a la lesión, enfermedad o el estado e incluye detener el desarrollo o provocar la regresión de una enfermedad o un estado. El tratamiento también puede referirse a cualquier retraso del inicio, mejora de los síntomas, mejora de la supervivencia del paciente, aumento del tiempo o la tasa de supervivencia, mejora de la función cognitiva, etc. El efecto del tratamiento puede compararse con un individuo o grupo de individuos que no reciben el tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente/eficaz” se refiere a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y la comprobará un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véanse, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vol. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “dosis” y “dosificación” se usan indistintamente y se refieren a la cantidad de principio activo administrada a un individuo en cada administración. La dosis variará según varios factores, incluyendo la frecuencia de administración; la talla y tolerancia del individuo; la gravedad del estado; el riesgo de efectos secundarios; y la vía de administración. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis puede modificarse dependiendo de los factores anteriores o en función del progreso terapéutico. El término “forma de dosificación” se refiere al formato particular del producto farmacéutico y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede ser un polvo líquido o seco, formulado para administración intranasal.

Tal como se usa en el presente documento, una composición terapéutica “que consiste esencialmente en un agente tamponante e IgG humana agrupada” también puede contener niveles residuales de agentes químicos usados durante el procedimiento de fabricación, por ejemplo, tensioactivos, tampones, sales y agentes estabilizantes, así como agentes químicos usados para el pH de la composición final, por ejemplo, contraiones aportados por un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido acético) o una base (por ejemplo, hidróxido de sodio o potasio), y/o cantidades traza de proteínas contaminantes.

Tal como se usa en el presente documento, el término “potenciador de la permeabilidad” se refiere a un componente de una composición terapéutica formulada para administración intranasal que promueve el paso de productos bioterapéuticos (por ejemplo, mimeticuerpos y polipéptidos de fusión de Fc) a través del epitelio nasal. Los ejemplos no limitativos de potenciadores de la permeabilidad incluyen fluidificantes de membrana, moduladores de unión estrecha y ácidos grasos de longitud de cadena media y sales y ésteres de los mismos. Los ejemplos no limitativos de ácidos grasos de longitud de cadena media y sales y ésteres de los mismos incluyen mono, di y triglicéridos (tales como caprilato de sodio, caprato de sodio, glicéridos (CAPMUL, GELUCIRE 44/14 PEG32 laurato de glicerilo EP); lípidos; péptidos pegilados y liposomas. Los tensioactivos y compuestos de acción similar también pueden usarse como potenciadores de la permeabilidad. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos y compuestos de acción similar incluyen polisorbato-80, fosfatidilcolina, N-metilpiperazina, salicilato de sodio, melitina y cloruro de palmitoil-carnitina (PCC). En general, las composiciones de inmunoglobulina G humana agrupada descritas en el presente documento se formulan para administración intranasal en ausencia de potenciadores de la permeabilidad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “composición de polvo seco” se refiere a una forma liofilizada o secada por pulverización de una formulación terapéutica de IgG humana agrupada. En una realización, una

composición de polvo seco contiene un contenido de agua residual menor del 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1% o menos.

5 Un “control” se usa en el presente documento, se refiere a una referencia, generalmente una referencia conocida, para comparación con un grupo experimental. Un experto en la técnica comprenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basados en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la significación de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado varían ampliamente en los controles, la variación en las muestras de prueba no se considerará significativa.

10 Antes de que la presente divulgación se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas ya que, por supuesto, puede variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

15 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

25 Se observa que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un(o)”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base de antecedentes para el uso de una terminología exclusiva tal como “solamente”, “sólo” y similares en relación con la cita de elementos de reivindicación o el uso de una limitación “negativa”.

30 Cualquier método citado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea se lógicamente posible.

40 Administración

La administración intranasal (I.N.) es un modo ventajoso de administrar un fármaco al cerebro porque no es invasivo y existe una conexión directa entre el sistema olfativo y el cerebro. La administración intranasal de IgG (IGIN) para tratar enfermedades neurológicas es particularmente ventajosa porque la conexión directa entre el sistema olfativo y el cerebro evita las preocupaciones de administración asociadas con la barrera hematoencefálica (BHE) y minimiza la exposición sistémica al fármaco, minimizando así los efectos secundarios del fármaco. Además, la administración I.N. permite composiciones tales como polvos, gránulos, disoluciones, pomadas y cremas, evitando así la necesidad de administración intravenosa e intramuscular. Por ejemplo, cuando un fármaco se administra por vía intranasal, se transporta a través de la mucosa nasal y a lo largo de la ruta neural olfativa. El fármaco puede administrarse solo o puede combinarse con una o más moléculas transportadoras para promover el transporte a través de la mucosa nasal y a lo largo de la ruta neural olfativa. El fármaco también puede administrarse en combinación con un potenciador de la absorción. Los potenciadores de la absorción promueven la absorción del fármaco a través de la mucosa nasal y a lo largo de la ruta neural olfativa. Además, pueden añadirse moléculas adicionales para facilitar el transporte del fármaco a través de la ruta neural olfativa.

55 La administración I.N. también puede usarse para administrar fármacos terapéuticos al cerebro a través de la ruta del nervio trigémino. Específicamente, la administración I.N. puede usarse para administrar IgG a través de la ruta del nervio trigémino. Los nervios olfativo y trigémino reciben altas concentraciones de un fármaco con administración I.N. porque el pseudoepitelio olfativo y respiratorio absorbente está inervado por el nervio trigémino. Estos nervios pueden transportar entonces el fármaco al cerebro y otras estructuras conectadas. Por ejemplo, las ramas del nervio trigémino alcanzan directa o indirectamente el seno maxilar, el tronco encefálico, el rombencéfalo, la lámina cribosa, el prosencéfalo (por ejemplo, la corteza y el diencefalo), estructuras bucofaciales (por ejemplo, dientes, músculo masetero y articulación temporomandibular), mesencéfalo, cerebelo, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar. Por consiguiente, IGIN puede transportarse a través de la ruta del nervio trigémino para alcanzar y tratar enfermedades neurológicas.

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de trastornos del SNC mediante la administración de inmunoglobulinas humanas agrupadas al tejido inervado por los nervios olfativo y/o trigémino. Sorprendentemente, se descubrió que se suministran cantidades terapéuticamente eficaces de inmunoglobulina humana agrupada al SNC cuando se administran por vía intranasal. Por ejemplo, se muestra en el presente documento

5 que la administración intranasal de inmunoglobulinas humanas agrupadas es eficaz para reducir la carga de placas de amiloide total en un modelo de roedores de la enfermedad de Alzheimer. Además, al direccionar específicamente al epitelio nasal, en oposición al sistema respiratorio (pulmón, faringe, etc.), se reduce la exposición sistémica de las inmunoglobulinas humanas agrupadas.

10 Pueden usarse muchos tipos de dispositivos de administración intranasal para poner en práctica los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es un dispositivo intranasal para la administración de líquidos. Ejemplos no limitativos de dispositivos útiles para la administración de composiciones líquidas (por ejemplo, composiciones líquidas de IgG agrupada) incluyen dispositivos de vapor (por ejemplo, inhaladores de vapor), dispositivos de goteo (por ejemplo, catéteres, goteros monodosis, goteros multidosis

15 y pipetas de dosis unitaria), dispositivos de bomba de pulverización mecánica (por ejemplo, frascos flexibles, bombas de pulverización de dosis medida multidosis y bombas de pulverización de dosis única/doble), bombas de pulverización bidireccionales (por ejemplo, dispositivos de administración nasal accionados por la respiración), sistemas de pulverización/atomizadores accionados por gas (por ejemplo, inhaladores de dosis medida impulsados por propulsor de nitrógeno o HFA mono o multidosis, incluyendo los inhaladores de velocidad circunferencial y tradicionales), y nebulizadores/atomizadores alimentados eléctricamente (por ejemplo, nebulizadores de membrana de pulsación, nebulizadores mecánicos vibrantes y nebulizadores mecánicos manuales). En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es un dispositivo intranasal para la administración de polvos o geles. Los ejemplos no limitativos de dispositivos útiles para la administración de composiciones de polvo (por ejemplo, composiciones de IgG agrupada liofilizadas o secadas de otro modo) incluyen pulverizadores de polvo mecánicos (por ejemplo, dispositivos de pulverización de polvo a base de cápsulas accionados manualmente y dispositivos de pulverización de polvo accionados manualmente, dispositivos de administración de gel accionados manualmente), inhaladores accionados por la respiración (por ejemplo, inhaladores nasales mono o multidosis e inhaladores nasales mono o multidosis basados en cápsulas) e insufladores (por ejemplo, dispositivos de administración nasal activados por la respiración). En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas humanas agrupadas se administran preferentemente al área olfativa,

20 localizada en el tercio superior de la cavidad nasal, y particularmente al epitelio olfativo. Las fibras del nervio olfativo son axones amielínicos de células receptoras olfativas, que están ubicadas en el tercio superior de la cavidad nasal. Las células receptoras olfativas son neuronas bipolares con protuberancias cubiertas por cilios de estructura pilosa que se adentran en la cavidad nasal. En el otro extremo, los axones de estas células se acumulan en agregados y entran en la cavidad craneal en el techo de la nariz. Rodeados por un tubo delgado de piamadre, los nervios olfativos cruzan el espacio subaracnoideo que contiene LCR y entran en las caras inferiores de los bulbos olfativos. Una vez que la inmunoglobulina humana agrupada se dispensa en la cavidad nasal, la inmunoglobulina puede experimentar su transporte a través de la mucosa nasal y hacia el bulbo olfativo y las áreas interconectadas del cerebro, tales como la formación del hipocampo, los núcleos amigdalinos, el núcleo basal de Meynert, el locus cerúleo, el tronco encefálico, y similares (por ejemplo, Johnson *et al.*, Molecular Pharmaceutics (2010) 7(3):884-893).

25 En determinadas realizaciones, la inmunoglobulina humana agrupada se administra al tejido inervado por el nervio trigémino. El nervio trigémino inerva tejidos de la cabeza un mamífero (por ejemplo, humano), incluyendo la piel de la cara y el cuero cabelludo, los tejidos bucales y los tejidos que rodean el ojo. El nervio trigémino tiene tres ramas principales, el nervio oftálmico, el nervio maxilar y el nervio mandibular. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración dirigida de inmunoglobulina humana agrupada a una o más de estas ramas del nervio trigémino, es decir la ruta del nervio trigémino. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración dirigida de inmunoglobulina humana agrupada al seno maxilar, alcanzando así el tronco encefálico, rombencéfalo, la lámina cribosa, el prosencéfalo (por ejemplo, la corteza y el diencéfalo), mesencéfalo, cerebelo, la médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar a través de la ruta del nervio trigémino. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la administración dirigida de inmunoglobulina humana agrupada para el tratamiento de un trastorno del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

30 En algunas realizaciones, la inmunoglobulina humana agrupada se administra a tejidos nasales inervados por el nervio trigémino, por ejemplo, a tejidos nasales incluyendo los senos paranasales, los dos tercios inferiores de la cavidad nasal y el tabique nasal. En determinadas realizaciones, la inmunoglobulina humana agrupada se dirige a los dos tercios inferiores de la cavidad nasal y/o el tabique nasal.

35 En algunas realizaciones, la inmunoglobulina humana agrupada se administra a uno o ambos senos maxilares del individuo. Los métodos y dispositivos para la administración al seno maxilar se conocen en la técnica, por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente estadounidense número 2011/0151393.

40 El seno maxilar está en comunicación de fluido con la cavidad nasal del paciente y comprende los senos maxilares derecho e izquierdo. Cada seno maxilar se comunica con la fosa nasal correspondiente a través del orificio del seno maxilar. El volumen máximo del seno maxilar en adultos es de aproximadamente 4 a 15 ml, aunque senos individuales pueden comprender volúmenes fuera de este intervalo.

- La ruta desde las fosas nasales hasta el orificio correspondiente del seno maxilar y, en última instancia, hasta el seno maxilar correspondiente, permite que se inserte un dispositivo en la fosa nasal hasta el orificio del seno maxilar, con lo cual al menos una cantidad o dosis eficaz de inmunoglobulinas humanas agrupadas puede administrarse y suministrarse en el seno maxilar. La ruta hasta el seno maxilar es tortuosa y requiere: atravesar el orificio nasal, moverse a través de la región entre el cornete inferior y medio, navegar por y hacia el hiato semilunar, desplazarse de manera superior hacia la abertura del seno maxilar, resistir la acción ciliada del orificio/tubo que pasa al seno maxilar y moverse, en última instancia, hacia el propio seno.
- Dado que el nervio trigémino atraviesa el seno maxilar, las inmunoglobulinas humanas agrupadas en el seno maxilar después de la administración en el mismo se moverán a lo largo del nervio trigémino hasta estructuras inervadas por el nervio trigémino. De esta manera, la IgG humana agrupada administrada a uno o ambos senos maxilares se suministra al cerebro a través del nervio trigémino.
- En una realización, las composiciones de IgG humana agrupada proporcionadas en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) se administran por vía intranasal como una preparación líquida, por ejemplo, una preparación acuosa. Por ejemplo, en una realización, se instilan gotas nasales en la cavidad nasal inclinando la cabeza hacia atrás lo suficiente y aplicando las gotas en las narinas. En otra realización, las gotas se inhalan por la nariz. En otra realización, se aplican gotas nasales con un aplicador o tubo sobre el tercio superior de la mucosa nasal. En otra realización, se aplican gotas nasales con un aplicador o tubo en uno o ambos senos maxilares del sujeto. En otra realización, la preparación líquida puede colocarse en un dispositivo apropiado de modo que pueda aerosolizarse para inhalación a través de la cavidad nasal. Por ejemplo, en una realización, el agente terapéutico se coloca en un atomizador de frasco de plástico. En una realización específica, el atomizador está configurado ventajosamente para permitir que una cantidad sustancial de la pulverización se dirija a la región o parte del tercio superior de la cavidad nasal (por ejemplo, el epitelio olfativo). En otra realización, la preparación líquida se aerosoliza y se aplica a través de un inhalador, tal como un inhalador de dosis medida (por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 6.715.485). En una realización específica, el inhalador está configurado ventajosamente para permitir que una cantidad sustancial del aerosol se dirija a la región o parte del tercio superior de la cavidad nasal (por ejemplo, el epitelio olfativo). En determinadas realizaciones, una cantidad sustancial de la inmunoglobulina humana agrupada se refiere al menos al 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% de la composición, que se administra a la región del tercio superior de la cavidad nasal (por ejemplo, se administra al tercio superior del epitelio nasal).
- En una realización, las composiciones de IgG humana agrupada proporcionadas en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) se administran por vía intranasal como un polvo seco. Los dispositivos de administración nasal de polvo seco se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véase la publicación PCT n.º WO 1996/222802. En una realización, tras administración intranasal, la IgG humana agrupada se absorbe a través del epitelio olfativo, que se encuentra en el tercio superior de la cavidad nasal. En otra realización, tras administración intranasal, la IgG humana agrupada se absorbe a través del epitelio respiratorio nasal, que está inervado con nervios trigéminos, en los dos tercios inferiores de la cavidad nasal. Los nervios trigéminos también inervan la conjuntiva, la mucosa oral y determinadas áreas de la dermis de la cara y la cabeza, y también puede producirse absorción después de administración intranasal de la IgG desde estas regiones. En otras realizaciones, tras administración intranasal, la IgG humana agrupada se absorbe a través del epitelio del seno maxilar. En aún otras realizaciones, la IgG humana agrupada puede absorberse a través de más de uno de estos epitelios nasales y posteriormente suministrarse al cerebro del sujeto.
- Aunque en el presente documento se hace referencia a la administración como un evento único que puede producirse según cierta frecuencia regular o irregular del transcurso de un tratamiento, una administración única incluso puede incluir administraciones múltiples. A este respecto, una dosificación única de IgG humana agrupada puede dividirse en dos o más composiciones físicas para la administración. Por ejemplo, una dosis de 200 mg de IgG humana agrupada en una composición líquida formulada a 200 g/l de IgG puede administrarse a un sujeto de 50 kg (4 mg/kg de IgG) en cuatro gotas que tienen un volumen de 250 µl cada una. Asimismo, puede administrarse una composición de polvo seco que contiene una dosificación única de IgG humana agrupada, por ejemplo, en dos o más aspiraciones distintas. En algunas realizaciones, la IgG humana agrupada se administra en una o más inhalaciones o pulverizaciones en cada narina del individuo (por ejemplo, una o más aspiraciones en la narina derecha y una o más aspiraciones en la narina izquierda).
- En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento para tratar un trastorno del SNC incluyen la administración intranasal de IgG humana agrupada a través de un dispositivo de administración intranasal no invasivo. En una realización, el dispositivo de administración intranasal no invasivo es un dispositivo de aerosol o atomizador de tipo no propulsor, un dispositivo de aerosol o atomizador de tipo propulsor, un dispositivo de tipo bomba no propulsor, un dispositivo de dispersión de partículas, un dispositivo nebulizador o un dispositivo de administración olfativa presurizado.
- En una realización, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una gota de líquido de una composición de IgG humana agrupada a la cavidad nasal de un sujeto. En una realización particular, el dispositivo de

administración intranasal no invasivo suministra una gota de líquido de IgG humana agrupada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización más específica, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una gota de líquido de IgG humana agrupada directamente al epitelio olfativo del sujeto. En una realización, la gota de líquido se administra inclinando la cabeza del sujeto hacia atrás y administrando la gota en una narina del sujeto. En otra realización, la gota de líquido se administra insertando la punta de un dispositivo de administración intranasal no invasivo en una narina del sujeto y rociando o pulverizando la gota en la cavidad nasal del sujeto.

En otra realización, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra un aerosol de líquido o de polvo de una composición de IgG humana agrupada a la cavidad nasal de un sujeto. En una realización particular, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra un aerosol de líquido o de polvo de IgG humana agrupada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización más específica, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra un aerosol de líquido o de polvo de IgG humana agrupada directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En otra realización, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una composición de polvo seco de composición de IgG humana agrupada a la cavidad nasal de un sujeto. En una realización particular, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una composición de polvo seco de IgG humana agrupada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización más específica, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una composición de polvo seco de IgG humana agrupada directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En otra realización, el dispositivo de administración intranasal no invasivo suministra una composición de liberación sostenida o de liberación controlada de composición de IgG humana agrupada a la cavidad nasal de un sujeto. En una realización específica, la composición de liberación sostenida comprende una composición de polvo seco de IgG humana agrupada. En algunas realizaciones, la composición de liberación sostenida es un gel, una pasta, un hidrogel, una crema, loción, película o forma similar que recubre al menos una parte del epitelio nasal (por ejemplo, la totalidad o una parte del epitelio olfativo, la totalidad o una parte de un epitelio nasal asociado con terminaciones del nervio trigémino, la totalidad o una parte del tercio superior del epitelio nasal, la totalidad o una parte del tercio inferior del epitelio nasal, o la totalidad o una parte del epitelio maxilar nasal).

En una realización, el dispositivo intranasal es un dispositivo desechable de un único uso. En otra realización, el dispositivo intranasal es un dispositivo de usos múltiples o repetidos. En determinadas realizaciones, el dispositivo de un único uso o de usos múltiples está medido previamente. En una realización específica, el dispositivo de un único uso o de usos múltiples está precargado. En determinadas realizaciones, el dispositivo de usos múltiples o repetidos es recargable. En determinadas realizaciones, el dispositivo se recarga insertando una composición de IgG humana agrupada en una cámara del dispositivo. En otras realizaciones, una cámara del dispositivo de usos múltiples o repetidos diseñada para contener la composición de IgG humana agrupada se reemplaza por una nueva cámara precargada.

En determinadas realizaciones, las composiciones de inmunoglobulina humana agrupada se administran mediante un dispositivo de administración nasal presurizado (PND, por sus siglas en inglés). En una realización, el dispositivo PND puede usarse para suministrar una composición líquida de IgG a la cavidad nasal. En una realización, el dispositivo PND puede usarse para suministrar una composición de IgG de polvo a la cavidad nasal. En una realización, el dispositivo PND administra una composición de IgG en un orificio nasal. En una realización, el dispositivo Impel administra una composición de IgG en ambos orificios nasales.

En algunas realizaciones, el dispositivo PND está configurado para suministrar las composiciones de IgG líquidas o de polvo a un epitelio, ubicación y/o estructura particular de la cavidad nasal. Por ejemplo, en una realización, el dispositivo PND está configurado para suministrar la composición de IgG a la parte superior de la cavidad nasal. En una realización, el dispositivo PND está configurado para suministrar la composición de IgG al epitelio olfativo de la cavidad nasal. En una realización, el dispositivo PND está configurado para administrar la composición de IgG a los dos tercios inferiores del epitelio nasal. En una realización, el dispositivo PND está configurado para administrar la composición de IgG a un epitelio nasal asociado con terminaciones del nervio trigémino. En una realización, el dispositivo PND está configurado para suministrar la composición de IgG al epitelio del seno maxilar nasal.

Se conocen en el campo métodos para configurar dispositivos de administración presurizados para lograr un perfil de administración particular. Por ejemplo, en una realización, un dispositivo de administración nasal presurizado está configurado para producir una corriente, pulverización, aspiración, etc., tienen una característica particular. Por ejemplo, en una realización, para lograr la administración al tercio superior del epitelio nasal, el dispositivo está configurado para producir una corriente, pulverización, aspiración, etc., fuerte, enfocada. En una realización, la pulverización fuerte enfocada se crea confiriendo velocidad circunferencial y/o axial a la corriente de la composición terapéutica (por ejemplo, IgG humana agrupada) que se administra en la nariz. En otra realización, para lograr la administración a una parte mayor del epitelio nasal (por ejemplo, la totalidad o los dos tercios inferiores del epitelio nasal), el dispositivo está configurado para producir una corriente, pulverización, aspiración, etc., difusa y/o más débil. En algunas realizaciones, la punta del dispositivo de administración está configurada para dirigir físicamente la corriente, pulverización, aspiración, etc., hasta la ubicación intranasal deseada cuando se inserta en la narina del

sujeto. Por ejemplo, puede introducirse una torsión o curvatura en la punta del dispositivo de administración para “apuntar” la corriente, pulverización, aspiración, etc., en un epitelio direccionado. En algunas realizaciones, el patrón de administración del dispositivo es ajustable, de modo que el dispositivo puede configurarse de manera diferencial para dirigir el agente terapéutico (por ejemplo, IgG humana agrupada) a un epitelio, una estructura o ubicación particular dentro de la nariz. En determinadas realizaciones, las composiciones de inmunoglobulina humana agrupada se administran mediante un dispositivo tecnológico accionado por la respiración. En determinadas realizaciones, la tecnología accionada por la respiración proporciona presión positiva durante la administración. En determinadas realizaciones, la presión positiva expande las fosas nasales estrechas. En determinadas realizaciones, la expansión de las fosas nasales permite la administración fiable de composiciones de inmunoglobulina humana agrupada líquidas o de polvo descritas en el presente documento al SNC. En algunas realizaciones, la exhalación en el dispositivo propulsa el agente terapéutico (por ejemplo, IgG humana agrupada) en la nariz, mientras que al mismo tiempo cierra el velo del paladar, reduciendo así la deposición del agente terapéutico en la garganta y/o los pulmones. En una realización, el dispositivo tecnológico accionado por la respiración administra una composición de IgG descrita en el presente documento en un orificio nasal. En una realización, el dispositivo tecnológico accionado por la respiración administra una composición de IgG descrita en el presente documento en los dos orificios nasales.

Los ejemplos no limitativos de dispositivos de administración intranasal comerciales incluyen la bomba de pulverización nasal EQUADEL® (Aptar Pharma), el dispositivo de polvo seco Solovent (BD Technologies), el dispositivo de administración nasal de fármacos Unidose (Consort Medical PLC), el nebulizador nasal NasoNeb® (MedInvent, LLC), el dispositivo de administración nasal VeriDoser® (Mystic Pharmaceuticals), el dispositivo de administración nasal VRx2™ (Mystic Pharmaceuticals), el dispositivo nasal DirectHaler™ (Direct-Haler A/S), el inhalador de polvo de dosis unitaria de un solo uso TriViar™ (Trimel Pharmaceuticals), el sistema de administración de aerosol SinuStar™ (Pari USA), la bomba Aero (Aero Pump GmbH), el dispositivo de administración nasal Fit-Lizer™ (Shin Nippon Biomedical Laboratories), el dispositivo LMA MAD Nasal™ (LMA North America, Inc.), el sistema de administración de gel bioadhesivo intranasal Compleo (Trimel Pharmaceuticals), el dispositivo de administración olfativa presurizado (POD, por sus siglas en inglés) de Impel (Impel Neuropharma), el atomizador electrónico ViaNase™ (Kurve Technology, Inc.), el desarrollador de administración de polvo OptiNose (OptiNose US Inc.) y el dispositivo de administración de líquido Optinose (OptiNose US Inc.)

En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 10%-20% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 20%-30% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 5%-20% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 30%-40% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 40%-50% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 60%-70% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 60%-80% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 70%-80% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 80%-90% de la dosis medida de IgG a la región olfativa. En una realización, un dispositivo intranasal descrito en el presente documento puede suministrar el 60%-80% de la dosis medida de IgG a la región olfativa.

En determinadas realizaciones, las composiciones de inmunoglobulina humana agrupada se administran mediante un dispositivo intranasal descrito anteriormente en una o más dosis. En una realización, el dispositivo intranasal administra la más de una dosis en orificios nasales alternos. En una realización, el dispositivo intranasal administra la más de una dosis en diferentes puntos de tiempo a lo largo del día. En determinadas realizaciones, la más de una dosis son dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte o más dosis. En determinadas realizaciones, el dispositivo intranasal administra más de una dosis en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más puntos de tiempo a lo largo del día.

En determinadas realizaciones, las composiciones de inmunoglobulina humana agrupada se administran mediante un dispositivo intranasal descrito anteriormente en una dosis inicial o un conjunto de dosis seguido de dosis de mantenimiento repetidas. En determinadas realizaciones, la dosis inicial es una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte o más dosis.

En otra realización, se aplica un gel, una crema, pomada, loción o pasta que contiene IgG humana agrupada sobre el epitelio nasal, por ejemplo, mediante el uso de un bastoncillo o hisopo de aplicación. En una realización particular, se aplica un gel, una crema, pomada, loción o pasta que contiene IgG humana agrupada directamente sobre un epitelio nasal del sujeto. En una realización más específica, se aplica un gel, una crema, pomada, loción o pasta que contiene IgG humana agrupada directamente sobre el epitelio olfativo del sujeto.

En determinadas realizaciones, una fracción sustancial del agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente a uno o más epitelios nasales. En determinadas realizaciones, al menos el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% del

agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente a un epitelio nasal. En una realización específica, una fracción sustancial del agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente al epitelio olfativo. En una realización más específica, al menos el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% del agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente al epitelio olfativo. En otra realización específica, una fracción sustancial del agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente al epitelio nasal inervado con nervios trigéminos. En una realización más específica, al menos el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% del agente terapéutico presente en la composición se suministra directamente al epitelio nasal inervado con nervios trigéminos.

En algunas realizaciones, la IgG humana agrupada puede administrarse a un sujeto como terapia combinada con otro tratamiento, por ejemplo, otro tratamiento para un trastorno del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia asociada a la edad, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple). Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir la administración al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) de uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, un trastorno del sistema nervioso central, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la IgG humana agrupada y el uno o más agentes adicionales se administran al mismo tiempo. En otras realizaciones, la IgG humana agrupada se administra en primer lugar y el uno o más agentes adicionales se administran en segundo lugar. En algunas realizaciones, el uno o más agentes adicionales se administran en primer lugar y la IgG humana agrupada se administra en segundo lugar.

La IgG humana agrupada puede reemplazar o aumentar una terapia administrada con anterioridad o actualmente. Por ejemplo, al tratar con IgG humana agrupada, la administración de uno o más agentes adicionales puede cesar o disminuir, por ejemplo, se administrará en menores niveles. En otras realizaciones, se mantiene la administración de la terapia previa. En algunas realizaciones, se mantendrá una terapia previa hasta que el nivel de IgG policlonal alcance un nivel suficiente como para proporcionar un efecto terapéutico. Las dos terapias pueden administrarse en combinación.

En una realización, un humano que recibe una primera terapia para un trastorno del sistema nervioso central, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, que luego se trata con IgG humana agrupada, continúa recibiendo la primera terapia en la misma cantidad o en una cantidad reducida. En otra realización, el tratamiento con la primera terapia se solapa durante un tiempo con el tratamiento con IgG humana agrupada, pero el tratamiento con la primera terapia se detiene posteriormente.

En una realización particular, la IgG humana agrupada puede administrarse en combinación con un tratamiento para una demencia asociada a la edad, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer. En determinadas realizaciones, el tratamiento para una demencia asociada a la edad coadministrado con IgG humana agrupada es la administración de un inhibidor de la colinesterasa (por ejemplo, ARICEPT (donepezilo), EXELON (rivastigmina), RAZADYNE (galantamina) o COGNEX (tacrina), o un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA (por ejemplo, memantina).

En realizaciones adicionales, la segunda terapia es levodopa (L-DOPA). La segunda terapia también puede ser un agonista de la dopamina. Los ejemplos no limitativos de agonistas de la dopamina incluyen bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, piribedil, cabergolina, apomorfina y lisurida. La segunda terapia puede ser un inhibidor de la MAO-B. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la MAO-B son selegilina y rasgilina. Las segundas terapias adicionales pueden incluir amantadina, composiciones anticolinérgicas, clozapina, modafinilo y fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

En otras realizaciones, la segunda terapia es CAMPATH (alemtuzumab), ZENAPX (daclizumab), rituximab, dirucotida, BHT-3009, cladribina, fumarato de dimetilo, estriol, laquinimod, interferón β -1a pegilado, minociclina, estatinas, temsirolimús, teriflunomida y naltexona a dosis baja.

En determinadas realizaciones, la segunda terapia es la psicoterapia. Los ejemplos no limitativos de psicoterapia son intervención psicosocial, intervención conductual, terapia de recuerdo, terapia de validación, psicoterapia de apoyo, integración sensorial, terapia de presencia simulada, reentrenamiento cognitivo y terapias orientadas a la estimulación, tales como arte, música, mascotas, ejercicio y actividades recreativas.

Además, dos o más segundas terapias se pueden combinar con IgG intranasal terapéutica. Por ejemplo, la IgG intranasal terapéutica puede combinarse con memantina y donepezilo.

Dosificación

El uso de la inmunoglobulina G intravenosa (IGIV) para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC) se encuentra actualmente en investigación (Awad *et al.* 2011 (Current Neuropharmacology, 9:417-428); Pohl *et al.* 2012 (Current Treatment Options in Neurology, 14:264-275); Krause *et al.* 2012 (European J. of Paediatric Neurology, 16:206-208); Elovaara *et al.* 2011 (Clinical Neuropharmacology, 34(2):84-89); Perlmutter, *et al.* 1999 (The Lancet, 354:1153-1158); Snider *et al.* 2003 (J. of Child and Adolescent Psychopharmacology, 13(Sup. 1): S81-S88). En estos

ensayos, a los sujetos se les administran entre 0,4 g/kg de peso corporal y 2,0 g/kg de peso corporal de IGIV por dosificación. Específicamente, los regímenes de tratamiento de los trastornos del SNC con IGIV oscilan desde 0,4 g/kg de peso corporal de IGIV administrado una vez al día durante 5 días consecutivos hasta 2,0 g/kg de peso corporal de IGIV administrado una vez al día durante 2 días consecutivos. Existen varias variaciones de estos regímenes de tratamiento con IGIV. Por ejemplo, los regímenes de tratamiento con IGIV pueden ser de 1,0 g/kg de peso corporal de IGIV administrado dos veces al día (total de 2,0 g/kg de peso corporal de IGIV al día). Las dosificaciones iniciales de IGIV de 2 a 5 días también pueden estar seguidas de dosis de mantenimiento que oscilan desde 0,4 g/kg hasta 0,5 g/kg de peso corporal de IGIV. Debido al suministro limitado de IgG humana agrupada, y al alto coste asociado con la misma, la implementación a gran escala de estos tratamientos puede resultar problemática si son asometidos a prueba por los principales organismos públicos.

La dosificación intravenosa típica de IgG en ensayos de Alzheimer en humanos oscila desde 200 mg/kg hasta 400 mg/kg cada dos semanas. Ventajosamente, los inventores han descubierto que los niveles de IgG humana agrupada observados en el cerebro después de administración intravenosa también pueden lograrse mediante administración intranasal. Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 3 que la administración de IgG humana agrupada (0,02 g/kg de IgG) por vía intranasal en forma de gotas (I.N.1) o una pulverización líquida suministrada directamente al epitelio olfativo (I.N.3) da como resultado sustancialmente la misma cantidad de IgG suministrada a los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro que para la administración intravenosa de IgG humana agrupada (0,02 g/kg de IgG; compárense los valores corregidos de AUC para la administración de IgG en el hemisferio derecho e izquierdo en la tabla 69, tabla 71 y tabla 72). Significativamente, la administración intranasal de gotas de líquido de IgG a concentraciones diez veces menores (0,002 g/kg de IgG) también dio como resultado la administración de IgG intacta a la corteza cerebral (véase la tabla 70). Cualquier reducción de la cantidad de IgG humana agrupada requerida para la administración es significativa debido al suministro limitado de IgG humana agrupada y el alto coste asociado con la misma.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC que se proporcionan en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal desde aproximadamente 0,05 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal (mg/kg de IgG) hasta aproximadamente 500 mg/kg de IgG en una única dosificación.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una dosis baja de IgG humana agrupada. En una realización, una dosis baja de IgG humana agrupada es desde aproximadamente 0,05 mg/kg de IgG hasta aproximadamente 10 mg/kg de IgG. En realizaciones específicas, una dosis baja de IgG humana agrupada es de aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,20 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,50 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,70 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,90 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg o 10,0 mg/kg de IgG. En aún otras realizaciones, una dosis baja de IgG humana agrupada es de desde 0,1 mg/kg hasta 5 mg/kg, de 0,5 mg/kg a 5 mg/kg, de 1 mg/kg a 5 mg/kg, de 2 mg/kg a 5 mg/kg, de 0,5 mg/kg a 10 mg/kg, de 1 mg/kg a 10 mg/kg, de 2 mg/kg a 10 mg/kg, de 1 mg/kg a 8 mg/kg, de 2 mg/kg a 8 mg/kg, de 3 mg/kg a 8 mg/kg, de 4 mg/kg a 8 mg/kg, de 5 mg/kg a 8 mg/kg, de 1 mg/kg a 6 mg/kg, de 2 mg/kg a 6 mg/kg, de 3 mg/kg a 6 mg/kg, de 4 mg/kg a 6 mg/kg, de 5 mg/kg a 6 mg/kg, de 1 mg/kg a 4 mg/kg, de 2 mg/kg a 4 mg/kg o de 3 mg/kg a 4 mg/kg de IgG.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una dosis media de IgG humana agrupada. En una realización, una dosis media de IgG humana agrupada es de desde aproximadamente 10 mg/kg de IgG hasta aproximadamente 100 mg/kg de IgG. En realizaciones específicas, una dosis media de IgG humana agrupada es de aproximadamente 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mg/kg de IgG. En aún otras realizaciones, una dosis media de IgG humana agrupada es de desde 10 mg/kg hasta 100 mg/kg, de 25 mg/kg a 100 mg/kg, de 50 mg/kg a 100 mg/kg, de 75 mg/kg a 100 mg/kg, de 10 mg/kg a 75 mg/kg, de 25 mg/kg a 75 mg/kg, de 50 mg/kg a 75 mg/kg, de 10 mg/kg a 50 mg/kg, de 25 mg/kg a 50 mg/kg o de 10 mg/kg a 25 mg/kg de IgG.

En algunas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una dosis alta de IgG humana agrupada. En una realización, una dosis alta de IgG humana agrupada es de desde aproximadamente 100 mg/kg de IgG hasta aproximadamente 400 mg/kg de IgG. En realizaciones específicas, una dosis alta de IgG humana agrupada es de aproximadamente 100 mg/kg, 110, 120 mg/kg, 130 mg/kg, 140 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg o mayor. En aún otras realizaciones, una dosis alta de IgG humana agrupada es de desde 100 mg/kg hasta 400 mg/kg, de 150 mg/kg a 400 mg/kg, de 200 mg/kg a 400 mg/kg, de 250 mg/kg a 400 mg/kg, de 300 mg/kg a 400 mg/kg, de 350 mg/kg a 400 mg/kg, de 100 mg/kg a 300 mg/kg, de 150 mg/kg a 300 mg/kg, de 200 mg/kg a 300 mg/kg, de 250 mg/kg a 300 mg/kg, de 100 mg/kg a 200 mg/kg, de 150 mg/kg a 200 mg/kg o de 100 mg/kg a 150 mg/kg de IgG.

En algunas realizaciones, la IgG humana agrupada se administra a una dosificación establecida, independientemente del peso del sujeto. Sin querer restringirse por la teoría, a diferencia de la administración intravenosa, la concentración final de IgG en el cerebro debe ser independiente del peso corporal total cuando se administra por vía intranasal, puesto que el agente terapéutico se desplazará directamente desde la nariz hasta el cerebro. Por consiguiente, una dosis convencional de IgG humana agrupada intranasal, que es independiente del peso corporal, puede simplificar el proceso de dosificación de sujetos individuales.

Por consiguiente, en una realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen la administración intranasal de una dosis fija de IgG humana agrupada de desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 10 g. En algunas realizaciones, la dosis fija de IgG es de aproximadamente 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1,0 g, 1,25 g, 1,5 g, 1,75 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g o más de IgG. En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen la administración intranasal de desde 50 mg hasta 5 g, de 100 mg a 5 g, de 250 mg a 5 g, de 500 mg a 5 g, de 750 mg a 5 g, de 1 g a 5 g, de 2,5 g a 5 g, de 50 mg a 2,5 g, de 100 mg a 2,5 g, de 250 mg a 2,5 g, de 500 mg a 2,5 g, de 750 mg a 2,5 g, de 1 g a 2,5 g, de 50 mg a 1 g, de 100 mg a 1 g, de 250 mg a 1 g, de 500 mg a 1 g, de 50 mg a 1 g, de 50 mg a 500 mg, de 100 mg a 500 mg, de 250 mg a 500 mg, de 50 mg a 250 mg, de 100 mg a 250 mg o de 50 mg a 100 mg de IgG humana agrupada.

Dependiendo del trastorno del SNC que esté tratándose y la progresión del trastorno en el sujeto, las composiciones de IgG humana agrupada descritas en el presente documento se administran por vía intranasal a un sujeto en cualquier punto desde varias veces al día hasta mensualmente. Por ejemplo, un sujeto al que se le diagnostica un trastorno del SNC en un estadio temprano de progresión puede requerir sólo una dosificación baja y/o frecuencia de dosificación baja, mientras que un sujeto al que se le diagnostica un trastorno del SNC en un estadio tardío de progresión puede requerir una dosis alta y/o frecuencia de dosificación alta. En aún otra realización, a un sujeto que tiene una alta probabilidad de desarrollar un trastorno del SNC también se le puede prescribir una dosis baja y/o frecuencia de dosificación baja como tratamiento profiláctico o para retrasar la aparición de síntomas asociados con un trastorno del SNC. Por ejemplo, a un sujeto con antecedentes familiares de demencia asociada a la edad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) puede administrársele IgG humana agrupada por vía intranasal en una dosificación baja y/o frecuencia baja para retrasar la aparición de síntomas asociados con la demencia asociada a la edad. Un médico experto será capaz de determinar fácilmente una dosificación y frecuencia de dosificación apropiadas para un sujeto al que se la ha diagnosticado o que tiene una alta probabilidad de desarrollar un trastorno del SNC.

En una realización, cuando la progresión de un trastorno del SNC particular en un sujeto requiere una dosificación frecuente, los métodos proporcionados en el presente documento para tratar un trastorno del sistema nervioso central incluyen administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos una vez a la semana. En otras realizaciones, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis veces a la semana. En aún otra realización, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos una vez al día. En otras realizaciones, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos dos, tres, cuatro, cinco o más veces al día. En una realización específica, el trastorno del SNC es una demencia asociada a la edad, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple. En una realización más específica, el trastorno del SNC es enfermedad de Alzheimer.

En otra realización, cuando la progresión de un trastorno del SNC particular en un sujeto requiere una dosificación menos frecuente, los métodos proporcionados en el presente documento para tratar un trastorno del sistema nervioso central incluyen administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos una vez al mes. En otras realizaciones, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces al mes. En aún otra realización, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos una vez al día. En otras realizaciones, el método incluye administrar una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al sujeto al menos dos, tres, cuatro, cinco o más veces al día. En una realización específica, el trastorno del SNC es una demencia asociada a la edad, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple. En una realización más específica, el trastorno del SNC es enfermedad de Alzheimer.

En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31 veces al mes. La composición puede administrarse entre días del mes igualmente espaciados, por ejemplo, el día 1 y el 15 de cada mes. Alternativamente, la composición puede administrarse en dosificación en bloque al comienzo, al final o a mediados del mes. Por ejemplo, la composición puede administrarse sólo los días 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 ó 1-7 del mes. Pueden administrarse esquemas de dosificación similares a mediados o al final del mes.

En determinadas realizaciones, la dosificación puede cambiar entre días de dosificación. Por ejemplo, en el primer día de dosificación, un sujeto puede recibir 10 mg/kg de IgG y en el segundo día de dosificación, el sujeto puede recibir 20 mg/kg de IgG. De manera similar, un sujeto que recibe dos o más dosis al día de IgG intranasal puede recibir dos

ES 2 759 226 T3

dosis diferentes. Por ejemplo, la primera dosis del día puede ser de 10 mg/kg de IgG y la segunda dosis del día puede ser de 5 mg/kg de IgG.

5 En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC incluyen administrar por vía intranasal desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC incluyen administrar por vía intranasal IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 halladas en la tabla 1 y la tabla 2.

10 Tabla 1. Combinaciones a modo de ejemplo de dosificación y frecuencia para métodos de tratamiento de un trastorno del SNC mediante administración intranasal de IgG humana agrupada.

	Una vez al mes	Dos veces al mes	Tres veces al mes	Cuatro veces al mes	Una vez a la semana	Dos veces a la semana	Tres veces a la semana	Cada dos días
0,05 mg/kg	Var. 1	Var. 52	Var. 103	Var. 154	Var. 205	Var. 256	Var. 307	Var. 358
0,1 mg/kg	Var. 2	Var. 53	Var. 104	Var. 155	Var. 206	Var. 257	Var. 308	Var. 359
0,25 mg/kg	Var. 3	Var. 54	Var. 105	Var. 156	Var. 207	Var. 258	Var. 309	Var. 360
0,5 mg/kg	Var. 4	Var. 55	Var. 106	Var. 157	Var. 208	Var. 259	Var. 310	Var. 361
0,75 mg/kg	Var. 5	Var. 56	Var. 107	Var. 158	Var. 209	Var. 260	Var. 311	Var. 362
1,0 mg/kg	Var. 6	Var. 57	Var. 108	Var. 159	Var. 210	Var. 261	Var. 312	Var. 363
1,5 mg/kg	Var. 7	Var. 58	Var. 109	Var. 160	Var. 211	Var. 262	Var. 313	Var. 364
2,0 mg/kg	Var. 8	Var. 59	Var. 110	Var. 161	Var. 212	Var. 263	Var. 314	Var. 365
2,5 mg/kg	Var. 9	Var. 60	Var. 111	Var. 162	Var. 213	Var. 264	Var. 315	Var. 366
3,0 mg/kg	Var. 10	Var. 61	Var. 112	Var. 163	Var. 214	Var. 265	Var. 316	Var. 367
3,5 mg/kg	Var. 11	Var. 62	Var. 113	Var. 164	Var. 215	Var. 266	Var. 317	Var. 368
4,0 mg/kg	Var. 12	Var. 63	Var. 114	Var. 165	Var. 216	Var. 267	Var. 318	Var. 369
4,5 mg/kg	Var. 13	Var. 64	Var. 115	Var. 166	Var. 217	Var. 268	Var. 319	Var. 370
5,0 mg/kg	Var. 14	Var. 65	Var. 116	Var. 167	Var. 218	Var. 269	Var. 320	Var. 371
6,0 mg/kg	Var. 15	Var. 66	Var. 117	Var. 168	Var. 219	Var. 270	Var. 321	Var. 372
7,0 mg/kg	Var. 16	Var. 67	Var. 118	Var. 169	Var. 220	Var. 271	Var. 322	Var. 373
8,0 mg/kg	Var. 17	Var. 68	Var. 119	Var. 170	Var. 221	Var. 272	Var. 323	Var. 374
9,0 mg/kg	Var. 18	Var. 69	Var. 120	Var. 171	Var. 222	Var. 273	Var. 324	Var. 375
10 mg/kg	Var. 19	Var. 70	Var. 121	Var. 172	Var. 223	Var. 274	Var. 325	Var. 376
11 mg/kg	Var. 20	Var. 71	Var. 122	Var. 173	Var. 224	Var. 275	Var. 326	Var. 377
12 mg/kg	Var. 21	Var. 72	Var. 123	Var. 174	Var. 225	Var. 276	Var. 327	Var. 378
13 mg/kg	Var. 22	Var. 73	Var. 124	Var. 175	Var. 226	Var. 277	Var. 328	Var. 379
14 mg/kg	Var. 23	Var. 74	Var. 125	Var. 176	Var. 227	Var. 278	Var. 329	Var. 380
15 mg/kg	Var. 24	Var. 75	Var. 126	Var. 177	Var. 228	Var. 279	Var. 330	Var. 381
16 mg/kg	Var. 25	Var. 76	Var. 127	Var. 178	Var. 229	Var. 280	Var. 331	Var. 382
17 mg/kg	Var. 26	Var. 77	Var. 128	Var. 179	Var. 230	Var. 281	Var. 332	Var. 383
18 mg/kg	Var. 27	Var. 78	Var. 129	Var. 180	Var. 231	Var. 282	Var. 333	Var. 384
19 mg/kg	Var. 28	Var. 79	Var. 130	Var. 181	Var. 232	Var. 283	Var. 334	Var. 385
20 mg/kg	Var. 29	Var. 80	Var. 131	Var. 182	Var. 233	Var. 284	Var. 335	Var. 386
22,5 mg/kg	Var. 30	Var. 81	Var. 132	Var. 183	Var. 234	Var. 285	Var. 336	Var. 387
25 mg/kg	Var. 31	Var. 82	Var. 133	Var. 184	Var. 235	Var. 286	Var. 337	Var. 388
27,5 mg/kg	Var. 32	Var. 83	Var. 134	Var. 185	Var. 236	Var. 287	Var. 338	Var. 389

ES 2 759 226 T3

30 mg/kg	Var. 33	Var. 84	Var. 135	Var. 186	Var. 237	Var. 288	Var. 339	Var. 390
32,5 mg/kg	Var. 34	Var. 85	Var. 136	Var. 187	Var. 238	Var. 289	Var. 340	Var. 391
35 mg/kg	Var. 35	Var. 86	Var. 137	Var. 188	Var. 239	Var. 290	Var. 341	Var. 392
37,5 mg/kg	Var. 36	Var. 87	Var. 138	Var. 189	Var. 240	Var. 291	Var. 342	Var. 393
40 mg/kg	Var. 37	Var. 88	Var. 139	Var. 190	Var. 241	Var. 292	Var. 343	Var. 394
45 mg/kg	Var. 38	Var. 89	Var. 140	Var. 191	Var. 242	Var. 293	Var. 344	Var. 395
50 mg/kg	Var. 39	Var. 90	Var. 141	Var. 192	Var. 243	Var. 294	Var. 345	Var. 396
0,5-40 mg/kg	Var. 40	Var. 91	Var. 142	Var. 193	Var. 244	Var. 295	Var. 346	Var. 397
0,5-30 mg/kg	Var. 41	Var. 92	Var. 143	Var. 194	Var. 245	Var. 296	Var. 347	Var. 398
0,5-20 mg/kg	Var. 42	Var. 93	Var. 144	Var. 195	Var. 246	Var. 297	Var. 348	Var. 399
0,5-20 mg/kg	Var. 43	Var. 94	Var. 145	Var. 196	Var. 247	Var. 298	Var. 349	Var. 400
0,5-10 mg/kg	Var. 44	Var. 95	Var. 146	Var. 197	Var. 248	Var. 299	Var. 350	Var. 401
0,5-5 mg/kg	Var. 45	Var. 96	Var. 147	Var. 198	Var. 249	Var. 300	Var. 351	Var. 402
1-20 mg/kg	Var. 46	Var. 97	Var. 148	Var. 199	Var. 250	Var. 301	Var. 352	Var. 403
1-15 mg/kg	Var. 47	Var. 98	Var. 149	Var. 200	Var. 251	Var. 302	Var. 353	Var. 404
1-10 mg/kg	Var. 48	Var. 99	Var. 150	Var. 201	Var. 252	Var. 303	Var. 354	Var. 405
1-5 mg/kg	Var. 49	Var. 100	Var. 151	Var. 202	Var. 253	Var. 304	Var. 355	Var. 406
2-10 mg/kg	Var. 50	Var. 101	Var. 152	Var. 203	Var. 254	Var. 305	Var. 356	Var. 407
2-5 mg/kg	Var. 51	Var. 102	Var. 153	Var. 204	Var. 255	Var. 306	Var. 357	Var. 408

* Var. = variación

Tabla 2. Combinaciones a modo de ejemplo de dosificación y frecuencia para métodos de tratamiento de un trastorno del SNC mediante administración intranasal de IgG humana agrupada.

	Cuatro veces a la semana	Cinco veces a la semana	Seis veces a la semana	Una vez al día	Dos veces al día	Tres veces al día	Cuatro veces al día	Cinco veces al día
0,05 mg/kg	Var. 409	Var. 460	Var. 511	Var. 562	Var. 613	Var. 664	Var. 715	Var. 766
0,1 mg/kg	Var. 410	Var. 461	Var. 512	Var. 563	Var. 614	Var. 665	Var. 716	Var. 767
0,25 mg/kg	Var. 411	Var. 462	Var. 513	Var. 564	Var. 615	Var. 666	Var. 717	Var. 768
0,5 mg/kg	Var. 412	Var. 463	Var. 514	Var. 565	Var. 616	Var. 667	Var. 718	Var. 769
0,75 mg/kg	Var. 413	Var. 464	Var. 515	Var. 566	Var. 617	Var. 668	Var. 719	Var. 770
1,0 mg/kg	Var. 414	Var. 465	Var. 516	Var. 567	Var. 618	Var. 669	Var. 720	Var. 771
1,5 mg/kg	Var. 415	Var. 466	Var. 517	Var. 568	Var. 619	Var. 670	Var. 721	Var. 772
2,0 mg/kg	Var. 416	Var. 467	Var. 518	Var. 569	Var. 620	Var. 671	Var. 722	Var. 773
2,5 mg/kg	Var. 417	Var. 468	Var. 519	Var. 570	Var. 621	Var. 672	Var. 723	Var. 774
3,0 mg/kg	Var. 418	Var. 469	Var. 520	Var. 571	Var. 622	Var. 673	Var. 724	Var. 775
3,5 mg/kg	Var. 419	Var. 470	Var. 521	Var. 572	Var. 623	Var. 674	Var. 725	Var. 776
4,0 mg/kg	Var. 420	Var. 471	Var. 522	Var. 573	Var. 624	Var. 675	Var. 726	Var. 777
4,5 mg/kg	Var. 421	Var. 472	Var. 523	Var. 574	Var. 625	Var. 676	Var. 727	Var. 778
5,0 mg/kg	Var. 422	Var. 473	Var. 524	Var. 575	Var. 626	Var. 677	Var. 728	Var. 779

ES 2 759 226 T3

6,0 mg/kg	Var. 423	Var. 474	Var. 525	Var. 576	Var. 627	Var. 678	Var. 729	Var. 780
7,0 mg/kg	Var. 424	Var. 475	Var. 526	Var. 577	Var. 628	Var. 679	Var. 730	Var. 781
8,0 mg/kg	Var. 425	Var. 476	Var. 527	Var. 578	Var. 629	Var. 680	Var. 731	Var. 782
9,0 mg/kg	Var. 426	Var. 477	Var. 528	Var. 579	Var. 630	Var. 681	Var. 732	Var. 783
10 mg/kg	Var. 427	Var. 478	Var. 529	Var. 580	Var. 631	Var. 682	Var. 733	Var. 784
11 mg/kg	Var. 428	Var. 479	Var. 530	Var. 581	Var. 632	Var. 683	Var. 734	Var. 785
12 mg/kg	Var. 429	Var. 480	Var. 531	Var. 582	Var. 633	Var. 684	Var. 735	Var. 786
13 mg/kg	Var. 430	Var. 481	Var. 532	Var. 583	Var. 634	Var. 685	Var. 736	Var. 787
14 mg/kg	Var. 431	Var. 482	Var. 533	Var. 584	Var. 635	Var. 686	Var. 737	Var. 788
15 mg/kg	Var. 432	Var. 483	Var. 534	Var. 585	Var. 636	Var. 687	Var. 738	Var. 789
16 mg/kg	Var. 433	Var. 484	Var. 535	Var. 586	Var. 637	Var. 688	Var. 739	Var. 790
17 mg/kg	Var. 434	Var. 485	Var. 536	Var. 587	Var. 638	Var. 689	Var. 740	Var. 791
18 mg/kg	Var. 435	Var. 486	Var. 537	Var. 588	Var. 639	Var. 690	Var. 741	Var. 792
19 mg/kg	Var. 436	Var. 487	Var. 538	Var. 589	Var. 640	Var. 691	Var. 742	Var. 793
20 mg/kg	Var. 437	Var. 488	Var. 539	Var. 590	Var. 641	Var. 692	Var. 743	Var. 794
22,5 mg/kg	Var. 438	Var. 489	Var. 540	Var. 591	Var. 642	Var. 693	Var. 744	Var. 795
25 mg/kg	Var. 439	Var. 490	Var. 541	Var. 592	Var. 643	Var. 694	Var. 745	Var. 796
27,5 mg/kg	Var. 440	Var. 491	Var. 542	Var. 593	Var. 644	Var. 695	Var. 746	Var. 797
30 mg/kg	Var. 441	Var. 492	Var. 543	Var. 594	Var. 645	Var. 696	Var. 747	Var. 798
32,5 mg/kg	Var. 442	Var. 493	Var. 544	Var. 595	Var. 646	Var. 697	Var. 748	Var. 799
35 mg/kg	Var. 443	Var. 494	Var. 545	Var. 596	Var. 647	Var. 698	Var. 749	Var. 800
37,5 mg/kg	Var. 444	Var. 495	Var. 546	Var. 597	Var. 648	Var. 699	Var. 750	Var. 801
40 mg/kg	Var. 445	Var. 496	Var. 547	Var. 598	Var. 649	Var. 700	Var. 751	Var. 802
45 mg/kg	Var. 446	Var. 497	Var. 548	Var. 599	Var. 650	Var. 701	Var. 752	Var. 803
50 mg/kg	Var. 447	Var. 498	Var. 549	Var. 600	Var. 651	Var. 702	Var. 753	Var. 804
0,5-40 mg/kg	Var. 448	Var. 499	Var. 550	Var. 601	Var. 652	Var. 703	Var. 754	Var. 805
0,5-30 mg/kg	Var. 449	Var. 500	Var. 551	Var. 602	Var. 653	Var. 704	Var. 755	Var. 806
0,5-20 mg/kg	Var. 450	Var. 501	Var. 552	Var. 603	Var. 654	Var. 705	Var. 756	Var. 807
0,5-20 mg/kg	Var. 451	Var. 502	Var. 553	Var. 604	Var. 655	Var. 706	Var. 757	Var. 808
0,5-10 mg/kg	Var. 452	Var. 503	Var. 554	Var. 605	Var. 656	Var. 707	Var. 758	Var. 809
0,5-5 mg/kg	Var. 453	Var. 504	Var. 555	Var. 606	Var. 657	Var. 708	Var. 759	Var. 810
1-20 mg/kg	Var. 454	Var. 505	Var. 556	Var. 607	Var. 658	Var. 709	Var. 760	Var. 811
1-15 mg/kg	Var. 455	Var. 506	Var. 557	Var. 608	Var. 659	Var. 710	Var. 761	Var. 812
1-10 mg/kg	Var. 456	Var. 507	Var. 558	Var. 609	Var. 660	Var. 711	Var. 762	Var. 813
1-5 mg/kg	Var. 457	Var. 508	Var. 559	Var. 610	Var. 661	Var. 712	Var. 763	Var. 814
2-10 mg/kg	Var. 458	Var. 509	Var. 560	Var. 611	Var. 662	Var. 713	Var. 764	Var. 815
2-5 mg/kg	Var. 459	Var. 510	Var. 561	Var. 612	Var. 663	Var. 714	Var. 765	Var. 816

* Var. = variación

Formulación

5 Las composiciones farmacéuticas de la inmunoglobulina G humana agrupada descritas en el presente documento pueden prepararse según métodos bien conocidos y puestos en práctica de manera rutinaria en la técnica. Véanse, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., vigésima edición, 2000; y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones de BPF. Normalmente, una dosis terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de la preparación de IgG humana agrupada se emplea en las
10 composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.
15 Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

20 Los niveles de dosificación reales pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular sin ser tóxico para el paciente. Un médico puede comenzar las dosis de la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis eficaces varían según muchos factores diferentes, incluyendo la enfermedad o el estado específico que va a tratarse, su gravedad, el estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.
25

30 En una realización, una composición terapéutica de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal no contiene un potenciador de la permeabilidad. Los potenciadores de la permeabilidad facilitan el transporte de moléculas a través de la mucosa, incluyendo la mucosidad y el epitelio nasal. Los ejemplos no limitativos de potenciadores de la absorción incluyen mucoadhesivos, inhibidores del latido ciliar, fluidificantes mucosos, fluidificantes de membrana y moduladores de unión estrecha. Los ejemplos no limitativos específicos incluyen sales biliares, fosfolípidos, glicirretinato de sodio, caprato de sodio, tartrato de amonio, ácido gamma-aminolevulínico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido oxaloacético.
35

Además de la IgG humana agrupada, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento incluyen uno o más agentes estabilizantes. En una realización específica, el agente estabilizante es un agente tamponante adecuado para administración intranasal. Los ejemplos no limitativos de agentes tamponantes adecuados para formular las composiciones de IgG humana agrupada proporcionadas en el presente documento incluyen un aminoácido (por ejemplo, glicina, histidina o prolina), una sal (por ejemplo, citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato, lactato, gluconato, malato, succinato, formiato, propionato o carbonato), o cualquier combinación de los mismos ajustada a un pH apropiado. Generalmente, el agente tamponante será suficiente para mantener un pH adecuado en la formulación durante un período de tiempo prolongado. En una realización particular, el agente tamponante es suficiente para mantener un pH de 4 a 7,5. En una realización específica, el agente tamponante es suficiente para mantener un pH de aproximadamente 4,0, o aproximadamente 4,5, o aproximadamente 5,0, o aproximadamente 5,5, o aproximadamente 6,0, o aproximadamente 6,5, o aproximadamente 7,0, o aproximadamente 7,5.
40
45

50 En una realización particular, una composición de IgG humana agrupada descrita en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC mediante administración intranasal contiene una cantidad estabilizante de un aminoácido. En determinadas realizaciones, una cantidad estabilizante de un aminoácido es de desde aproximadamente 25 mM hasta aproximadamente 500 mM.

55 En una realización particular, el agente estabilizante empleado en las composiciones de IgG humana agrupada proporcionadas en el presente documento es un aminoácido. Los ejemplos no limitativos de aminoácidos incluyen isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, arginina, histidina, ornitina, taurina, combinaciones de los mismos y similares. En una realización, los aminoácidos estabilizantes incluyen arginina, histidina, lisina, serina, prolina, glicina, alanina, treonina y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el aminoácido es glicina. En otra realización preferida, el aminoácido es prolina. En otra realización más preferida, el aminoácido es histidina.
60

65 Con propósitos de estabilizar las composiciones proporcionadas en el presente documento, el agente tamponante (por ejemplo, la glicina, histidina o prolina) se añadirá normalmente a la formulación (o a una disolución a partir de la cual se preparará una composición de polvo seco) a una concentración de desde 5 mM hasta 0,75 M. En una realización,

se añade al menos 100 mM del agente tamponante a la formulación. En otra realización, se añade al menos 200 mM del agente tamponante a la formulación. En aún otra realización, se añade al menos 250 mM del agente tamponante a la formulación. En aún otras realizaciones, las formulaciones proporcionadas en el presente documento contienen al menos 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, 700 mM, 750 mM o más del agente tamponante. En una realización específica, el agente tamponante es glicina.

En una realización, la concentración de agente tamponante (por ejemplo, glicina, histidina o prolina) en la formulación (o en la disolución a partir de la cual se preparará una composición de polvo seco) es de aproximadamente desde 5 mM hasta 500 mM. En determinadas realizaciones, la concentración del agente tamponante en la formulación será de o aproximadamente de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 225 mM, 250 mM, 275 mM, 300 mM, 325 mM, 350 mM, 375 mM, 400 mM, 425 mM, 450 mM, 475 mM, 500 mM o más. En una realización específica, el agente tamponante es glicina.

En aún otras realizaciones, la concentración del agente tamponante (por ejemplo, glicina, histidina o prolina) en la formulación (o en la disolución a partir de la cual se preparará una composición de polvo seco) es de desde 50 mM hasta 500 mM, de 100 mM a 500 mM, de 200 mM a 500 mM, de 250 mM a 500 mM, de 300 mM a 500 mM, de 50 mM a 300 mM, de 100 mM a 300 mM, de 200 mM a 300 mM o de 225 mM a 275 mM. En aún otras realizaciones específicas, la concentración del agente tamponante (por ejemplo, glicina, histidina o prolina) en las formulaciones proporcionadas en el presente documento es de 250 ± 50 mM, 250 ± 40 mM, 250 ± 30 mM, 250 ± 25 mM, 250 ± 20 mM, 250 ± 15 mM, 250 ± 10 mM, 250 ± 5 mM o 250 mM.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas humanas agrupadas se formulan con histidina entre 100 mM y 400 mM; no más de 10 mM de un catión de metal alcalino; y un pH de entre 5,0 y 7,0.

En algunas realizaciones de la formulación de histidina e inmunoglobulina humana agrupada, la concentración de histidina es de entre 5 mM y 500 mM. En otra realización, la concentración de histidina en la formulación será de entre 100 mM y 400 mM. En otra realización, la concentración de histidina en la formulación será de entre 200 mM y 300 mM. En otra realización, la concentración de histidina en la formulación será de entre 225 mM y 275 mM. En otra realización, la concentración de histidina en la formulación será de entre 240 mM y 260 mM. En una realización particular, la concentración de histidina será de 250 mM. En determinadas otras realizaciones, la concentración de histidina en la formulación será de $5 \pm 0,5$ mM, 10 ± 1 mM, $15 \pm 1,5$ mM, 20 ± 2 mM, $25 \pm 2,5$ mM, 50 ± 5 mM, $75 \pm 7,5$ mM, 100 ± 10 mM, $125 \pm 12,5$ mM, 150 ± 15 mM, $175 \pm 17,5$ mM, 200 ± 20 mM, $225 \pm 22,5$ mM, 250 ± 25 mM, $275 \pm 27,5$ mM, 300 ± 30 mM, $325 \pm 32,5$ mM, 350 ± 35 mM, $375 \pm 37,5$ mM, 400 ± 40 mM, $425 \pm 42,5$ mM, 450 ± 45 mM, $475 \pm 47,5$ mM, 500 ± 50 mM o más. En aún otras realizaciones, la concentración de histidina en la formulación será de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 225 mM, 250 mM, 275 mM, 300 mM, 325 mM, 350 mM, 375 mM, 400 mM, 425 mM, 450 mM, 475 mM, 500 mM o más.

En algunas realizaciones de la formulación de histidina e inmunoglobulina humana agrupada, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 4,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,5 hasta 5,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 5,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 6,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,0 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,5 hasta 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,5 hasta 6,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,5 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 4,5 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,5 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 6,0 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 6,5 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,0 hasta 6,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,0 hasta 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,5 hasta 6,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,0 hasta 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,5 hasta 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,0 hasta 5,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 7,0 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 6,0 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,5 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de desde 5,0 hasta 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $5,3 \pm 0,2$, $5,4 \pm 0,2$, $5,5 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $5,7 \pm 0,2$, $5,8 \pm 0,2$, $5,9 \pm 0,2$, $6,0 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$, $6,2 \pm 0,2$, $6,3 \pm 0,2$, $6,4 \pm 0,2$, $6,5 \pm 0,2$, $6,6 \pm 0,2$, $6,7 \pm 0,2$, $6,8 \pm 0,2$, $6,9 \pm 0,2$ ó $7,0 \pm 0,2$. En algunas realizaciones, el pH de la formulación de histidina es de $5,0 \pm 0,1$, $5,1 \pm 0,1$, $5,2 \pm 0,1$, $5,3 \pm 0,1$, $5,4 \pm 0,1$, $5,5 \pm 0,1$, $5,6 \pm 0,1$, $5,7 \pm 0,1$, $5,8 \pm 0,1$, $5,9 \pm 0,1$, $6,0 \pm 0,1$, $6,1 \pm 0,1$, $6,2 \pm 0,1$, $6,3 \pm 0,1$, $6,4 \pm 0,1$, $6,5 \pm 0,1$, $6,6 \pm 0,1$, $6,7 \pm 0,1$, $6,8 \pm 0,1$, $6,9 \pm 0,1$ ó $7,0 \pm 0,1$.

En una realización, las composiciones de IgG humana agrupada descritas en el presente documento para el

tratamiento de un trastorno del SNC mediante administración intranasal se formulan a un pH de desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 7,0. En realizaciones particulares, las composiciones de IgG humana agrupada se formulan a un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,7, 6,8, 6,9 ó 7,0. En otras realizaciones, una composición de IgG humana agrupada se formula a un pH de desde 4,0 hasta 6,5, 4,0 a 6,0, de 4,0 a 5,5, de 4,0 a 5,0, de 4,0 a 4,5, de 4,5 a 6,5, de 4,5 a 6,0, de 4,5 a 5,5, de 4,5 a 5,0. En aún otras realizaciones, una composición de IgG humana agrupada se formula a un pH de $4,8 \pm 0,5$, $4,8 \pm 0,4$, $4,8 \pm 0,3$, $4,8 \pm 0,2$, $4,8 \pm 0,1$ o aproximadamente 4,8.

En una realización, se proporcionan composiciones líquidas de IgG humana agrupada formuladas para administración intranasal para el tratamiento de trastornos del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple). En una realización específica, la composición líquida es una composición acuosa. En una realización particular, una composición terapéutica acuosa formulada para administración intranasal proporcionada en el presente documento consiste esencialmente en un agente tamponante e IgG humana agrupada.

En una realización, una composición líquida formulada para administración intranasal contiene desde aproximadamente 1,0 g de IgG humana agrupada por litro (g/l de IgG) hasta aproximadamente 250 g/l de IgG. En otras realizaciones, la composición líquida formulada para administración intranasal contiene aproximadamente 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 10 g/l, 12,5 g/l, 15 g/l, 17,5 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 210 g/l, 220 g/l, 230 g/l, 240 g/l, 250 g/l, o una concentración mayor de IgG humana agrupada. En determinadas realizaciones, la composición líquida formulada para administración intranasal contiene desde 5,0 g/l hasta 250 g/l, de 10 g/l a 250 g/l, de 20 g/l a 250 g/l, de 30 g/l a 250 g/l, de 40 g/l a 250 g/l, de 50 g/l a 250 g/l, de 60 g/l a 250 g/l, de 70 g/l a 250 g/l, de 80 g/l a 250 g/l, de 90 g/l a 250 g/l, de 100 g/l a 250 g/l, de 125 g/l a 250 g/l, de 150 g a 250 g/l, de 175 g/l a 250 g/l, de 200 g/l a 250 g/l de IgG.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida que contiene una baja concentración de IgG humana agrupada. En una realización, una baja concentración de IgG humana agrupada contiene desde 1,0 g/l hasta 100 g/l, de 5,0 g/l a 100 g/l, de 10 g/l a 100 g/l, de 20 g/l a 100 g/l, de 30 g/l a 100 g/l, de 40 g/l a 100 g/l, de 50 g/l a 100 g/l, de 60 g/l a 100 g/l, de 70 g/l a 100 g/l, de 75 g/l a 100 g/l, de 80 g/l a 100 g/l, de 1,0 g/l a 50 g/l, de 5,0 g/l a 50 g/l, de 10 g/l a 50 g/l, de 20 g/l a 50 g/l, de 30 g/l a 50 g/l o de 40 g/l a 50 g/l de IgG.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida que contiene una concentración intermedia de IgG humana agrupada. En una realización, una concentración intermedia de IgG humana agrupada contiene desde 75 g/l hasta 200 g/l, de 100 g/l a 200 g/l, de 110 g/l a 200 g/l, de 120 g/l a 200 g/l, de 130 g/l a 200 g/l, de 140 g/l a 200 g/l, de 150 g/l a 200 g/l, de 160 g/l a 200 g/l, de 170 g/l a 200 g/l, de 175 g/l a 200 g/l, de 180 g/l a 200 g/l, de 75 g/l a 150 g/l, de 100 g/l a 150 g/l, de 110 g/l a 150 g/l, de 120 g/l a 150 g/l, de 130 g/l a 150 g/l o de 140 g/l a 150 g/l de IgG.

En determinadas realizaciones, los métodos para tratar un trastorno del SNC proporcionados en el presente documento incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida que contiene una alta concentración de IgG humana agrupada. En una realización, una alta concentración de IgG humana agrupada contiene desde 175 g/l hasta 250 g/l, de 200 g/l a 250 g/l, de 210 g/l a 250 g/l, de 220 g/l a 250 g/l, de 230 g/l a 250 g/l o de 240 g/l a 250 g/l de IgG.

En una realización particular, una composición líquida de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal consiste esencialmente en IgG humana agrupada desde 100 g/l hasta 250 g/l y glicina desde 150 mM hasta 350 mM.

En otra realización particular, una composición líquida de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal consiste esencialmente en IgG humana agrupada desde 150 g/l hasta 250 g/l y glicina desde 200 mM hasta 300 mM.

En otra realización particular más, una composición líquida de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal consiste esencialmente en IgG humana agrupada desde 200 g/l hasta 250 g/l y glicina 250 ± 25 mM.

En determinadas realizaciones, las composiciones líquidas de IgG humana agrupada formuladas para administración intranasal proporcionadas en el presente documento incluyen además un humectante. Los ejemplos no limitativos de humectantes incluyen glicerina, polisacáridos y polietilenglicoles.

En determinadas realizaciones, las composiciones líquidas de IgG humana agrupada formuladas para administración intranasal proporcionadas en el presente documento incluyen además un agente que aumenta las propiedades de flujo de la composición. Los ejemplos no limitativos de agentes que aumentan las propiedades de flujo de una composición acuosa incluyen carboximetilcelulosa sódica, ácido hialurónico, gelatina, algina, carragenanos, carbómeros, galactomananos, polietilenglicoles, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetildextrano sódico

y goma xantana.

5 En una realización, se proporcionan composiciones de polvo seco de IgG humana agrupada formuladas para administración intranasal para el tratamiento de trastornos del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple). En una realización específica, una composición terapéutica de polvo seco formulada para administración intranasal proporcionada en el presente documento consiste esencialmente en un agente tamponante e IgG humana agrupada.

10 En una realización, una composición de polvo seco de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además un agente de carga. Los ejemplos no limitativos de agentes de carga incluyen copolímero de oxietileno-anhídrido maleico, poli(vinil éter), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poliacrilatos, incluyendo poliacrilato de sodio, potasio o amonio, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo), polímero de carboxivinilo, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosas (incluyendo celulosa, celulosa microcristalina y alfa-celulosa), derivados de celulosa (incluyendo metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y etilhidroxietilcelulosa), dextrinas (incluyendo alfa, beta o gamma-ciclodextrina y dimetil-beta-ciclodextrina), almidones (incluyendo hidroxietilalmidón, hidroxipropilalmidón, carboximetilalmidón), polisacáridos (incluyendo dextrano, dextrina y ácido algínico, ácido hialurónico y ácido péctico), hidratos de carbono (tales como manitol, glucosa, lactosa, fructosa, sacarosa y amilosa), proteínas (incluyendo caseína, gelatina, quitina y quitosano), gomas (tales como goma arábiga, goma xantana, goma tragacanto y glucomanano), fosfolípidos, y combinaciones de los mismos.

25 En determinadas realizaciones, una composición de polvo seco de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además un potenciador de la penetración en la mucosa. Los ejemplos no limitativos de potenciadores de la penetración en la mucosa son sales biliares, ácidos grasos, tensioactivos y alcoholes. Ejemplos específicos no limitativos de potenciadores de la penetración en la mucosa son colato de sodio, dodecilsulfato de sodio, desoxicolato de sodio, taurodesoxicolato, glicocolato de sodio, dimetilsulfóxido o etanol.

30 En determinadas realizaciones, una composición de polvo seco de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además un dispersante. Un dispersante es un agente que ayuda a la aerosolización de la IgG o la absorción de la IgG en el tejido de la mucosa intranasal, o en ambos. Los ejemplos no limitativos de dispersantes son potenciadores de la penetración en la mucosa y tensioactivos.

35 En determinadas realizaciones, una composición de polvo seco de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además un agente bioadhesivo. Los ejemplos no limitativos de agentes bioadhesivos incluyen quitosano o ciclodextrina. En determinadas realizaciones, una composición de polvo seco de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además una carga. Los ejemplos no limitativos de cargas incluyen azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como: por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica; u otros tales como: polivinilpirrolidona (PVP o povidona) o fosfato de calcio.

45 El tamaño de partícula de una composición de polvo seco de IgG humana agrupada puede determinarse mediante métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, las partículas pueden cribarse o filtrarse a través de un tamiz de malla. En determinadas realizaciones, las partículas secas tienen un diámetro promedio de desde aproximadamente 0,1 μm hasta aproximadamente 250 μm . En algunas realizaciones, las partículas secas tienen un diámetro promedio de entre 1 μm y aproximadamente 25 μm . En algunas realizaciones, las partículas secas tienen un diámetro promedio de entre 10 μm y aproximadamente 100 μm . En aún otras realizaciones, las partículas de arrastre tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,1 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,2 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,3 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,4 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,5 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,6 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,7 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,8 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 0,9 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 1,0 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 2 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 3 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 4 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 5 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 6 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 7 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 8 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 9 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 10 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 11 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 12 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 13 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 14 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 15 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 16 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 17 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 18 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 19 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 20 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 25 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 30 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 35 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 40 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 45 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 50 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 60 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 65 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 70 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 75 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 80 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 85 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 90 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 95 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 100 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 110 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 120 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 130 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 140 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 150 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 160 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 170 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 180 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 190 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 200 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 225 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 250 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 275 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 300 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 350 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 400 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 450 $\mu\text{m} \pm 10\%$, 500 $\mu\text{m} \pm 10\%$ o más.

60 En una realización, se proporcionan composiciones de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal para el tratamiento de trastornos del SNC (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple). En una realización específica, una composición terapéutica de gel, crema o pomada formulada para administración intranasal proporcionada en el presente documento consiste esencialmente en un agente tamponante e IgG humana agrupada.

65 En una realización, una composición de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada formulada para administración intranasal comprende además un agente portador. Los ejemplos no limitativos de agentes portadores para

composiciones de gel y pomada incluyen polímeros naturales o sintéticos tales como ácido hialurónico, alginato de sodio, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma xantana, dextrina, carboximetilalmidón, poli(alcohol vinílico), poli(acrilato de sodio), copolímero de metoxietileno-anhídrido maleico, poli(vinil éter), polivinilpirrolidona, grasas y aceites como cera de abejas, aceite de oliva, manteca de cacao, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de camelia, aceite de cacahuete, grasa de vaca, manteca de cerdo y lanolina, vaselina blanca, parafinas, pomadas de gel de hidrocarburo, ácidos grasos tales como ácido esteárico, alcoholes tales como alcohol cetílico y alcohol estearílico, polietilenglicol, agua, y combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, las inmunoglobulinas humanas agrupadas se formulan conjuntamente con uno o más agentes vasoconstrictores. Cuando está presente, el agente vasoconstrictor reduce la exposición no diana (por ejemplo, exposición sistémica) de la inmunoglobulina humana agrupada, al reducir la absorción de las inmunoglobulinas en la sangre, aumentando eficazmente el direccionamiento de la inmunoglobulina al SNC (por ejemplo, al cerebro). Pueden hallarse métodos para la formulación conjunta de otros productos farmacéuticos y vasoconstrictores en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0305077. Entre los ejemplos no limitativos de vasoconstrictores que pueden formularse conjuntamente con inmunoglobulinas humanas agrupadas de esta manera se incluyen tetrahidrozolina, metoxamina, fenilefrina, efedrina, norepinefrina, oximetazolina, tetrahidrozolina, xilometazolina, clonidina, guanabenz, guanfacina, α -metildopa, arginina-vasopresina y pseudoefedrina.

20 Trastornos del sistema nervioso central -

El tratamiento con IGIV se ha usado en el tratamiento de trastornos del SNC. Específicamente, la IGIV se ha estudiado o usado en el tratamiento de esclerosis múltiple (EM), síndrome de la persona rígida, enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome postpolio, narcolepsia, accidente cerebrovascular y fibromialgia y otros síndromes de dolor. Stangle 2008 (Therapeutic Advances in Neurological Disorders, 1(2):115-124).

La IGIV también se ha usado para tratar la neuromielitis óptica (NMO). La NMO, también conocida como enfermedad de Devic o síndrome de Devic, es un trastorno inflamatorio autoinmunitario de los nervios ópticos y la médula espinal. Por ejemplo, se ha usado una dosis de inducción de 2 g/kg de IGIV seguida de dosis de mantenimiento mensuales de 0,4-0,5 g/kg de IGIV para tratar la NMO. Awad *et al.* 2011 (Current Neuropharmacology, 9:417428).

La IGIV también se ha usado y estudiado para el tratamiento de la encefalomielite aguda diseminada (EMAD). La EMAD es una enfermedad del cerebro mediada por el sistema inmunitario. Específicamente, la EMAD implica desmielinización autoinmunitaria y se clasifica como una enfermedad límite de EM. Por ejemplo, puede usarse una dosis convencional de 2 g/kg de IGIV administrada durante 2-5 días para tratar la EMAD. Pohl *et al.* 2012 (Current Treatment Options in Neurology, 14:264-275).

La IGIV también ha estudiado y usado en el tratamiento de enfermedad de Parkinson (EP). Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que la IGIV puede reducir la neurotoxicidad de la α -sinucleína, un posible factor que contribuye a la patogénesis de la EP, a través de un mecanismo desconocido. Smith *et al.* 2012 (International Immunopharmacology, 14:550-557) y Patrias *et al.* (Inmunología clínica y experimental, 161:527-535).

La IGIV también se ha usado y estudiado para el tratamiento de la EM. Por ejemplo, la IGIV se ha usado con éxito en el tratamiento de la enfermedad de Schilder (ES), una variante rara de la EM. Krause *et al.* 2012 (European J. of Pediatric Neurology, 16:206-208). También se ha sugerido que la IGIV es beneficiosa en el tratamiento de las recaídas agudas en pacientes con EM. Elovaara *et al.* 2011 (Clinical Neuropharmacology, 34(2):84-89).

La IGIV también se ha usado y estudiado para el tratamiento de trastornos obsesivo-compulsivos (TOC) y trastornos de tics. Por ejemplo, se demostró que la IGIV disminuye la intensidad de los síntomas del TOC y los trastornos de tics en niños con TOC y trastornos de tics provocados por infecciones. Perlmutter *et al.* 1999 (The Lancet, 354:1153-1158). De manera similar, se ha demostrado que la IGIV es eficaz para reducir la intensidad de los síntomas neuropsiquiátricos en un subgrupo de pacientes con TOC y trastorno de tics con TOC y trastornos de tics de inicio en la infancia. Snider *et al.* 2003 (J. of Child and Adolescent Psychopharmacology, 13 (sup. 1): S81-S88).

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que la administración de la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio de la cavidad nasal del sujeto. En una realización específica, la composición se administra directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal. En determinadas realizaciones, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central, un trastorno extrapiramidal y de movimiento, un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central, un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central, un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central, un síndrome paralítico del sistema nervioso central, un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central, un trastorno mental orgánico, un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas, un esquizofrenia, un trastorno esquizotípico o delirante, un trastorno del estado de ánimo (afectivo), un trastorno neurótico, relacionado

- con el estrés o somatoforme, un síndrome conductual, un trastorno de personalidad o conductual de un adulto, un trastorno del desarrollo psicológico o un trastorno conductual o emocional de inicio infantil. En algunas realizaciones, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, parálisis cerebral, trastorno bipolar, esquizofrenia o síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS). En algunas realizaciones, el trastorno del SNC se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS) o síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).
- En una realización, el trastorno del SNC es una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de atrofas sistémicas que afectan principalmente al sistema nervioso central incluyen: enfermedad de Huntington; ataxias hereditarias (por ejemplo, ataxia congénita no progresiva, ataxias cerebelosas de inicio temprano, tales como ataxia cerebelosa de inicio temprano con temblor esencial, ataxia de Hunt, ataxia cerebelosa de inicio temprano con conservación de reflejos tendinosos, ataxia de Friedreich y ataxia espinocerebelosa recesiva ligada al cromosoma X: ataxia cerebelosa de inicio tardío, ataxia-telangiectasia (síndrome de Louis-Bar) o paraplejía espástica hereditaria); una atrofia muscular espinal o un trastorno relacionado de la misma (por ejemplo, enfermedad de Werdnig-Hoffman (tipo 1), parálisis bulbar progresiva de la infancia (síndrome de Fazio-Londe), enfermedad de Kugelberg-Welander (tipo 3) o una enfermedad de la neurona motora, tal como enfermedad familiar de la neurona motora, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria, parálisis bulbar progresiva y atrofia muscular espinal progresiva); neuropatía y neuromiopatía paraneoplásica; atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central en la enfermedad neoplásica; encefalopatía límbica paraneoplásica; y atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central en mixedema.
- En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno extrapiramidal y de movimiento. Los ejemplos no limitativos de trastornos extrapiramidales y de movimiento que afectan al sistema nervioso central incluyen: enfermedad de Parkinson; un parkinsonismo secundario (por ejemplo, síndrome neuroléptico maligno o parkinsonismo postencefalítico); una enfermedad degenerativa de los ganglios basales (por ejemplo, enfermedad de Hallervorden-Spatz, oftalmoplejía supranuclear progresiva (enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski) o degeneración estriatonigrica), una distonía (por ejemplo, distonía inducida por fármacos, distonía idiopática familiar, distonía idiopática no familiar, tortícolis espasmódica, distonía bucofacial idiopática, tal como discinesia bucofacial, o blefaroespasmos); un temblor esencial; un temblor inducido por fármacos, mioclonos, corea inducida por fármacos, tics inducidos por fármacos; síndrome de piernas inquietas; y síndrome del hombre rígido.
- En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de trastornos neurodegenerativos que afectan al sistema nervioso central incluyen: enfermedad de Alzheimer; una atrofia cerebral circunscrita (por ejemplo, enfermedad de Pick); degeneración senil del cerebro; una degeneración del sistema nervioso debida al alcohol; degeneración de la materia gris (por ejemplo, enfermedad de Alpers); demencia por cuerpos de Lewy, encefalopatía necrotizante subaguda (por ejemplo, enfermedad de Leigh); y degeneración combinada subaguda de la médula espinal. En determinadas realizaciones, el trastorno del SNC es un trastorno caracterizado por demencia. En determinadas realizaciones, la demencia es una demencia cortical (asociada, por ejemplo, con Alzheimer) que surge de un trastorno que afecta a la corteza cerebral. En determinadas realizaciones, la demencia es una demencia subcortical (asociada, por ejemplo, con enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington) resultante de la disfunción en las partes del cerebro que están debajo de la corteza. En determinadas realizaciones, la demencia es un efecto secundario de la administración de fármacos. En realizaciones específicas, la demencia es un efecto secundario de la administración de un agente quimioterapéutico. En realizaciones específicas, la demencia es el resultado de someterse a una derivación cardíaca. En realizaciones específicas, la demencia es el resultado de un trastorno vascular (por ejemplo, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, hipertensión arterial). En realizaciones específicas, la demencia es el resultado de depresión.
- En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de trastornos desmielinizantes que afectan al sistema nervioso central incluyen: esclerosis múltiple; un trastorno de desmielinización aguda diseminada (por ejemplo, neuromielitis óptica (síndrome de Devic) o leucoencefalitis hemorrágica aguda y subaguda (enfermedad de Hurst)); esclerosis difusa; desmielinización central del cuerpo caloso; mielolisis pontina central; mielitis transversa aguda en la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central; mielitis necrotizante subaguda; y esclerosis concéntrica (enfermedad de Baló).
- En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de trastornos episódicos y paroxísticos que afectan al sistema nervioso central incluyen: epilepsia (por ejemplo, epilepsia idiopática (focal) (parcial) relacionada con la localización y síndromes epilépticos con convulsiones de inicio localizado, epilepsia sintomática (focal) (parcial) relacionada con la localización y síndromes epilépticos con convulsiones parciales simples; epilepsia sintomática (focal) (parcial) relacionada con la localización y síndromes epilépticos con convulsiones parciales complejas; un síndrome epiléptico benigno, tal como epilepsia mioclónica en la infancia y convulsiones neonatales (familiares), epilepsia por ausencia infantil (por ejemplo, picnolepsia), epilepsia con convulsiones tonicoclónicas generalizadas (*grand mal*) al despertarse, una epilepsia juvenil, tal como epilepsia de ausencia o epilepsia mioclónica (crisis de ausencia con propulsión del tronco hacia delante o *impulsive petit mal*), un ataque epiléptico inespecífico, tal como convulsión epiléptica atónica, clónica, mioclónica,

tónica o tónico-clónica, epilepsia con ausencias mioclónicas o convulsiones mioclónicas-astáticas, espasmos infantiles, síndrome de Lennox-Gastaut, ataques de Salaam, encefalopatía mioclónica temprana sintomática, síndrome de West, epilepsia parcial continua (epilepsia de Kozhevnikov), convulsiones tonicoclónicas generalizadas; cefaleas (por ejemplo, una migraña, tal como una migraña sin aura (migraña común), una migraña con aura (migraña clásica), estado migrañoso y migraña complicada: síndrome de cefalea en racimo, cefalea vascular, cefalea de tipo tensional, una cefalea crónica postraumática o cefalea inducida por fármacos); un trastorno cerebrovascular episódico o paroxístico (por ejemplo, un ataque isquémico cerebral transitorio o un síndrome relacionado, tal como síndrome arterial vertebrobasilar, síndrome de la arteria carótida (hemisférico), síndrome arterial precerebral múltiple y bilateral, amaurosis fugaz y amnesia global transitoria, un síndrome vascular del cerebro, tal como síndrome de la arteria cerebral media, síndrome de la arteria cerebral anterior, síndrome de la arteria cerebral posterior, un síndrome de accidente cerebrovascular del tronco encefálico (por ejemplo, síndrome de Benedikt, el síndrome de Claude, el síndrome de Foville, el síndrome de Millard-Gubler, el síndrome de Wallenberg o el síndrome de Weber), el síndrome de accidente cerebrovascular cerebeloso, el síndrome lacunar motor puro, el síndrome lacunar sensorial puro o los síndromes lacunares); y un trastorno del sueño (por ejemplo, insomnio, hiperinsomnia, una interrupción en el ritmo circadiano, apnea del sueño, narcolepsia o cataplejía).

En una realización, el trastorno del SNC es un síndrome paralítico del sistema nervioso central. Entre los ejemplos no limitativos de síndromes paralíticos que afectan al sistema nervioso central se incluyen: una parálisis cerebral (por ejemplo, parálisis cerebral cuadripléjica espástica, parálisis cerebral dipléjica espástica, parálisis cerebral hemipléjica espástica, parálisis cerebral discinética o parálisis cerebral atáxica); una hemiplejía (por ejemplo, hemiplejía flácida o hemiplejía espástica); una paraplejía o tetraplejía (por ejemplo, paraplejía flácida, paraplejía espástica, parálisis de ambas extremidades inferiores, paraplejía inferior, tetraplejía flácida, tetraplejía espástica o tetraplejía); diplejía de miembros superiores; monoplejía de una extremidad inferior, monoplejía de una extremidad superior; síndrome de la cola de caballo; y parálisis de Todd (postepiléptico).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de trastornos de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno del nervio trigémino (V; por ejemplo, neuralgia del nervio trigémino); trastornos del nervio facial (VII; por ejemplo, parálisis de Bell, parálisis facial, ganglionitis geniculada, síndrome de Melkersson, síndrome de Melkersson-Rosenthal, un espasmo hemifacial clónico, mioquimia facial); un trastorno del nervio olfativo (I); un trastorno del nervio glossofaríngeo (IX); un trastorno del nervio vago (X); un trastorno del nervio hipogloso (XII); un trastorno de múltiples nervios craneales; y un trastorno de una raíz nerviosa o un plexo que afecta al SNC (por ejemplo, un trastorno del plexo braquial, tal como síndrome de la abertura torácica superior, un trastorno del plexo lumbosacro, una raíz cervical, un trastorno de la raíz torácica, un trastorno de la raíz lumbosacra, una amiotrofia neurálgica, tal como síndrome de Parsonage-Aldren-Turner, o el síndrome de extremidad fantasma con o sin dolor).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno clasificado en otros apartados del sistema nervioso central. Los ejemplos no limitativos de estos trastornos incluyen: hidrocefalia; una encefalopatía tóxica, un quiste cerebral; daño cerebral anóxico; hipertensión intracraneal benigna; síndrome de fatiga crónica; una encefalopatía; compresión del cerebro; edema cerebral; síndrome de Reye; encefalopatía postradiación; traumatismo craneoencefálico; siringomielia; siringobulbia; una mielopatía vascular; compresión de la médula espinal; mielopatía; una fuga de líquido cefalorraquídeo; un trastorno de las meninges (por ejemplo, adherencia meníngea cerebral o espinal); y un trastorno del sistema nervioso tras un procedimiento (por ejemplo, fuga de líquido cefalorraquídeo por punción espinal, una reacción adversa a una punción espinal o lumbar, o hipotensión intracraneal tras derivación ventricular).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno mental orgánico. Los ejemplos no limitativos de trastornos mentales orgánicos que afectan al sistema nervioso central incluyen: demencia (por ejemplo, demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o demencia vascular, tal como demencia por infartos múltiples); síndrome amnésico orgánico no inducido por el alcohol y otras sustancias psicoactivas); delirio no inducido por alcohol y otras sustancias psicoactivas; un trastorno mental debido a daño y disfunción cerebral y a enfermedad física (por ejemplo, alucinosis orgánica, trastorno catatónico orgánico, trastorno delirante orgánico (de tipo esquizofrénico), un trastorno del estado de ánimo orgánico (afectivo), trastorno de ansiedad orgánica, trastorno disociativo orgánico; trastorno de labilidad emocional orgánico (asténico); un trastorno cognitivo leve o síndrome cerebral orgánico); y trastornos de personalidad y conductuales debidos a enfermedad, daño y disfunción cerebral (por ejemplo, trastorno de personalidad orgánico, síndrome postencefalítico o síndrome posconmoción).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas. Los ejemplos no limitativos de trastornos mentales o conductuales provocados por el uso de sustancias psicoactivas que afectan al sistema nervioso central incluyen: intoxicación aguda (por ejemplo, por el consumo de alcohol, opioides, cannabis, benzodiazepinas o cocaína); un síndrome de dependencia (por ejemplo, por adicción al alcohol, los opioides, el cannabis, las benzodiazepinas, la cocaína o nicotina); un síndrome de abstinencia (por ejemplo, un síndrome de abstinencia de alcohol o benzodiazepinas); *delirium tremens*; y un trastorno psicótico (por ejemplo, alucinosis alcohólica o psicosis anfetamínica); un síndrome amnésico (por ejemplo, síndrome de Korsakoff); un trastorno psicótico residual y de inicio tardío (por ejemplo, trastorno de percepción posalucinógena).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno del espectro autista. En determinadas realizaciones, el trastorno del SNC es autismo, síndrome de Asperger, trastorno generalizado del desarrollo no especificado en otros apartados (PDD-NOS), trastorno desintegrativo infantil o síndrome de Rett.

5 En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno esquizofrénico, esquizotípico o delirante. Los ejemplos no limitativos de esquizofrenia, trastornos esquizotípicos y delirantes que afectan al sistema nervioso central incluyen: esquizofrenia (por ejemplo, esquizofrenia paranoide, esquizofrenia hebefrénica (esquizofrenia desorganizada),
 10 esquizofrenia catatónica, esquizofrenia indiferenciada, depresión posesquizofrénica, esquizofrenia residual, esquizofrenia simple, esquizofrenia cenestópata, trastorno esquizofreniforme o psicosis esquizofreniforme); trastorno esquizotípico; un trastorno delirante persistente (por ejemplo, trastorno delirante, dismorfofobia delirante, estado paranoico involutivo o paranoia quejumbrosa); un trastorno psicótico agudo o transitorio (por ejemplo, trastorno psicótico agudo polimorfo sin síntomas de esquizofrenia, trastorno psicótico agudo polimorfo con síntomas de esquizofrenia o trastorno psicótico agudo de tipo esquizofrénico); un trastorno delirante inducido (por ejemplo, trastorno psicótico compartido (*folie à deux*), trastorno paranoide inducido o trastorno psicótico inducido); un trastorno esquizoafectivo (por ejemplo, trastorno esquizoafectivo de tipo maníaco, de tipo depresivo o de tipo mixto); y psicosis alucinatoria crónica.

20 En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno del estado de ánimo (afectivo). Los ejemplos no limitativos de trastornos del estado de ánimo (afectivos) que afectan al sistema nervioso central incluyen: un episodio maníaco (por ejemplo, hipomanía, manía sin síntomas psicóticos o manía con síntomas psicóticos); un trastorno afectivo bipolar (por ejemplo, trastorno afectivo bipolar, trastorno afectivo bipolar hipomaníaco de episodio corriente, trastorno afectivo bipolar maníaco de episodio corriente sin síntomas psicóticos, trastorno afectivo bipolar maníaco de episodio corriente con síntomas psicóticos, trastorno afectivo bipolar con depresión leve o moderada de episodio corriente, trastorno afectivo bipolar con depresión grave de episodio corriente sin síntomas psicóticos, trastorno afectivo bipolar con depresión grave de episodio corriente con síntomas psicóticos, trastorno afectivo bipolar: trastorno afectivo bipolar mixto de episodio corriente, trastorno bipolar II actualmente en remisión, o episodios maníacos recurrentes); un episodio depresivo (por ejemplo, episodio depresivo leve, episodio depresivo moderado, episodio depresivo grave sin síntomas psicóticos, episodio depresivo grave con síntomas psicóticos, depresión atípica o episodios únicos de depresión “enmascarada”); un trastorno depresivo recurrente (por ejemplo, trastorno depresivo recurrente: trastorno depresivo recurrente leve de episodio corriente, trastorno depresivo recurrente moderado de episodio corriente, trastorno depresivo recurrente: trastorno depresivo recurrente grave de episodio corriente sin síntomas psicóticos, trastorno depresivo recurrente grave de episodio corriente con síntomas psicóticos, o trastorno depresivo recurrente actualmente en remisión); un trastorno persistente del estado de ánimo (afectivo) (por ejemplo, ciclotimia o distimia);
 35 episodio afectivo mixto; y breves episodios depresivos recurrentes.

40 En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno neurótico, relacionado con el estrés o somatoforme. Los ejemplos no limitativos de trastornos neuróticos, relacionados con el estrés o somatoformes que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno de ansiedad fóbica (por ejemplo, agorafobia, antropofobia, neurosis social, acrofobia, fobias de animales, claustrofobia o fobia simple); un trastorno de ansiedad clasificado en otros apartados (por ejemplo, trastorno de pánico (ansiedad paroxística episódica) o trastorno de ansiedad generalizada); trastorno obsesivo-compulsivo; un trastorno de adaptación (por ejemplo, reacción de estrés agudo; trastorno de estrés posttraumático o trastorno de adaptación); un trastorno disociativo (conversión) (por ejemplo, amnesia disociativa, fuga disociativa, estupor disociativo; trastorno de trance, trastorno de posesión, trastorno disociativo motor, convulsiones disociativas, anestesia disociativa y pérdida sensorial, trastorno disociativo mixto (conversión), síndrome de Ganser o trastorno de personalidad múltiple); un trastorno somatoforme (por ejemplo, trastorno de Briquet, trastorno psicósomático múltiple, un trastorno hipocondríaco, tal como trastorno dismórfico corporal, dismorfofobia (no delirante), neurosis hipocondríaca, hipocondría y nosofobia, una disfunción autónoma somatoforme, tal como neurosis cardiaca, síndrome de Da Costa, neurosis gástrica y astenia neurocirculatoria, o psicalgia); neurastenia; síndrome de despersonalización-desrealización; síndrome de Dhat, neurosis profesional (por ejemplo, calambre del escribiente);
 50 psicoastenia; neurosis psicoasténica; y síncope psicógeno.

55 En una realización, el trastorno del SNC es un síndrome conductual asociado con trastornos fisiológicos o factores físicos. Los ejemplos no limitativos de síndromes conductuales asociados con trastornos fisiológicos o factores físicos que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno alimentario (por ejemplo, anorexia nerviosa, anorexia nerviosa atípica, bulimia nerviosa, bulimia nerviosa atípica, comer en exceso asociado con otros trastornos psicológicos, vómitos asociados con otros trastornos psicológicos o pica en adultos); un trastorno del sueño no orgánico (por ejemplo, insomnio no orgánico, hipersomnía no orgánica, trastorno no orgánico del horario de sueño-vigilia, noctambulismo (sonambulismo), terrores del sueño (terrores nocturnos) o pesadillas); una disfunción sexual no provocada por una enfermedad o un trastorno orgánico; un trastorno mental o conductual asociado con el puerperio (por ejemplo, depresión posnatal, depresión posparto o psicosis puerperal); y abuso de sustancias que no producen dependencia.

65 En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno de personalidad o conductual de un adulto. Los ejemplos no limitativos de trastornos de personalidad y conductuales de los adultos que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno de personalidad específico (por ejemplo, trastorno de personalidad paranoide, trastorno de

personalidad esquizoide, un trastorno de personalidad disocial, tal como trastorno de personalidad antisocial, un trastorno de personalidad emocionalmente inestable, tal como trastorno límite de personalidad, trastorno de personalidad histriónico, un trastorno de personalidad anancástico, tal como trastorno de personalidad obsesivo-compulsivo, trastorno de personalidad ansioso (evitativo), trastorno de personalidad dependiente, trastorno de personalidad excéntrico, trastorno de personalidad de tipo *haltlose*, trastorno de personalidad inmaduro, trastorno de personalidad narcisista, trastorno de personalidad pasivo-agresivo o trastorno de personalidad psiconeurótico); trastorno de personalidad mixto; un trastorno de hábito o impulso (por ejemplo, juego patológico, prender fuego de manera patológica (piromanía), robo patológico (cleptomanía) o tricotilomanía); y síndrome de Munchausen.

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno del desarrollo psicológico. Los ejemplos no limitativos de trastornos del desarrollo psicológico que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno del desarrollo del habla o el lenguaje (por ejemplo, trastorno específico de la articulación del habla, trastorno de lenguaje expresivo, trastorno de lenguaje receptivo (afasia receptiva), afasia adquirida con epilepsia (trastorno de Landau-Kleffner) o parasigmatismo); un trastorno del desarrollo de habilidades escolares (por ejemplo, un trastorno de lectura específico, tal como dislexia del desarrollo, trastorno de ortografía específico, un trastorno específico de habilidades aritméticas, tal como acalculia del desarrollo y síndrome de Gerstmann, o un trastorno mixto de habilidades escolares); un trastorno del desarrollo de la función motora (por ejemplo, dispraxia del desarrollo); un trastorno del desarrollo específico mixto; y un trastorno generalizado del desarrollo (por ejemplo, autismo infantil, autismo atípico, síndrome de Rett, trastorno hiperactivo asociado con retraso mental y movimientos estereotipados, o síndrome de Asperger).

En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno conductual o emocional con un inicio que se produce generalmente en la infancia y la adolescencia. Los ejemplos no limitativos de trastornos conductuales o emocionales con inicio que se produce generalmente en la infancia y la adolescencia que afectan al sistema nervioso central incluyen: un trastorno hiperactivo (por ejemplo, una alteración de la actividad y la atención, tal como trastorno por déficit de atención con hiperactividad y el síndrome de déficit de atención con hiperactividad, o un trastorno conductual hiperactivo); un trastorno de conducta (por ejemplo, trastorno de conducta limitado al contexto familiar, trastorno de conducta insocializado, trastorno de conducta socializado o trastorno de oposición desafiante); un trastorno mixto de la conducta o emociones (por ejemplo, trastorno de conducta depresivo); un trastorno emocional con inicio específico en la infancia (por ejemplo, trastorno de ansiedad por separación de la infancia, trastorno de ansiedad fóbica de la infancia, trastorno de ansiedad social de la infancia, trastorno de rivalidad entre hermanos, trastorno de identidad o trastorno de ansiedad excesiva); un trastorno del funcionamiento social con inicio específico en la infancia y la adolescencia (por ejemplo, mutismo selectivo, trastorno de apego reactivo de la infancia o trastorno de apego desinhibido de la infancia); un trastorno de tics por ejemplo, trastorno de tics transitorios, trastorno de tics motores o vocales crónicos, o trastorno de tics motores múltiples y vocales combinados (de la Tourette); y un trastorno conductual o emocional clasificado en otros apartados con inicio que se produce generalmente en la infancia y la adolescencia (por ejemplo, enuresis no orgánica, encopresis no orgánica, trastorno alimentario de la lactancia y la infancia, pica de la lactancia y la infancia, trastornos de movimientos estereotipados, habla balbuceante (tartamudeo), agitofasia, trastorno por déficit de atención sin hiperactividad, trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS) o síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS).

En una realización del método para tratar un trastorno del SNC, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de polvo seco que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC incluyen administrar por vía intranasal una composición de polvo seco de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método para tratar un trastorno del SNC, el método incluye la administración intranasal de una composición líquida (por ejemplo, acuosa) que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente al epitelio olfativo del sujeto. En otra realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método de tratamiento de un trastorno del SNC, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno del SNC incluyen administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las

variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente al epitelio olfativo del sujeto.

5

Enfermedad de Alzheimer

La IGIV se ha usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se ha propuesto que IGIV contiene anticuerpos contra β -amiloide. Relkin *et al.* 2009 (Neurobiol. Aging 30(11): 1728-36). En este estudio, se administró IgG humana agrupada por vía intravenosa (terapia con IGIV) a ocho sujetos a los que se les diagnosticó enfermedad de Alzheimer (EA) leve. Los pacientes recibieron terapia con IGIV durante 6 meses, interrumpieron el tratamiento y luego reanudaron el tratamiento durante 9 meses más. Se descubrió que los anticuerpos contra β -amiloide en el suero de pacientes con EA aumentaron en proporción a la dosis de IGIV y los niveles plasmáticos de β -amiloide aumentaron transitoriamente después de cada infusión. Después de 6 meses de tratamiento, se realizaron minipruebas de estado mental en los pacientes. Las puntuaciones de la miniprueba de estado mental aumentaron un promedio de 2,5 puntos después de 6 meses, volvieron al nivel inicial durante el lavado y se mantuvieron estables durante el tratamiento posterior con IGIV.

10

15

20

25

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio de la cavidad nasal del sujeto. En una realización específica, la composición se administra directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal. En una realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

30

35

En una realización del método para tratar la enfermedad de Alzheimer, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de polvo seco que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen administrar por vía intranasal una composición de polvo seco de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente al epitelio olfativo del sujeto. En una realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

40

45

50

En una realización del método para tratar la enfermedad de Alzheimer, el método incluye la administración intranasal de una composición líquida (por ejemplo, acuosa) que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente al epitelio olfativo del sujeto. En otra realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente al epitelio olfativo del sujeto. En una realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

55

60

En una realización del método para tratar la enfermedad de Alzheimer, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente al epitelio olfativo del sujeto. En una realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

Esclerosis múltiple

65

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa e inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) que representa una de las enfermedades autoinmunitarias humanas más prevalentes. La esclerosis múltiple

(EM) es una enfermedad autoinmunitaria que afecta específicamente al cerebro y la médula espinal. La EM está provocada por daños en la vaina de mielina, la cubierta protectora que rodea las células nerviosas. Cuando la vaina de mielina se daña, las señales nerviosas se ralentizan o se detienen. El daño a la vaina de mielina está provocado por la inflamación que se produce cuando las propias células inmunitarias del cuerpo atacan al sistema nervioso. Esto puede producirse a lo largo de cualquier área del cerebro, nervio óptico y la médula espinal.

La EM se clasifica en cuatro subtipos según la progresión de la enfermedad: EM remitente-recurrente (EMRR), EM progresiva secundaria (EMPS), EM progresiva primaria (EMPP) y EM progresiva recurrente (EMPR). Más del 80 por ciento de los pacientes con diagnóstico de EM presentan signos iniciales de EMRR. La EMRR se caracteriza por una recaída (caracterizada por brotes de síntomas) seguida de remisión. Las recaídas pueden ser brotes leves a graves y las remisiones pueden durar días o meses. Los pacientes con EMRR a menudo desarrollan EMPS. La EMPS se caracteriza por recaídas seguidas de recuperaciones sólo parciales. Durante la fase de recuperación parcial, los síntomas pueden disminuir pero no entran en remisión completa. La EMPS es un subtipo progresivo de EM en el que los síntomas empeoran constantemente hasta que una discapacidad crónica reemplaza los ciclos de recuperación y recuperación parcial. La EMPP representa aproximadamente el 15 por ciento de los casos de EM. Se caracteriza por una progresión lenta y constante sin periodos de remisión o recuperación parcial. La EMRR es el subtipo menos habitual de EM. La EMRR se caracteriza por un empeoramiento constante de los síntomas y ataques seguidos de periodos de remisión.

Hay un modelo de ratón transgénico e inducido por péptidos para EM. La encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo animal de inflamación cerebral. La EAE es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC. La EAE aguda y recurrente se caracteriza por la formación de lesiones desmielinizantes inflamatorias focales en la sustancia blanca del cerebro. Este fenotipo se puede inducir en ratones SJL normales mediante la administración del péptido PLP139-151. La EAE progresiva crónica se asocia patológicamente con un daño axonal extendido en la sustancia blanca de aspecto normal y una desmielinización masiva en la sustancia gris, particularmente en la corteza. Este fenotipo se puede inducir en ratones C57BL/6 normales mediante la administración del péptido MOG35-55.

También hay evidencias de que la superfamilia de ligandos/receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), particularmente TNF y Fas/ligando de Fas (FasL) están involucrados en la patogénesis de EM. Akassoglou *et al.* 1998 (Am J Pathol. 153(3): 801-813). Por consiguiente, los modelos de ratón deficientes en TNF pueden usarse para estudiar las patologías de la EM. El genotipo de los modelos de ratones transgénicos deficientes en TNF incluyen p55TNFR (p55^{-/-}), p75TNFR (p75^{-/-}) y TNF (TNF^{-/-}).

La IGIV ha demostrado ser útil en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias; Sin embargo, su papel en el tratamiento de la EM sigue siendo incierto. Los ensayos de IGIV en diferentes tipos de pacientes con EM han producido resultados variables que van desde informes de que IGIV mensual es beneficiosa hasta que la administración de IGIV que no ralentiza la progresión de la enfermedad ni revierte los déficits inducidos por la enfermedad.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar la esclerosis múltiple en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio de la cavidad nasal del sujeto. En una realización específica, la composición se administra directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal.

En una realización del método para tratar la esclerosis múltiple, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de polvo seco que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen administrar por vía intranasal una composición de polvo seco de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método para tratar la esclerosis múltiple, el método incluye administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente al epitelio olfativo del sujeto. En otra realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método para tratar la esclerosis múltiple, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente al epitelio olfativo del sujeto.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del SNC. La EP está vinculada en particular con una disminución del control motor. La pérdida del control motor provocada por la EP resulta de la muerte de células generadoras de dopamina en la sustancia negra, una región del mesencéfalo. De manera temprana en la progresión de la enfermedad, los síntomas más habituales incluyen temblores, rigidez, lentitud de movimiento y dificultad para caminar y en la marcha. A medida que la enfermedad progresa, surgen problemas cognitivos y conductuales, con demencia que se produce en los estadios avanzados de la enfermedad. Los síntomas adicionales incluyen problemas sensoriales, del sueño y emocionales. La EP es más habitual en los ancianos, y los síntomas se producen con la mayor frecuencia después de los 50 años.

Existen numerosos modelos de ratones transgénicos para la EP. Estos modelos incluyen, por ejemplo, cepas transgénicas Park2 (parkin), cepas transgénicas LRRK2 y cepas transgénicas de sinucleína (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Además de los modelos transgénicos, los síntomas parkinsonianos también pueden inducirse en ratones mediante la administración de los compuestos MPTP, rotenona, paraquat o maneb.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar la enfermedad de Parkinson en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en el que administrar la composición al cerebro del paciente comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio de la cavidad nasal del sujeto. En una realización específica, la composición se administra directamente al epitelio olfativo de la cavidad nasal.

En una realización del método para tratar la enfermedad de Parkinson, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de polvo seco que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson incluyen administrar por vía intranasal una composición de polvo seco de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de polvo seco directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método para tratar la enfermedad de Parkinson, el método incluye administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson incluyen administrar por vía intranasal una composición líquida (por ejemplo, acuosa) de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición gota a gota directamente al epitelio olfativo del sujeto. En otra realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición mediante una pulverización directamente al epitelio olfativo del sujeto.

En una realización del método para tratar la enfermedad de Parkinson, el método incluye administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada que contiene desde 0,05 mg/kg hasta 50 mg/kg de inmunoglobulina humana agrupada a un sujeto que lo necesita diariamente. En otras realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson incluyen administrar por vía intranasal una composición de gel, crema o pomada de IgG humana agrupada en una combinación de dosificación/frecuencia seleccionada de las variaciones 1 a 816 que se encuentran en la tabla 1 y la tabla 2. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente a un epitelio nasal del sujeto. En una realización particular, el método comprende administrar la composición de gel, crema o pomada directamente al epitelio olfativo del sujeto.

Realizaciones específicas

- 5 En un primer aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, el método comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada al cerebro del sujeto, en la que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio nasal del sujeto.
- 10 En una realización del primer aspecto, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
- 15 En una realización del primer aspecto, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
- 20 En una realización del primer aspecto, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
- 25 En una realización del primer aspecto, el epitelio nasal es el epitelio olfativo del sujeto.
- 30 En una realización del primer aspecto, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio olfativo del sujeto.
- 35 En una realización del primer aspecto, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio olfativo del sujeto.
- 40 En una realización del primer aspecto, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio olfativo del sujeto.
- 45 En una realización del primer aspecto, el epitelio nasal es un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.
- 50 En una realización del primer aspecto, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.
- 55 En una realización del primer aspecto, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.
- 60 En una realización del primer aspecto, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.
- 65 En una realización del primer aspecto, administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.
- En una realización del primer aspecto, al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.
- En una realización del primer aspecto, al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.
- En una realización del primer aspecto, al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central. En una realización específica, el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Alzheimer. En una realización específica, el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Parkinson.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es una atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central. En una realización específica, la atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central es esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En una realización específica, la atrofia sistémica que afecta principalmente al sistema nervioso central es enfermedad de Huntington.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno extrapiramidal y de movimiento.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central. En una realización específica, el trastorno desmielinizante del sistema nervioso central es esclerosis múltiple.

- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno episódico o paroxístico del sistema nervioso central.
- 5 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un síndrome paralítico del sistema nervioso central. En una realización específica, el trastorno del SNC es un síndrome paralítico del sistema nervioso central es parálisis cerebral.
- 10 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno de un nervio, una raíz nerviosa o un plexo del sistema nervioso central.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno mental orgánico.
- 15 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno mental o conductual provocado por el uso de sustancias psicoactivas.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno esquizofrénico, esquizotípico o delirante. En una realización específica, el trastorno esquizofrénico, esquizotípico o delirante es esquizofrenia.
- 20 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno del estado de ánimo (afectivo). En una realización específica, el trastorno del estado de ánimo (afectivo) es trastorno bipolar.
- 25 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno neurótico, relacionado con el estrés o somatoforme.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un síndrome conductual.
- 30 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno de personalidad o conductual de un adulto.
- 35 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno del desarrollo psicológico.
- En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el trastorno del SNC es un trastorno conductual o emocional de inicio infantil. En una realización específica, el trastorno conductual o emocional de inicio infantil es síndrome neuropsiquiátrico de inicio agudo pediátrico (PANS). En otra realización específica, el trastorno conductual o emocional de inicio infantil son trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunitarios asociados con infecciones estreptocócicas (PANDAS).
- 40 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la administración intranasal de la composición comprende el uso de un dispositivo de administración intranasal no invasivo.
- 45 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la administración intranasal de la composición comprende la administración de una gota de líquido de la composición directamente sobre el epitelio nasal.
- 50 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la administración intranasal de la composición comprende la administración dirigida de un aerosol de la composición al epitelio nasal. En una realización específica, el aerosol de la composición es un aerosol de líquido. En una realización específica, el aerosol de la composición es un aerosol de polvo.
- 55 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la composición que comprende IgG humana agrupada no contiene un potenciador de la permeabilidad.
- 60 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la composición que comprende IgG humana agrupada consiste esencialmente en IgG humana agrupada y un aminoácido. En una realización específica, el aminoácido es glicina. En otra realización específica, el aminoácido es histidina. En otra realización específica, el aminoácido es prolina.
- 65 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la composición que comprende IgG humana agrupada es una composición acuosa. En una realización, la composición comprende: IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y glicina desde 50 mM hasta 500 mM. En una realización específica, el pH de la

composición es de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización específica, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización específica, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.

5 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la composición que comprende IgG humana agrupada es una composición de polvo seco. En una realización, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que comprende: IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y glicina desde 50 mM hasta 500 mM. En una realización específica, la composición de polvo seco se prepara a partir de una disolución acuosa que tiene un pH de desde 4,0 hasta 7,5. En otra realización específica, el pH de la composición es de desde 4,0 hasta 6,0. En otra realización específica, el pH de la composición es de desde 6,0 hasta 7,5.

10 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,08 mg hasta 100 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

15 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,2 mg hasta 40 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

20 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,5 mg hasta 20 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

25 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,5 mg hasta 10 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

30 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 1 mg hasta 5 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 50 mg hasta 10 g de IgG humana agrupada.

35 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 100 mg hasta 5 g de IgG humana agrupada.

En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 500 mg hasta 2,5 g de IgG humana agrupada.

40 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al mes.

45 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez a la semana.

En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces a la semana.

50 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos una vez al día.

En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de IgG humana agrupada al menos dos veces al día.

55 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, la composición que comprende IgG humana agrupada comprende al menos el 0,1% de IgG anti- β amiloide.

60 En una realización de cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método incluye administrar una segunda terapia para el trastorno del SNC al sujeto que lo necesita. En una realización, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor de la colinesterasa. En una realización específica, el inhibidor de la colinesterasa es donepezilo. En otra realización específica, el inhibidor de la colinesterasa es rivastigmina. En otra realización específica, el inhibidor de la colinesterasa es galantamina. En otra realización específica, el inhibidor de la colinesterasa es tacrina. En otra realización, la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA. En una realización específica, el inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA es memantina.

65

Ejemplos

Ejemplo 1 - Tolerabilidad de la administración intranasal de IgG en ratas

5 Se realizó un estudio para examinar la tolerabilidad de la administración intranasal de IgG en ratas. El propósito de este estudio fue determinar la tolerabilidad de las ratas a la administración intranasal de IgG a diversas concentraciones y preparaciones.

10 *Diseño experimental:* Se preparó la IgG como una disolución de proteína líquida o como una preparación de microesferas. Se preparó la disolución de *proteína de IgG* líquida en glicina a 200 mg/ml y 100 mg/ml y tenía un pH de 5,1 a 5,3. La preparación de microesferas de IgG se preparó a 200 mg/ml y 150 mg/ml en PEG. Las preparaciones de IgG se administraron a 8 ratas Sprague Dawley macho anestesiadas.

15 Antes de la anestesia, se pesó cada rata. Se preparó un cóctel de anestesia y se calcularon las dosis de anestesia completa, a la mitad y de cuarta parte según el peso del animal conteniendo una dosis completa ketamina 30 mg/kg, xilazina 6 mg/kg y acepromazina 1 mg/kg. Se administró la anestesia por vía subcutánea en la pata trasera izquierda, por encima del muslo. Se monitorizó la anestesia en la totalidad de los procedimientos mediante la evaluación de los reflejos usando pellizcos de la pata trasera o la cola. Si estaba presente un reflejo, se administró un refuerzo de dosis a la mitad o de cuarta parte según fuera necesario. Durante la administración del fármaco, los animales recibieron un refuerzo de dosis a la mitad aproximadamente 20-25 min después de la dosis inicial si fuera necesario.

20 Se colocaron ratas anestesiadas sobre sus dorsos sobre una almohadilla térmica en una bandeja quirúrgica de metal. La almohadilla térmica se conectó a un termostato y se reguló automáticamente para mantener una temperatura de 37°C basándose en la medición continua desde una sonda rectal. Se colocó una almohadilla de gasa de 2" x 2" firmemente en una almohada, se pegó con cinta adhesiva y debajo del cuello para mantener una posición correcta del cuello de manera horizontal con el mostrador.

30 Se cargó una gota de 6 µl en una pipeta y se secó con una toallita de papel. Se usó un hisopo de algodón cubierto con Parafilm para ocluir una narina por completo (la parte plana del hisopo se empujó suavemente contra la narina para impedir el flujo de aire), mientras que la gota de 6 µl se expulsó lentamente de la pipeta (mantenida en un ángulo de 45° con respecto a la línea media de la rata), formándose una gota en la punta de pipeta. La gota se dejó caer sobre la narina abierta para que se inhalara. Las preparaciones de IgG se administraron por vía intranasal tal como se describe en la tabla 3.

35 Tabla 3. Administración intranasal de IgG a 8 ratas para someter a prueba la tolerabilidad intranasal.

Rata	Peso (g)	Fármaco/Dosis	N.º de gotas administradas	Tiempo para la perfusión
1	259,87	Disolución de proteína líquida - 200 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	23 min
2	272,61	Microesfera - 50 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
3	309,14	Disolución de proteína líquida - 200 mg/ml	8 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
4	309,00	Disolución de proteína líquida - 100 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
5	342,62	Microesfera - 200 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
6	355,1	Microesfera - 150 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
7	364,28	Microesfera - 200 mg/ml	10 a 6 µl/gota (60 µl en total)	60 min
8	348,93	Microesfera - 150 mg/ml	28 a 6 µl/gota (162 µl en total)	60 min

40 *Resultados:* Tres ratas recibieron la preparación líquida de IgG intranasal. Una rata recibió 60 µl a 100 mg/ml y se toleró bien. Dos ratas recibieron 60 µl a 200 mg/ml. La primera rata tuvo dificultad para respirar, probablemente debido a un problema con la anestesia ligera. La segunda rata tuvo algunas dificultades para respirar, pero sobrevivió. No fueron necesarias traqueotomías.

Cuatro ratas recibieron la preparación de microesferas. Dos ratas recibieron 60 µl a 150 mg/ml. Una rata recibió 60 µl a 200 mg/ml. Una rata recibió 162 µl a 150 mg/ml. Estas ratas toleraron muy bien la mayor concentración disponible a 200 mg/ml.

- 5 Las ratas toleraron las preparaciones líquidas y de microesferas; sin embargo, las ratas toleraron mejor la preparación de microesferas que la preparación de proteína.

Ejemplo 2 - Comparación de la biodistribución de líquidos, microesferas y fragmentos a los 30 y 90 minutos

- 10 El propósito de este estudio fue cuantificar la cantidad de IgG administrada por vía intranasal que alcanza el sistema nervioso central y los tejidos periféricos en ratas anestesiadas. Específicamente, se comparó la biodistribución de diferentes formulaciones y modos de administración. Las diferentes formulaciones y modos de administración se describen en la tabla 4.

- 15 Tabla 4. Formulaciones y modos de administración usados en el estudio de biodistribución.

Formulación de IgG radiomarcada con ¹²⁵ I	Modo de administración
Formulación de proteína líquida	Intranasal (biodistribución medida a los 30 min tras de la administración)
Formulación de proteína líquida	Biodistribución intravenosa medida a los 30 min tras de la administración)
Formulación de proteína líquida	Intranasal (biodistribución medida a los 90 minutos tras la administración)
Formulación de microesferas	Intranasal (biodistribución medida a los 30 min tras la administración)
Formulación de microesferas	Intranasal (biodistribución medida a los 90 minutos tras la administración)
Formulación de microesferas (bajo µCi)	Intranasal (biodistribución medida a los 30 min tras la administración)
Fragmento de anticuerpo (FAb)	Intranasal (biodistribución medida a los 30 min tras la administración)

- 20 *Diseño experimental:* 40 ratas Sprague-Dawley macho recibieron una de las tres preparaciones de IgG marcada con ¹²⁵I. Estas incluyeron una disolución de proteína de IgG líquida en glicina a pH 5,1-5,3, IgG en una preparación de microesferas que incluía PEG, o como *fragmentos de anticuerpo* Fab en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La administración del fármaco fue intranasal o intravenosa. Las ratas se sacrificaron 30 ó 90 minutos después del inicio de la administración de las preparaciones de IgG para estudios de biodistribución.

- 25 Para la administración intranasal, se anestesiaron las ratas y se colocaron sobre sus dorsos sobre una almohadilla térmica en una bandeja quirúrgica de metal. La almohadilla térmica se conectó a un termostato y se reguló automáticamente para mantener una temperatura de 37°C basándose en la medición continua desde una sonda rectal. Se colocó una almohadilla de gasa de 2" x 2" firmemente en una almohada, se pegó con cinta adhesiva y debajo del cuello para mantener una posición correcta del cuello de manera horizontal con el mostrador. Se colocó un blindaje impregnado de plomo entre la bandeja quirúrgica y el investigador para la protección contra la radiación. La disolución de dosificación, la pipeta, las puntas de pipeta y el recipiente de desechos se colocaron detrás del blindaje para facilitar el acceso.

- 30 Se cargó una gota de 6 µl en la pipeta detrás del blindaje y se secó con una toallita de papel. Se usó un hisopo de algodón cubierto con Parafilm para ocluir una narina por completo (la parte plana del hisopo se empujó suavemente contra la narina para impedir el flujo de aire), mientras que la gota de 6 µl se expulsó lentamente de la pipeta (mantenida en un ángulo de 45° con respecto a la línea media de la rata), formándose una gota en la punta de pipeta. La gota se dejó caer sobre la narina abierta para que se inhalase. Después de dos minutos, se ocluyó la narina alterna y se administró una gota de 6 µl de la misma manera. Se administró una gota tal como se describió anteriormente cada dos minutos a narinas alternas hasta que se administró un total de 8 gotas (4 a cada narina) a lo largo de 14 min. Se anotó el tiempo de administración de cada gota, así como cualquier detalle relacionado con la respiración del animal o el éxito de la administración. Se contaron en contador gamma tres alícuotas de 3 µl de cada disolución de dosificación para determinar la actividad específica medida.

- 35 Para la administración intravenosa de IgG, las ratas requirieron la canulación de la arteria femoral. Los animales anestesiados se colocaron sobre su lomo en una bandeja quirúrgica sobre una almohadilla térmica mantenida a 37°C. Ambas patas traseras se aseguraron atando sin apretar una sutura alrededor de las extremidades y pesándolas con

una pinza hemostática. Se realizaron pequeños cortes superficiales con tijeras romas en el punto inguinal medio, asegurándose de no cortar los vasos sanguíneos superficiales. La disección suave y roma con hisopos de algodón dejó al descubierto la vena femoral desde la vena safena interna hasta el ligamento inguinal. Se usaron tijeras romas para cortar la piel y obtener una mejor visión del área. El músculo suprayacente se retrajo introduciendo una sutura 4-0 con una aguja curva a través del músculo, uniendo una pinza hemostática curva al extremo de la sutura y poniéndola en su lugar. El tejido conjuntivo que rodea la vena femoral y la arteria se retiró cuidadosamente con disección roma (hisopos de algodón). El tejido conjuntivo entre la vena y la arteria se separó usando dos pares de pinzas con cuidado usando un movimiento que discurre en paralelo a los vasos sanguíneos y teniendo cuidado de no romperlos. Se aplicó solución salina si el área estaba seca.

En un área libre de ramas, se insertaron pinzas anguladas bajo la vena, la punta atravesó el tejido conjuntivo y las pinzas se abrieron lentamente para tirar de una sutura 4-0 de 12 pulgadas a su través con mucho cuidado. Si la vena colapsó, se usó un hisopo de algodón para bombear suavemente la vena llena de sangre. Se tiró de una segunda sutura a su través de manera similar. Las suturas media y lateral se ataron en nudos sueltos. Se usó un hisopo de algodón para bombear la vena llena de sangre. La sutura lateral (más cercana a la rodilla) se ató en un nudo apretado. Se unió una pinza hemostática a los hilos de sutura de la sutura media y se añadió cierta tensión para ocluir el flujo sanguíneo.

Se realizó una incisión transversal de 1 mm en la vena femoral y se insertó inmediatamente una aguja de palomilla de 25 G roma conectada a un tubo flexible llenado previamente con NaCl al 0,9% y se unió a una llave de paso de 3 vías. La sutura media se ató alrededor de la aguja para asegurarla en su lugar. Para confirmar la colocación dentro de la vena, se extrajo una pequeña cantidad de sangre y luego se empujó solución salina. Se ataron hilos de sutura libres a la aguja de palomilla que aseguraba la cánula en su lugar. Se prolongaron los músculos, se retiraron las suturas que aseguraban las extremidades y se cubrió el área quirúrgica con una gasa húmeda con solución salina.

Para la infusión intravenosa de ^{125}I -IgG, se colocó una bomba de jeringa en la campana extractora detrás del blindaje de plomo. Partes de la bomba se cubrieron con Parafilm (o envoltura de Saran) para impedir la contaminación con radiación. La bomba se ajustó a 4,75 mm de diámetro y una velocidad de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. La disolución de dosificación (48 μl) se mezcló con 452 μl de solución salina (NaCl al 0,9%, volumen total de 500 μl) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Una jeringa de 1 cc llena de solución salina se unió a la llave de paso de 3 vías unida a la aguja de palomilla y se colocó en la bomba. Se usó un trozo de Parafilm para asegurar la jeringa de solución salina a la llave de paso. Con la llave de paso cerrada para la rata, la bomba comenzó a llenar la llave de paso con solución salina.

Se usó una jeringa de 1 cc unida a una aguja de 27 G o 30 G para recoger el fármaco del tubo de microcentrífuga y luego se conectó la jeringa a la llave de paso de 3 vías. La llave de paso se giró para que el flujo estuviera abierto entre la disolución de dosificación y la rata. El tubo flexible se llenó con disolución de dosificación asegurándose de que no se introdujeran burbujas de aire en la rata y que el líquido no se acumulara cerca de la vena femoral (esto indicaría que la aguja no estaba en la vena). La llave de paso se giró para que el flujo quedara abierto a la jeringa de solución salina y a las ratas.

Se anotó el tiempo y el volumen de inicio de la jeringa con solución salina y se inició la bomba. El volumen de parada de la jeringa salina también se anotó al final de la infusión de 14 min. Se infundieron al menos 700 μl de solución salina (50 $\mu\text{l}/\text{min}$ a lo largo de 14 min). El volumen de solución salina administrada fue ligeramente mayor que el volumen del tubo flexible, lo que aseguró que se administrara toda la disolución de dosificación.

Dos minutos antes del tiempo de punto final deseado, los animales anestesiados se acostaron sobre su lomo en una bandeja quirúrgica de metal. Se retiraron la almohadilla térmica, la sonda rectal y la almohada para el cuello. Se usó cinta para asegurar las extremidades delanteras a la bandeja. La parte posterior de la bandeja se elevó ligeramente para permitir que se escapara sangre del animal. El esternón quedó al descubierto al cortar a través de la piel. El esternón se sujetó con una pinza hemostática y la caja torácica se abrió lateralmente, dejando al descubierto el diafragma. El diafragma se cortó lateralmente para dejar al descubierto la cavidad pleural.

Se usaron tijeras quirúrgicas para cortar los laterales de la caja torácica hacia las axilas del animal, creando una incisión en forma de 'V' que deja al descubierto el corazón. La pinza hemostática que sostenía el esternón se pegó con cinta adhesiva sobre la cabeza para mantener abierta la cavidad. El corazón se estabilizó usando las pinzas romas mientras se realizaba un pequeño corte en el ventrículo izquierdo. Se insertó una jeringa de 1 cc con una aguja roma de 1", 18 G, en el ventrículo izquierdo y se extrajeron aproximadamente 0,1 ml de sangre y se colocaron en un tubo pesado previamente para el recuento en contador gamma. Se insertó una segunda aguja roma de 18 G unida a un conjunto de extensión lleno de 60 cc de solución salina, a través del ventrículo izquierdo y al interior de la aorta. Se colocó una pinza Bulldog grande justo por encima del corazón en la aorta, asegurando la aguja roma en su lugar.

Se perfundió el animal con 60 ml de solución salina seguido de 360 ml de paraformaldehído usando una bomba de jeringa a una velocidad de 15 ml/min.

En la totalidad de los procedimientos experimentales, se siguieron precauciones estrictas para impedir la contaminación radiactiva de los tejidos animales, herramientas quirúrgicas y equipos. Se colocaron contadores Geiger

- 5 en cada estación de trabajo para evaluar de manera continua las herramientas de protección, el espacio de trabajo y el personal. En todo momento se usaron equipos de protección personal que incluyeron guantes de doble capa, batas de laboratorio, protección para los ojos, máscaras y cubrecabezas. Se usaron blindajes impregnados de plomo para minimizar la exposición a la radiación. El personal también usó placas de monitorización radiactiva durante la totalidad de los procedimientos experimentales para cuantificar la exposición.
- Inmediatamente después de la recogida, cada muestra de tejido se colocó en un tubo gamma marcado previamente y pesado previamente para su posterior medición.
- 10 Para la disección cerebral, se cortaron la piel y los músculos alrededor del cuello con un bisturí justo por encima de los omóplatos y se usaron unas tijeras grandes para decapitar al animal, cortando de manera dorsal a ventral para evitar la contaminación de la tráquea y el esófago. Para dejar al descubierto el cerebro, se realizó una incisión en la línea media en el lado dorsal del cráneo, luego se desprendió la piel y se usó una pinza hemostática recta para romper el hueso, con cuidado de dejar unida la duramadre dorsal. Se recogió duramadre dorsal.
- 15 Para extraer el cerebro del cráneo, se invirtió la cabeza y se usó una pequeña espátula para liberarlo de la cavidad. El nervio óptico posterior y los nervios trigéminos se cortaron cerca del cerebro. Luego se colocó el cerebro en una placa de Petri limpia para su disección.
- 20 Desde la base del cráneo, se recogió la duramadre ventral raspando unas pinzas en las paredes del cráneo ventral. Se recogieron los nervios de la hipófisis, el quiasma óptico y trigémino. La parte anterior del nervio trigémino consistía en la parte anterior a la rama visible en el cráneo, mientras que el resto que contenía el ganglio trigémino se consideraba como la sección posterior. Luego se apartó la cabeza y se cubrió con una toallita Kim-Wipe para su posterior disección.
- 25 Se usó un microscopio para ayudar a retirar los vasos del cerebro. Usando pinzas quirúrgicas, microtijeras y una aguja de 30 G, se extrajeron la arteria basilar y el círculo de Willis y se colocaron sobre papel pesado previamente (se usó papel debido al pequeño peso de este tejido). La aguja se usó para levantar los vasos del cerebro, las pinzas para sujetarlos y las microtijeras para realizar los cortes. Este tejido se pesó inmediatamente después de la recogida y luego se arrugó todo el papel y se colocó en el fondo del tubo).
- 30 Antes de colocar el cerebro en la matriz coronal, se cortaron los bulbos olfativos en el ángulo natural con una cuchilla de afeitar. En la matriz cerebral coronal, se insertó una cuchilla de afeitar en el centro de donde estaba el quiasma óptico antes de la extracción para normalizar cada animal en la misma ubicación (bregma). Se colocaron cuchillas adicionales cada 2 mm desde la primera cuchilla, lo que dio como resultado rodajas de 6 x 2 mm, 3 rostrales con respecto al quiasma óptico y 3 caudales.
- 35 Se retiraron las cuchillas y se disecaron los tejidos de cada corte (figuras 1A-1F). La sección restante de la corteza y el hipocampo se diseccionó del tejido cerebral restante en la matriz y se colocó en tubos respectivos. Se recogió la médula espinal cervical superior. El cerebro restante se bisecó entonces a lo largo de la línea media y se diseccionó en el mesencéfalo, la protuberancia, la médula y el cerebelo según la figura 1G.
- 40 Volviendo a la cabeza, el lado ventral del cuello se cortó anteriormente y se desprendió la piel dejando al descubierto los ganglios linfáticos, las glándulas salivales y los músculos del cuello. Los ganglios superficiales, los ganglios cervicales profundos, las arterias carótidas y la tiroides se disecaron y despejaron de tejido conjuntivo. Se usó una cuchilla de afeitar para bisecar el cráneo a lo largo de la línea media. Se recogieron el epitelio olfativo y el epitelio respiratorio.
- 45 Para la disección de los cadáveres, se colocaron los cadáveres sobre su lomo y se usó un corte longitudinal usando un bisturí para abrir la cavidad peritoneal hasta la vejiga. Se recogieron muestras cuadradas de 3 mm de hígado (lóbulo derecho superficial), riñón (izquierdo, punta), arteria renal, bazo (punta), pulmón (derecho, lóbulo superior) y corazón. Se recogieron aproximadamente 0,1-0,2 ml de orina.
- 50 Se les dio la vuelta a los cadáveres sobre el estómago y se realizó una incisión superficial a lo largo del animal desde los hombros hasta las caderas, siguiendo la columna vertebral. Se desprendió la piel del tejido subyacente en ambos lados para dejar al descubierto los omóplatos. Se disecaron los ganglios axilares en las axilas y se despejaron de tejido conjuntivo. Se recogió un pedazo de músculo deltoides derecho (~3 mm²).
- 55 Se ranuraron los músculos suprayacentes a la columna con un bisturí. Para dejar al descubierto la médula espinal, se insertó una pequeña pinza hemostática en la columna vertebral y se usó para retirar las vértebras y los tejidos suprayacentes. Se usó una pequeña espátula para aflojar la médula de la cavidad vertebral y se usaron pinzas para extraerla y colocarla en una placa de Petri. La duramadre se desprendió de la médula con unas pinzas. La médula se disecó en las partes cervical inferior, torácica y lumbar. Se descartaron los ~2 mm superiores del segmento cervical inferior.
- 60 Se diseccionó un segmento de 2 cm de tráquea y esófago del cadáver y se extrajeron los tejidos conjuntivos. Se
- 65

descartaron los 0,5 cm superiores (más cercanos al punto de decapitación) de cada uno.

Los tubos gamma pesados previamente que contenían muestras se volvieron a pesar para determinar el peso del tejido. Las muestras de tejido de las ratas se contaron usando un contador COBRA II Auto-Gamma usando un protocolo con ¹²⁵I convencional y un tiempo de recuento de 5 min. Los contadores se normalizaron semanalmente para garantizar una eficiencia de recuento igual al o mayor del 80%. Se restaron los recuentos de fondo.

Se calculó el error medio y estándar de la concentración nM de cada muestra de tejido. Cualquier valor fuera de dos desviaciones estándar de la media para cada tejido se consideró un valor aberrante y se eliminó del conjunto de datos. Se calcularon concentraciones de IgG nM para cada tejido usando la actividad específica medida de las disoluciones de dosificación, las CPM de cada tejido y el volumen de cada tejido (suponiendo 1 g = 1 ml).

Resultados, distribución de preparación de líquido IgG intranasal en el punto final de 30 min. Ocho ratas recibieron preparación líquida de IgG I.N. en una dosis promedio de 6,0 mg en 47,4 µl que contenían 69,6 µCi con un punto final de 30 min. Los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 30 min.

En el sitio de administración de fármacos I.N., las concentraciones promedio de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron de 136.213 nM y 442 nM, respectivamente. Se observó un gradiente rostro-caudal de IgG 13,1 nM a 6,0 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de IgG 4,1 nM a 1,5 nM. La concentración en corteza promedio de IgG después de administración I.N. fue de 1,3 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 0,7 nM en el cuerpo estriado hasta un máximo de 1,7 nM en el hipotálamo. Se descubrió que el hipocampo contenía IgG 0,6 nM. Se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 1,6 nM a 0,7 nM) dentro del material cerebral extra muestreado. De manera similar, se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 1,2 nM a 0,3 nM) en la médula espinal. La concentración promedio de IgG en la duramadre del cerebro fue de 15,2 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 2,8 nM. La duramadre probablemente también contiene parte o la mayor parte de la membrana aracnoidea y juntas comprenden dos de los tres componentes de las meninges. Otros tejidos muestreados de la cavidad del cráneo ventral (hipófisis y quiasma óptico) contenían IgG 8,2 nM y 7,4 nM, respectivamente.

La concentración en sangre de IgG en el punto final de 30 min fue de 13,9 nM. Las concentraciones de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 1,3 nM en el corazón hasta un máximo de 6,1 nM en el bazo y el riñón, conteniendo la orina 8,1 nM. Las concentraciones de IgG en las arterias basilar y carótida fueron considerablemente mayores que en la arteria renal (11,7 y 14,1 nM frente a 4,4 nM). La concentración promedio de IgG en los ganglios linfáticos muestreados fue de 4,7 nM. Los niveles de IgG en los tejidos medidos para evaluar la variabilidad de la administración I.N. y la dificultad para respirar (pulmón, esófago y tráquea) concordaron en todos los animales.

Resultados, distribución de preparación de microesferas de IgG intranasal (baja µCi) en el punto final de 30 min. Cuatro ratas recibieron preparación de microesferas de IgG I.N. (µCi baja) a una dosis promedio de 7,2 mg en 48,0 µl que contenían 24,7 µCi con un punto final de 30 min. Los datos sin procesar de las cuatro ratas se proporcionan en la tabla 5. La actividad específica medida de esta disolución de dosificación fue mucho menor de lo esperado en función de la actividad específica proporcionada. Los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 30 min. Se identificaron cero valores aberrantes estadísticamente significativos y catorce valores aberrantes no estadísticamente significativos de un total de 211 valores de concentración.

Tabla 5. Biodistribución (concentraciones nM) de preparaciones de microesferas de IgG administradas por vía intranasal (con baja uCi) en el punto final de 30 min con valores aberrantes incluidos.

	BAX-17	BAX-18	BAX-19	BAX-20	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	± 0,00
uCi administrado	20,9	20,9	28,6	28,6	24,7	± 2,2
mg administrados	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	± 0,00
Epitelio olfativo	6.806,0	3.931,1	15.573,6	203,9	6.628,6	± 3.273,6
Epitelio respiratorio	559.241,5	268.256,5	219.595,4	25.412,0	268.126,3	± 110.307,7
Nervio trigémino anterior	9,7	28,6	11,4	4,6	13,6	± 5,2
Nervio trigémino posterior	5,4	14,5	6,3	4,1	7,6	± 2,4
Bulbos olfativos	5,9	3,4	3,7	4,1	4,3	± 0,6
Núcleo olfativo anterior	1,9	2,4	2,1	1,4	1,9	± 0,2

ES 2 759 226 T3

Corteza frontal	1,2	1,6	2,0	1,4	1,6	$\pm 0,2$
Corteza parietal	0,8	1,2	1,1	0,5	0,9	$\pm 0,2$
Corteza temporal	0,9	*	1,2	0,6	0,9	$\pm 0,2$
Corteza occipital	0,0	1,3	0,4	1,6	0,8	$\pm 0,4$
Corteza extra	1,6	1,4	1,1	0,9	1,3	$\pm 0,2$
Cuerpo amigdalino	1,6	5,1	1,9	0,7	2,3	$\pm 0,9$
Cuerpo estriado	0,8	16,5	0,6	0,6	4,6	$\pm 4,0$
Núcleo septal	1,8	4,2	0,6	0,3	1,7	$\pm 0,9$
Hipotálamo	1,8	3,9	2,5	1,1	2,3	$\pm 0,6$
Tálamo	0,3	0,9	0,6	0,4	0,5	$\pm 0,1$
Mesencéfalo	0,8	1,6	0,7	0,6	0,9	$\pm 0,2$
Hipocampo	0,6	1,3	0,7	0,4	0,7	$\pm 0,2$
Protuberancia	0,6	1,9	1,2	0,8	1,1	$\pm 0,3$
Médula	0,7	1,2	1,1	0,8	1,0	$\pm 0,1$
Cerebelo	0,6	1,2	0,8	0,6	0,8	$\pm 0,2$
Corte extra n.º 1	1,3	2,6	2,4	1,5	2,0	$\pm 0,3$
Corte extra n.º 2	1,0	1,1	1,2	1,1	1,1	$\pm 0,05$
Corte extra n.º 3	0,7	1,1	1,0	0,7	0,9	$\pm 0,1$
Corte extra n.º 4	0,7	1,2	0,8	0,6	0,8	$\pm 0,1$
Corte extra n.º 5	0,6	1,0	0,8	0,5	0,7	$\pm 0,1$
Corte extra n.º 6	0,7	1,3	1,0	0,6	0,9	$\pm 0,2$
Hipófisis	7,0	18,1	6,2	3,6	8,7	$\pm 3,2$
Quiasma óptico	14,9	19,0	8,2	8,1	12,5	$\pm 2,7$
Duramadre dorsal	12,0	20,7	15,1	20,6	17,1	$\pm 2,1$
Duramadre ventral	18,5	56,5	16,2	15,2	26,6	$\pm 10,0$
Duramadre espinal	2,9	1,0	1,7	3,6	2,3	$\pm 0,6$
Médula espinal cervical superior	1,0	1,2	1,0	1,5	1,2	$\pm 0,1$
Médula espinal cervical inferior	0,4	0,3	0,4	0,9	0,5	$\pm 0,1$
Médula espinal torácica	0,5	0,4	0,6	0,7	0,5	$\pm 0,1$
Médula espinal lumbar	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	$\pm 0,03$
Círculo de Willis y arteria basilar	24,9	29,7	17,7	9,3	20,4	$\pm 4,4$
Arteria carótida	207,3	17,9	14,1	13,1	63,1	$\pm 48,1$
Arteria renal (I)	6,1	2,4	4,5	2,4	3,8	$\pm 0,9$
Ganglios superficiales (2)	30,8	17,1	6,9	0,8	13,9	± 66
Ganglios cervicales (2)	7,7	3,4	9,2	62,7	20,8	$\pm 14,0$
Ganglios axilares (2)	4,2	2,1	2,2	2,8	2,8	$\pm 0,5$
Muestra de sangre	2.889,3	8,0	1.730,1	7,1	1.158,6	$\pm 705,4$
Músculo (D, deltoides)	3,7	2,1	1,2	1,4	2,1	$\pm 0,6$
Hígado (D, lóbulo superficial)	1,2	1,0	0,9	0,9	1,0	$\pm 0,1$
Riñón (I, punta)	13,1	2,5	6,9	3,0	6,4	$\pm 2,5$

Orina	5,4	4,0	9,3	3,0	5,4	± 1,4
Bazo (punta)	3,1	1,2	3,0	1,8	2,3	± 0,5
Corazón	4,4	2,9	0,4	0,7	2,1	± 0,9
Pulmón (D, lóbulo superior)	3,4	5,2	2,3	2,6	3,4	± 0,6
Tiroides	28.623,9	102,6	30.320,6	15,7	14.765,7	± 8.497,9
Esófago	3,7	2,5	2,7	4,7	3,4	± 0,5
Tráquea	2,7	1,5	2,0	4,9	2,8	± 0,8
CPM convencional de fármaco	2.316.335	2.316.335	3.256.120	3.256.120	2.786.228	± 271.292,6
CPM convencional de fármaco	2.380.434	2.380.434	3.216.298	3.216.298	2.798.366	± 241.293,2
CPM convencional de fármaco	2.259.775	2.259.775	3.051.466	3.051.466	2.655.621	± 228.541,5

* = peso negativo del tubo, por lo que no se pudo calcular nM

Resultados, distribución de la preparación de microesferas de IgG intranasal en el punto final de 30 min.

- 5 Ocho ratas recibieron preparación de microesferas de IgG I.N. a una dosis promedio de 7,2 mg en 48,0 µl que contenían 60,0 µCi con un punto final de 30 min. Los datos sin procesar de las ocho ratas se proporcionan en la tabla 6. Los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 30 min.

10 Tabla 6. Biodistribución (concentraciones nM) de preparaciones de microesferas de IgG administradas por vía intranasal en el punto final de 30 min con valores aberrantes excluidos.

	BAX-21	BAX-22	BAX-23	BAX-25	BAX-26	BAX-28	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	± 0,00
uCi administrado	59,9	56,3	73,4	60,8	53,1	56,5	60,0	± 29
mg administrados	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	± 0,00
Epitelio olfativo	X	377,5	629,1	X	97,9	201,0	326,4	± 116,3
Epitelio respiratorio	23.108,2	20.219,7	33.657,6	87.547,5	183.182,6	101.353,0	74.844,8	± 25.792,8
Nervio trigémino anterior	2,0	1,7	2,1	1,3	0,8	1,2	1,5	± 0,2
Nervio trigémino posterior	2,0	1,2	1,3	0,8	0,7	0,9	1,1	± 0,2
Bulbos olfativos	2,7	1,0	1,1	0,6	1,0	0,7	1,2	± 0,3
Núcleo olfativo anterior	0,7	1,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,6	± 0,1
Corteza frontal	0,8	0,3	0,8	0,4	0,4	0,4	0,5	± 0,1
Corteza parietal	0,3	0,6	0,6	0,2	0,4	0,4	0,4	± 0,1
Corteza temporal	0,2	0,4	0,2	1,3	0,2	0,3	0,5	± 0,2
Corteza occipital	0,3	0,1	0,4	0,4	2,3	0,6	0,7	± 0,3
Corteza extra	0,3	0,3	0,9	0,3	0,2	0,3	0,4	± 0,1
Cuerpo amigdalino	0,2	X	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	± 0,04
Cuerpo estriado	0,6	1,5	0,3	1,1	X	2,1	1,1	± 0,3
Núcleo septal	0,4	0,7	0,1	1,1	0,6	0,6	0,6	± 0,1
Hipotálamo	0,7	0,5	0,3	0,4	0,3	0,6	0,5	± 0,1
Tálamo	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,01
Mesencéfalo	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,3	± 0,05

ES 2 759 226 T3

Hipocampo	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	$\pm 0,03$
Protuberancia	0,4	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4	$\pm 0,04$
Médula	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	$\pm 0,04$
Cerebelo	0,3	1,1	X	1,7	0,2	0,2	0,7	$\pm 0,3$
Corte extra n.º 1	1,1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	$\pm 0,1$
Corte extra n.º 2	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	2,4	0,6	$\pm 0,4$
Corte extra n.º 3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,5	0,3	$\pm 0,04$
Corte extra n.º 4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	2,8	0,6	$\pm 0,4$
Corte extra n.º 5	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	$\pm 0,02$
Corte extra n.º 6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	$\pm 0,01$
Hipófisis	1,8	1,3	3,2	2,9	1,7	2,6	2,2	$\pm 0,3$
Quiasma óptico	2,2	1,4	2,5	2,1	1,4	0,7	1,7	$\pm 0,3$
Duramadre dorsal	5,4	7,8	5,0	2,4	5,1	1,6	4,6	$\pm 0,9$
Duramadre ventral	9,4	3,1	2,9	3,7	3,1	1,7	4,0	$\pm 1,1$
Duramadre espinal	0,6	0,4	0,8	0,2	X	0,6	0,5	$\pm 0,1$
Médula espinal cervical superior	0,50	0,36	0,52	0,28	0,34	0,53	0,42	$\pm 0,04$
Médula espinal cervical inferior	0,06	0,14	0,13	0,10	0,12	0,12	0,11	$\pm 0,01$
Médula espinal torácica	0,06	0,03	0,08	0,09	X	0,04	0,06	$\pm 0,0$
Médula espinal lumbar	0,08	0,07	0,10	0,05	0,07	0,03	0,06	$\pm 0,01$
Círculo de Willis y arteria basilar	11,5	X	15,7	12,4	2,0	5,2	9,3	$\pm 2,5$
Arteria carótida	4,6	5,4	1,6	1,9	X	1,9	3,1	$\pm 0,8$
Arteria renal (l)	0,9	0,4	0,5	0,7	0,6	0,5	0,6	$\pm 0,1$
Ganglios superficiales (2)	0,8	0,7	0,9	X	4,3	0,8	1,5	$\pm 0,7$
Ganglios cervicales (2)	1,2	1,9	1,1	0,8	X	0,5	1,1	$\pm 0,2$
Ganglios axilares (2)	0,4	X	0,3	0,5	1,0	0,5	0,5	$\pm 0,1$
Muestra de sangre	156,7	261,5	1,1	1,9	362,3	268,7	175,4	$\pm 61,1$
Músculo (D, deltoides)	0,1	0,9	0,3	0,3	0,7	0,2	0,4	$\pm 0,1$
Hígado (D, lóbulo superficial)	0,0	X	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	$\pm 0,05$
Riñón (l, punta)	0,6	0,3	0,4	1,0	1,0	1,2	0,8	$\pm 0,1$
Orina	0,6	1,1	0,9	0,9	3,5	2,7	1,6	$\pm 0,5$
Bazo (punta)	0,3	0,4	0,6	0,6	0,4	0,9	0,5	$\pm 0,1$
Corazón	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	$\pm 0,04$
Pulmón (D, lóbulo superior)	0,5	0,4	0,3	2,2	0,2	1,3	0,8	$\pm 0,3$

Tiroides	1.697,8	3.275,2	16,1	36,2	X	35,6	1012,2	± 651,5
Esófago	0,6	0,4	0,1	0,7	1,3	0,4	0,6	± 0,2
Tráquea	0,5	1,0	0,3	0,6	0,8	0,6	0,6	± 0,1
CPM convencional de fármaco	6.936.801	6.170.223	8.071.624	7.024.714	6.006.357	6.587.524	6.799.540,2	± 303.198,0
CPM convencional de fármaco	6.854.563	6.687.656	8.239.126	6.958.531	6.134.932	6.360.075	6.872.480,3	± 300.895,5
CPM convencional de fármaco	6.894.326	6.596.846	9.035.030	7.046.819	6.205.338	6.576.363	7.059.120,2	± 412.602,5

X = valor aberrante eliminado del análisis

5 En el sitio de administración de fármacos I.N., las concentraciones promedio de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron de 74.844,8 nM y 326 nM, respectivamente. Se observó un gradiente rostro-caudal de IgG 1,5 nM a 1,1 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de IgG 1,2 nM a 0,6 nM. La concentración en corteza promedio de IgG después de administración I.N. fue de 0,5 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 0,1 nM en el tálamo hasta un máximo de 1,1 nM en el cuerpo estriado. Se descubrió que el hipocampo contenía IgG 0,2 nM. La concentración promedio de IgG en el material cerebral extra muestreado fue de 0,4 nM, similar a la concentración en corteza

10 promedio, y no se observó un gradiente de concentración. Se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 0,42 nM a 0,06 nM) en la médula espinal. La concentración promedio de IgG en la duramadre del cerebro fue de 4,3 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 0,6 nM. Otros tejidos muestreados del cráneo ventral, la hipófisis y el quiasma óptico, contenían IgG 2,2 nM y 1,7 nM, respectivamente.

15 La concentración en sangre de IgG en el punto final de 30 min fue de 175 nM. Las concentraciones de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 0,2 nM en el hígado hasta un máximo de 0,8 nM en el riñón, conteniendo la orina 1,6 nM. Las concentraciones de IgG en las arterias basilar y carótida fueron considerablemente mayores que la concentración en la arteria renal (9,3 y 3,1 nM frente a 0,6 nM). La concentración promedio de IgG en los ganglios linfáticos muestreados fue de 1,0 nM. Los niveles de IgG en los tejidos medidos para evaluar la variabilidad de la administración I.N. y la dificultad para respirar (pulmón, esófago y tráquea) concordaron en todos los animales. Los niveles de IgG en la tiroides variaron mucho, desde 16,1 nM hasta 3,275 nM, incluso después de la eliminación de valores aberrantes.

20 *Resultados, distribución de preparación de fragmentos de IgG intranasal en el punto final de 30 min.* Cuatro ratas recibieron una preparación de fragmento de anticuerpo Fab de IgG I.N. a una dosis promedio de aproximadamente 3,3 mg en 48,2 µl que contenían 76,4 µCi. Los datos sin procesar de las cuatro ratas se proporcionan en la tabla 7. Los cuatro experimentos se completaron con un punto final de 30 min, y tal como se esperaba, los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado.

30 **Tabla 7. Biodistribución (concentraciones nM) de preparaciones de Fab de IgG administradas por vía intranasal en el punto final de 30 min con valores aberrantes excluidos.**

	BAX-41	BAX-42	BAX-43	BAX-44	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	48,1	48,1	48,2	48,2	48,2	± 0,0
uCi administrado	76,7	76,7	76,0	76,0	76,4	± 0,2
mg administrados	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	± 0,0
Epitelio olfativo	232,4	435,2	271,2	X	312,9	± 62,1
Epitelio respiratorio	93.166,9	138.501,7	59.830,3	140.806,9	108076,4	± 19.465,7
Nervio trigémino anterior	72,8	101,4	141,5	73,3	97,2	± 16,2
Nervio trigémino posterior	32,4	34,2	33,9	19,8	30,1	± 3,4
Bulbos olfativos	54,0	26,3	45,2	23,7	37,3	± 7,3
Núcleo olfativo anterior	20,4	14,1	25,0	15,9	18,8	± 2,4
Corteza frontal	20,0	11,9	21,5	X	17,8	± 3,0
Corteza parietal	7,0	5,8	11,6	6,7	7,8	± 1,3
Corteza temporal	5,6	4,3	9,5	4,3	5,9	± 1,2

ES 2 759 226 T3

Corteza occipital	9,3	5,6	7,1	10,0	8,0 ± 1,0
Corteza extra	8,9	7,0	8,5	4,2	7,2 ± 1,1
Cuerpo amigdalino	10,3	14,3	15,2	6,9	11,7 ± 1,9
Cuerpo estriado	5,0	5,0	8,6	3,8	5,6 ± 1,0
Núcleo septal	8,4	6,8	10,8	5,1	7,8 ± 1,2
Hipotálamo	18,0	18,1	22,7	6,3	16,3 ± 3,5
Tálamo	5,1	8,2	9,8	2,9	6,5 ± 1,5
Mesencéfalo	8,9	10,3	11,0	4,0	8,6 ± 1,6
Hipocampo	6,1	7,4	7,2	2,6	5,8 ± 1,1
Protuberancia	11,0	12,4	12,4	4,9	10,2 ± 1,8
Médula	11,0	10,5	11,3	5,0	9,4 ± 1,5
Cerebelo	9,2	5,5	6,1	8,3	7,3 ± 0,9
Corte extra n.º 1	27,6	16,8	31,2	32,5	27,0 ± 3,6
Corte extra n.º 2	12,5	9,8	16,0	X	12,8 ± 1,8
Corte extra n.º 3	8,5	8,1	11,5	13,9	10,5 ± 1,4
Corte extra n.º 4	7,4	6,5	9,2	6,2	7,3 ± 0,7
Corte extra n.º 5	6,8	X	8,1	14,3	9,7 ± 2,3
Corte extra n.º 6	6,0	5,5	7,4	4,1	5,7 ± 0,7
Hipófisis	41,6	44,2	50,6	34,0	42,6 ± 3,4
Quiasma óptico	31,8	21,8	36,4	12,4	25,6 ± 5,4
Duramadre dorsal	138,2	115,3	129,9	101,5	121,2 ± 8,1
Duramadre ventral	123,1	109,7	106,0	81,1	105,0 ± 8,8
Duramadre espinal	3,4	8,1	2,7	4,5	4,7 ± 1,2
Médula espinal cervical superior	20,5	13,7	16,7	7,9	14,7 ± 2,7
Médula espinal cervical inferior	1,0	0,7	0,9	1,3	1,0 ± 0,1
Médula espinal torácica	0,9	0,7	0,8	1,3	0,9 ± 0,1
Médula espinal lumbar	0,7	0,6	0,6	0,8	0,7 ± 0,1
Círculo de Willis y arteria basilar	64,0	84,6	69,8	44,4	65,7 ± 8,3
Arteria carótida	X	36,0	35,5	42,9	38,1 ± 2,4
Arteria renal (l)	9,9	14,8	4,0	5,9	8,6 ± 2,4
Ganglios superficiales (2)	9,0	9,4	5,5	6,7	7,6 ± 0,9
Ganglios cervicales (2)	19,5	X	23,8	32,0	25,1 ± 3,7
Ganglios axilares (2)	3,2	6,2	3,6	4,1	4,3 ± 0,7
Muestra de sangre	31,2	38,4	28,9	33,2	32,9 ± 2 · û
Músculo (D, deltoides)	2,87	5,05	2,26	2,18	3,1 ± 0,7
Hígado (D, lóbulo superficial)	3,8	3,3	4,0	2,4	3,4 ± 0,3
Riñón (l, punta)	11,1	21,5	4,0	13,1	12,4 ± 3,6
Orina	10,6	10,3	19,9	9,0	12,4 ± 2,5
Bazo (punta)	9,7	12,9	3,4	9,0	8,7 ± 2,0
Corazón	0,8	3,0	4,5	1,5	2,5 ± 0,8

Pulmón (D, lóbulo superior)	3,5	9,1	6,7	4,4	5,9 ± 1,2
Tiroides	228,2	411,7	230,1	273,2	285,8 ± 43,2
Esófago	4,1	6,4	X	5,8	5,4 ± 0,7
Tráquea	5,6	8,7	11,3	4,8	7,6 ± 1,5
CPM convencional de fármaco	7.158.905	7.158.905	6.994.454	6.994.454	7076679,3 ± 47.472,8
CPM convencional de fármaco	6.974.631	6.974.631	7.215.418	7.215.418	7095024,0 ± 69.509,2
CPM convencional de fármaco	7.280.104	7.280.104	7.020.805	7.020.805	7150454,3 ± 74.853,3

X = valor aberrante eliminado del análisis

5 En el sitio de administración de fármacos I.N., las concentraciones promedio de Fab de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron de 108.076 nM y 313 nM, respectivamente. Se observó un gradiente rostro-caudal de Fab de IgG de 97,2 nM a 30,1 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de Fab de IgG de 37,3 nM a 18,8 nM. La concentración en corteza promedio de Fab de IgG después de administración I.N. fue de 9,3 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 5,6 nM en el cuerpo estriado hasta un máximo de 16,3 nM en el hipotálamo. Se halló que el hipocampo contenía Fab de IgG 5,8 nM. Se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 27,0 nM a 5,7 nM) dentro del material cerebral extra muestreado. Del mismo modo, se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 14,7 nM a 0,7 nM) en la médula espinal. La concentración promedio de Fab de IgG en la duramadre del cerebro fue de 113,1 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 4,7 nM. Otros tejidos muestreados de la cavidad del cráneo ventral (hipófisis y quiasma óptico) contenían Fab de IgG 42,6 nM y 25,6 nM, respectivamente.

15 La concentración en sangre de Fab de IgG en el punto final de 30 min fue de 32,9 nM. Las concentraciones de Fab de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 2,5 nM en el corazón hasta un máximo de 12,4 nM en el riñón y la orina, conteniendo el bazo 8,7 nM. Las concentraciones de Fab de IgG en las arterias basilar y carótida fueron considerablemente mayores que en la arteria renal (65,7 y 38,1 nM frente a 8,6 nM).

20 *Resultados, comparación de puntos finales de 30 min y 90 min.* Las concentraciones de IgG en los tejidos cerebrales fueron generalmente similares o ligeramente mayores con el punto final extendido de 90 min en comparación con el punto final de 30 min para la preparación líquida de IgG. Hubo más variabilidad en la preparación de microesferas de IgG, conteniendo algunos tejidos mucho más (tálamo, mesencéfalo) y conteniendo algunos tejidos mucho menos (cuerpo estriado, corteza occipital) en los puntos finales de 90 min frente a los 30 min. Los resúmenes de las concentraciones de IgG en los tejidos se proporcionan en la tabla 8 y la tabla 9.

Tabla 8. Resumen de las concentraciones tisulares (nM ± EE) de IgG I.N., I.V. y Fab en los puntos finales de 30 min y 90 min con valores aberrantes eliminados.

Tratamiento	Proteína de IgG (media nM ± EE)			Microesferas de IgG (media nM ± EE)		Fab de IgG (media nM ± EE)
	Intravenosa	Intranasal		Intranasal		Intranasal
Vía						
Punto de tiempo	30 min		90 min	30 min	90 min	30 min
Tamaño de muestra	n = 7	n = 8	n = 6	n = 6	n = 5	n = 4
Volumen administrado (µl)	47,7 ± 0,2	47,4 ± 0,2	47,6 ± 0,1	48,0 ± 0,00	48,0 ± 0,00	48,2 ± 0,0
uCi administrado	69,5 ± 0,3	69,6 ± 0,3	70,0 ± 0,01	60,0 ± 2,9	59,7 ± 2,0	76,4 ± 0,2
mg administrados	6,0 ± 0,03	6,0 ± 0,02	7,4 ± 0,00	7,2 ± 0,00	7,2 ± 0,00	3,3 ± 0,0
Epitelio olfativo	43,0 ± 3,7	441 ± 185	355 ± 71	326 ± 116	3.192 ± 1.625	312,9 ± 62,1
Epitelio respiratorio	41,1 ± 4,3	136.213 ± 27.325	163.627 ± 16.376	74.845 ± 25.793	124.509 ± 20.723	108076,4 ± 19.465,7
Nervio trigémino anterior	10,5 ± 1,0	13,1 ± 2,6	19,3 ± 2,8	1,5 ± 0,2	8,0 ± 1,3	97,2 ± 16,2
Nervio trigémino posterior	6,3 ± 1,0	6,0 ± 1,1	8,4 ± 1,7	1,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	30,1 ± 3,4

ES 2 759 226 T3

Bulbos olfativos	3,4 ± 0,5	4,1 ± 0,9	9,9 ± 1,6	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	37,3 ± 7,3
Núcleo olfativo anterior	1,9 ± 0,3	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	18,8 ± 2,4
Corteza frontal	2,9 ± 0,5	1,4 ± 0,1	3,8 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	17,8 ± 3,0
Corteza parietal	3,3 ± 0,7	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	7,8 ± 1,3
Corteza temporal	2,9 ± 0,7	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	5,9 ± 1,2
Corteza occipital	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3	2,5 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1	8,0 ± 1,0
Corteza extra	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	7,2 ± 1,1
Cuerpo amigdalino	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,1	11,7 ± 1,9
Cuerpo estriado	1,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,6 ± 0,2	5,6 ± 1,0
Núcleo septal	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,4	7,8 ± 1,2
Hipotálamo	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	16,3 ± 3,5
Tálamo	1,7 ± 0,3	0,4 ± 0,03	0,6 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,1	6,5 ± 1,5
Mesencéfalo	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,05	0,5 ± 0,1	8,6 ± 1,6
Hipocampo	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,03	0,5 ± 0,1	5,8 ± 1,1
Protuberancia	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,1	10,2 ± 1,8
Médula	1,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,04	9,4 ± 1,5
Cerebelo	1,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	7,3 ± 0,9
Corte extra n.º 1	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3	3,3 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	27,0 ± 3,6
Corte extra n.º 2	2,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1	12,8 ± 1,8
Corte extra n.º 3	2,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,04	10,5 ± 1,4
Corte extra n.º 4	2,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,03	7,3 ± 0,7
Corte extra n.º 5	2,6 ± 0,6	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,04	9,7 ± 2,3
Corte extra n.º 6	2,6 ± 0,5	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,05	5,7 ± 0,7
Hipófisis	10,1 ± 0,8	8,2 ± 1,8	8,4 ± 1,1	2,2 ± 0,3	2,8 ± 0,5	42,6 ± 3,4
Quiasma óptico	5,1 ± 0,7	7,4 ± 1,7	8,0 ± 0,7	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,9	25,6 ± 5,4
Duramadre dorsal	27,6 ± 3,0	15,3 ± 2,6	31,1 ± 4,0	4,6 ± 0,9	5,8 ± 1,8	121,2 ± 8,1
Duramadre ventral	23,5 ± 3,1	15,0 ± 2,5	32,3 ± 4,4	4,0 ± 1,1	11,4 ± 3,8	105,0 ± 8,8
Duramadre espinal	47,2 ± 3,0	2,8 ± 0,3	3,3 ± 0,7	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,7 ± 1,2
Médula espinal cervical superior	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	0,4 ± 0,04	0,6 ± 0,2	14,7 ± 2,7
Médula espinal cervical inferior	2,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Médula espinal torácica	1,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,9 ± 0,1
Médula espinal lumbar	2,1 ± 0,3	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,7 ± 0,1
Círculo de Willis y arteria basilar	18,1 ± 2,8	11,7 ± 2,5	14,8 ± 1,1	9,3 ± 2,5	5,8 ± 1,1	65,7 ± 8,3
Arteria carótida	33,2 ± 3,3	14,1 ± 2,0	16,1 ± 2,3	3,1 ± 0,8	6,3 ± 0,4	38,1 ± 2,4
Arteria renal (l)	111,2 ± 10,1	4,4 ± 1,0	11,4 ± 3,3	0,6 ± 0,1	3,7 ± 1,5	8,6 ± 2,4
Ganglios superficiales (2)	25,3 ± 2,9	4,8 ± 0,4	10,4 ± 2,2	1,5 ± 0,7	2,4 ± 0,1	7,6 ± 0,9

Ganglios cervicales (2)	62,6 ± 9,2	5,6 ± 0,7	6,9 ± 0,8	1,1 ± 0,2	2,6 ± 0,03	25,1 ± 3,7
Ganglios axilares (2)	42,8 ± 12,8	3,7 ± 0,5	6,0 ± 0,6	0,5 ± 0,1	2,6 ± 0,6	4,3 ± 0,7
Muestra de sangre	1.361 ± 42,5	13,9 ± 0,9	19,7 ± 1,4	175 ± 61	223 ± 84,2	32,9 ± 2,0
Músculo (D, deltoides)	19,1 ± 3,8	2,7 ± 0,5	2,9 ± 0,7	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,3	3,1 ± 0,7
Hígado (D, lóbulo superficial)	135 ± 23,7	1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,4	0,2 ± 0,05	0,8 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Riñón (l, punta)	355 ± 30,8	6,1 ± 0,8	8,5 ± 1,6	0,8 ± 0,1	2,6 ± 0,6	12,4 ± 3,6
Orina	92,6 ± 26,0	8,1 ± 1,4	17,5 ± 2,2	1,6 ± 0,5	6,3 ± 1,7	12,4 ± 2,5
Bazo (punta)	228 ± 17,5	6,1 ± 1,0	6,8 ± 0,4	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,5	8,7 ± 2,0
Corazón	63,2 ± 11,7	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,6	0,3 ± 0,04	0,6 ± 0,1	2,5 ± 0,8
Pulmón (D, lóbulo superior)	261 ± 51,3	2,9 ± 0,4	4,5 ± 0,7	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,4	5,9 ± 1,2
Tiroides	534 ± 65,0	148 ± 12,8	620 ± 30,8	1.012 ± 652	216 ± 50	285,8 ± 43,2
Esófago	28,1 ± 3,9	4,3 ± 0,6	7,7 ± 1,3	0,6 ± 0,2	4,7 ± 1,3	5,4 ± 0,7
Tráquea	28,2 ± 6,2	3,9 ± 0,6	6,6 ± 1,4	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,6	7,6 ± 1,5
CPM convencional de fármaco	7.448.243 ± 128.562	7.630.853 ± 169.309	7.166.204 ± 76.377	6.799.540 ± 303.198	6.861.351 ± 210.321	7076679,3 ± 47.472,8
CPM convencional de fármaco	7.089.796 ± 272.234	7.470.182 ± 171.868	7.200.437 ± 154.753	6.872.480 ± 300.896	6.758.588 ± 176.717	7095024,0 ± 69.509,2
CPM convencional de fármaco	7.390.784 ± 351.624	7.689.073 ± 214.590	7.022.761 ± 10.481	7.059.120 ± 412.602	7.027.097 ± 316.344	7150454,3 ± 74.853,3

Tabla 9. Resumen de las concentraciones tisulares de IgG normalizadas a una dosis de 6 mg.

Tratamiento	Proteína de IgG (media nM)		Microesferas de IgG (media nM)		Fab de IgG (media nM)	
	Intravenosa	Intranasal	Intranasal		Intranasal	
Vía						
Punto de tiempo	30 min	90 min	30 min	90 min	30 min	
Tamaño de muestra	n = 7	n = 8	n = 6	n = 6	n = 5	n = 4
Volumen administrado (µl)	47,7	47,4	47,6	48,0	48,0	48,2
uCi administrado	69,5	69,6	70,0	60,0	59,7	76,4
mg administrados	6,0	6,0	7,4	7,2	7,2	3,3
Epitelio olfativo	43,0	441	288	272	2.660	569,0
Epitelio respiratorio	41,1	136.213	132.671	62.371	103.758	196502,6
Nervio trigémino anterior	10,5	13,1	15,6	1,3	6,7	176,8
Nervio trigémino posterior	6,3	6,0	6,8	0,9	2,6	54,7
Bulbos olfativos	3,4	4,1	8,0	1,0	1,2	67,8
Núcleo olfativo anterior	1,9	1,5	2,1	0,5	0,5	34,3
Corteza frontal	2,9	1,4	3,1	0,4	0,5	32,3
Corteza parietal	3,3	0,9	1,3	0,3	0,3	14,1
Corteza temporal	2,9	1,1	1,1	0,4	0,4	10,8
Corteza occipital	2,3	1,8	2,0	0,6	0,3	14,5

ES 2 759 226 T3

Corteza extra	1,8	1,0	1,6	0,3	0,4	13,0
Cuerpo amigdalino	1,9	1,4	1,3	0,2	0,3	21,2
Cuerpo estriado	1,8	0,7	0,7	0,9	0,5	10,2
Núcleo septal	1,8	0,9	0,9	0,5	0,5	14,2
Hipotálamo	2,0	1,7	1,6	0,4	0,5	29,6
Tálamo	1,7	0,4	0,5	0,1	0,3	11,8
Mesencéfalo	1,8	0,7	1,1	0,2	0,4	15,6
Hipocampo	1,1	0,6	0,8	0,2	0,4	10,6
Protuberancia	1,7	0,9	1,3	0,3	0,4	18,5
Médula	1,8	0,9	1,3	0,2	0,3	17,1
Cerebelo	1,9	0,8	1,3	0,6	0,4	13,2
Corte extra n.º 1	2,0	1,6	2,7	0,4	0,6	49,1
Corte extra n.º 2	2,1	1,0	1,6	0,5	0,4	23,2
Corte extra n.º 3	2,2	0,8	1,3	0,2	0,3	19,1
Corte extra n.º 4	2,4	0,7	0,9	0,5	0,2	13,3
Corte extra n.º 5	2,6	0,7	1,0	0,2	0,3	17,7
Corte extra n.º 6	2,6	0,9	1,0	0,2	0,3	10,4
Hipófisis	10,1	8,2	6,8	1,9	2,3	77,5
Quiasma óptico	5,1	7,4	6,5	1,4	1,6	46,5
Duramadre dorsal	27,6	15,3	25,2	3,8	4,9	220,4
Duramadre ventral	23,5	15,0	26,2	3,3	9,5	190,8
Duramadre espinal	47,2	2,8	2,7	0,4	0,6	8,5
Médula espinal cervical superior	2,0	1,2	1,6	0,4	0,5	26,7
Médula espinal cervical inferior	2,6	0,6	0,5	0,1	0,3	1,8
Médula espinal torácica	1,6	0,4	0,4	0,1	0,2	1,7
Médula espinal lumbar	2,1	0,3	0,4	0,1	0,1	1,2
Círculo de Willis y arteria basilar	18,1	11,7	12,0	7,8	4,8	119,4
Arteria carótida	33,2	14,1	13,1	2,6	5,3	69,3
Arteria renal (l)	111,2	4,4	9,2	0,5	3,1	15,7
Ganglios superficiales (2)	25,3	4,8	8,5	1,2	2,0	13,9
Ganglios cervicales (2)	62,6	5,6	5,6	0,9	2,2	45,6
Ganglios axilares (2)	42,8	3,7	4,9	0,4	2,2	7,8
Muestra de sangre	1.361	13,9	16,0	146	186	59,8
Músculo (D, deltoides)	19,1	2,7	2,3	0,4	0,8	5,6
Hígado (D, lóbulo superficial)	135	1,7	2,1	0,2	0,7	6,1
Riñón (l, punta)	355	6,1	6,9	0,6	2,1	22,6
Orina	92,6	8,1	14,2	1,3	5,2	22,6
Bazo (punta)	228	6,1	5,5	0,4	1,7	15,9
Corazón	63,2	1,3	2,2	0,2	0,5	4,5

ES 2 759 226 T3

Pulmón superior) (D, lóbulo)	261	2,9	3,6	0,7	1,0	10,8
Tiroides	534	148	502	843	180	519,6
Esófago	28,1	4,3	6,2	0,5	3,9	9,9
Tráquea	28,2	3,9	5,4	0,5	1,6	13,8

5 *Resultados, distribución de preparación líquido de IgG intranasal en el punto final de 90 min.* Seis ratas recibieron preparación líquida de IgG I.N. en una dosis promedio de 7,4 mg en 47,6 µl que contenía 70,0 µCi con un punto final de 90 min. Los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 90 min. Las concentraciones de IgG nanomolares en los tejidos para las administraciones de preparación líquida de IgG I.N. tomadas en el punto final de 90 min se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones tisulares (nM) de IgG después de la administración de preparación líquida de IgG intranasal en el punto final de 90 min con valores aberrantes excluidos.

	BAX-24	BAX-33	BAX-34	BAX-35	BAX-36	BAX-40	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	47,8	47,4	47,4	47,5	47,5	47,8	47,6	± 0,1
uCi administrado	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	± 0,01
mg administrados	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	± 0,00
Epitelio olfativo	669,3	389,3	196,5	203,8	307,7	365,8	355,4	± 70,8
Epitelio respiratorio	205.721,0	194.945,7	189.621,1	139.524,3	150.482,2	101.469,9	163.627,4	± 16.376,5
Nervio trigémino anterior	16,8	30,0	15,0	10,6	20,1	23,1	19,3	± 2,8
Nervio trigémino posterior	X	13,4	5,2	6,7	5,6	11,3	8,4	± 1,7
Bulbos olfativos	15,5	9,1	10,1	10,5	3,6	10,8	9,9	± 1,6
Núcleo olfativo anterior	3,0	3,4	2,3	2,7	1,5	2,4	2,5	± 0,3
Corteza frontal	3,3	5,9	2,4	5,0	2,7	3,3	3,8	± 0,6
Corteza parietal	1,4	1,6	1,3	2,1	1,4	X	1,5	± 0,1
Corteza temporal	1,1	0,9	1,7	1,4	1,2	2,0	1,4	± 0,2
Corteza occipital	2,1	3,43	1,8	2,6	2,4	2,8	2,5	± 0,2
Corteza extra	1,6	1,6	1,6	2,6	1,9	2,5	1,9	± 0,2
Cuerpo amigdalino	1,7	1,6	1,3	1,2	1,1	2,6	1,6	± 0,2
Cuerpo estriado	0,9	0,4	0,6	1,0	1,2	1,0	0,9	± 0,1
Núcleo septal	1,4	1,1	1,1	0,9	1,4	0,9	1,1	± 0,1
Hipotálamo	2,5	1,8	1,6	2,3	1,3	2,2	1,9	± 0,2
Tálamo	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,78	0,6	± 0,04
Mesencéfalo	1,4	1,1	1,4	1,0	1,2	1,8	1,3	± 0,1
Hipocampo	1,0	0,9	1,1	0,7	0,8	1,2	1,0	± 0,1
Protuberancia	1,9	1,2	1,1	1,9	1,2	2,2	1,6	± 0,2
Médula	1,7	1,0	1,1	1,9	1,5	2,4	1,6	± 0,2
Cerebelo	1,4	1,0	1,6	2,1	1,4	2,5	1,7	± 0,2
Corte extra n.º 1	3,6	4,2	2,5	4,1	1,6	3,7	3,3	± 0,4
Corte extra n.º 2	X	2,4	1,4	2,1	1,4	2,3	1,9	± 0,2

ES 2 759 226 T3

Corte extra n.º 3	1,4	1,9	1,1	1,6	1,1	2,3	1,6 ± 0,2
Corte extra n.º 4	1,2	1,56	0,8	1,2	1,1	1,2	1,2 ± 0,1
Corte extra n.º 5	1,2	1,3	0,9	1,1	1,1	1,43	1,2 ± 0,1
Corte extra n.º 6	1,5	1,2	1,0	1,1	1,0	1,9	1,3 ± 0,1
Hipófisis	12,7	5,5	5,6	8,1	8,4	10,4	8,4 ± 1,1
Quiasma óptico	7,2	8,4	7,1	9,9	5,7	9,6	8,0 ± 0,7
Duramadre dorsal	12,3	33,0	37,7	37,7	29,6	36,5	31,1 ± 4,0
Duramadre ventral	21,6	47,6	41,2	26,5	21,4	35,4	32,3 ± 4,4
Duramadre espinal	2,0	3,2	1,4	2,6	4,3	6,4	3,3 ± 0,7
Médula espinal cervical superior	2,8	1,2	1,9	1,8	1,5	2,8	2,0 ± 0,3
Médula espinal cervical inferior	0,7	0,6	0,4	0,7	0,7	X	0,6 ± 0,1
Médula espinal torácica	0,5	0,4	0,4	0,3	0,5	0,9	0,5 ± 0,08
Médula espinal lumbar	0,4	0,3	0,2	0,4	0,5	0,8	0,4 ± 0,08
Círculo de Willis y arteria basilar	16,8	11,7	15,1	X	17,7	12,9	14,8 ± 1,1
Arteria carótida	17,4	13,5	12,6	13,0	13,5	26,9	16,1 ± 2,3
Arteria renal (I)	22,4	8,4	7,7	14,6	3,7	X	11,4 ± 3,3
Ganglios superficiales (2)	7,4	20,5	5,0	8,7	9,6	11,5	10,4 ± 2,2
Ganglios cervicales (2)	6,7	8,9	4,4	5,2	6,9	9,1	6,9 ± 0,8
Ganglios axilares (2)	7,2	5,8	4,3	4,5	7,9	6,3	6,0 ± 0,6
Muestra de sangre	17,7	23,3	16,1	X	22,5	19,0	19,7 ± 1,4
Músculo (D, deltoides)	2,6	3,2	1,0	1,3	5,4	3,6	2,9 ± 0,7
Hígado (D, lóbulo superficial)	2,8	1,4	3,9	1,1	2,7	3,4	2,6 ± 0,4
Riñón (I, punta)	16,0	7,6	8,8	4,7	6,6	7,3	8,5 ± 1,6
Orina	25,9	10,8	18,7	12,3	18,0	19,3	17,5 ± 2,2
Bazo (punta)	5,8	7,8	6,8	7,1	5,3	7,7	6,8 ± 0,4
Corazón	2,1	4,8	1,5	X	1,8	3,4	2,7 ± 0,6
Pulmón (D, lóbulo superior)	5,4	2,0	4,6	7,3	4,5	3,1	4,5 ± 0,7
Tiroides	543,6	566,7	700,5	X	680,7	606,1	619,5 ± 30,8
Esófago	13,5	8,7	6,3	7,4	5,5	4,8	7,7 ± 1,3
Tráquea	13,5	6,6	5,6	3,4	5,6	5,0	6,6 ± 1,4
CPM convencional de fármaco	7.390.846	7.130.719	7.130.719	6.977.049	6.977.049	7.390.846	7166204,3 ± 76.377,4
CPM convencional de fármaco	7.285.169	7.575.479	7.575.479	6.740.664	6.740.664	7.285.169	7200437,0 ± 154.753,0
CPM convencional	6.990.473	7.032.426	7.032.426	7.045.383	7.045.383	6.990.473	7022760,5 ± 10.480,7

de fármaco							
------------	--	--	--	--	--	--	--

X = valor aberrante eliminado del análisis En el sitio de administración del fármaco I.N., las concentraciones promedio de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron de 163.627 nM y 355 nM, respectivamente. Se observó un gradiente rostro-caudal de IgG 19,3 nM a 8,4 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de IgG 9,9 nM a 2,5 nM. La concentración en corteza promedio de IgG después de administración I.N. fue de 2,2 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 0,6 nM en el tálamo hasta un máximo de 1,9 nM en el hipotálamo. Se descubrió que el hipocampo contenía IgG 1,0 nM. Se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 3,3 nM a 1,2 nM) dentro del material cerebral extra muestreado. De manera similar, se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 2,0 nM a 0,4 nM) en la médula espinal. La concentración promedio de IgG en la duramadre del cerebro fue de 31,7 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 3,3 nM. Otros tejidos muestreados del cráneo ventral, la hipófisis y el quiasma óptico, contenían IgG 8,4 nM y 8,0 nM, respectivamente.

La concentración en sangre de IgG en el punto final de 30 min fue de 19,7 nM. Las concentraciones de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 2,6 nM en el hígado hasta un máximo de 7,7 nM en el bazo, conteniendo la orina 17,5 nM. Las concentraciones de IgG en las arterias basilar y carótida fueron similares a la concentración en la arteria renal (14,8 y 16,1 nM frente a 11,4 nM). La concentración promedio de IgG en los ganglios linfáticos muestreados fue de 7,8 nM. Los niveles de IgG en los tejidos medidos para evaluar la variabilidad de la administración I.N. y la dificultad para respirar (pulmón, esófago y tráquea) concordaron en todos los animales.

Resultados, distribución de la preparación de microesferas de IgG intranasal en el punto final de 90 min. Seis ratas recibieron preparación de microesferas de IgG I.N. a una dosis promedio de 7,2 mg en 48,0 µl que contenían 59,7 µCi con un punto final de 90 min. Los animales toleraron bien la administración I.N. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 90 min. Las concentraciones de IgG nanomolares en los tejidos para administraciones de preparación de microesferas de IgG I.N. tomadas en el punto final de 90 min en cinco de las seis ratas se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones tisulares (nM) de IgG después de administración intranasal de preparación de microesferas de IgG en el punto final de 90 min con valores aberrantes excluidos.

	BAX-31	BAX-32	BAX-37	BAX-38	BAX-39	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	± 0,00
µCi administrado	57,5	52,7	62,8	62,8	62,8	59,7	± 2,0
mg administrados	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	± 0,00
Epitelio olfativo	293,5	3.632,7	853,2	1.898,5	9.281,1	3.191,8	± 1.625
Epitelio respiratorio	169.083,6	169.807,3	128.471,3	69.460,0	85.723,8	124.509,2	± 20.723
Nervio trigémino anterior	11,1	5,9	10,7	7,6	4,5	8,0	± 1,3
Nervio trigémino posterior	2,6	3,3	3,6	X	3,1	3,1	± 0,2
Bulbos olfativos	2,0	1,9	1,2	1,2	1,2	1,5	± 0,2
Núcleo olfativo anterior	0,7	0,5	0,5	0,4	0,8	0,6	± 0,1
Corteza frontal	0,7	0,8	0,4	0,8	0,6	0,7	± 0,1
Corteza parietal	0,3	X	0,1	0,4	0,5	0,3	± 0,1
Corteza temporal	0,7	0,7	0,3	0,5	0,5	0,5	± 0,1
Corteza occipital	0,6	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	± 0,1
Corteza extra	0,6	0,81	0,4	0,4	X	0,5	± 0,1
Cuerpo amigdalino	0,2	X	0,3	0,49	0,53	0,4	± 0,1
Cuerpo estriado	0,2	1,3	0,2	0,4	0,9	0,6	± 0,2
Núcleo septal	0,4	1,9	0,1	0,2	X	0,6	± 0,4
Hipotálamo	0,6	0,8	0,4	0,4	0,9	0,6	± 0,1
Tálamo	0,2	0,6	0,1	0,2	0,4	0,3	± 0,1
Mesencéfalo	0,3	0,5	0,2	X	0,8	0,5	± 0,1
Hipocampo	0,3	0,5	0,2	0,2	1,0	0,5	± 0,1

ES 2 759 226 T3

Protuberancia	0,5	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	± 0,1
Médula	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	± 0,04
Cerebelo	0,5	0,8	0,2	0,4	0,7	0,5	± 0,1
Corte extra n.º 1	1,0	1,0	0,4	0,8	0,7	0,8	± 0,1
Corte extra n.º 2	0,4	0,50	0,2	0,4	0,96	0,5	± 0,1
Corte extra n.º 3	0,3	0,4	0,2	0,4	0,5	0,4	± 0,04
Corte extra n.º 4	0,3	X	0,2	0,3	0,3	0,3	± 0,03
Corte extra n.º 5	0,3	0,4	X	0,5	0,3	0,3	± 0,04
Corte extra n.º 6	0,4	X	0,2	0,4	0,4	0,3	± 0,05
Hipófisis	4,4	2,1	2,9	2,7	1,6	2,8	± 0,5
Quiasma óptico	X	3,4	X	1,9	0,4	1,9	± 0,9
Duramadre dorsal	X	11,3	3,8	3,7	4,5	5,8	± 1,8
Duramadre ventral	11,8	26,0	7,4	3,9	8,1	11,4	± 3,8
Duramadre espinal	0,6	0,8	0,7	X	X	0,7	± 0,1
Médula espinal cervical superior	0,5	0,3	1,1	0,9	0,3	0,6	± 0,2
Médula espinal cervical inferior	0,2	0,2	0,1	0,4	0,6	0,3	± 0,1
Médula espinal torácica	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	± 0,05
Médula espinal lumbar	X	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	± 0,02
Círculo de Willis y arteria basilar	8,9	5,0	3,4	X	5,9	5,8	± 1,1
Arteria carótida	5,3	7,1	5,9	7,5	5,9	6,3	± 0,4
Arteria renal (l)	1,8	3,3	1,9	9,6	1,8	3,7	± 1,5
Ganglios superficiales (2)	2,3	2,1	2,7	2,6	2,3	2,4	± 0,1
Ganglios cervicales (2)	2,5	2,6	2,7	2,5	2,7	2,6	± 0,0
Ganglios axilares (2)	2,2	1,4	1,9	4,6	3,1	2,6	± 0,6
Muestra de sangre	249,6	388,4	53,0	6,6	417,6	223,0	± 84,2
Músculo (D, deltoides)	0,0	0,9	1,2	X	1,5	0,9	± 0,3
Hígado (D, lóbulo superficial)	1,1	0,5	0,6	0,5	1,5	0,8	± 0,2
Riñón (l, punta)	1,6	1,9	1,3	3,7	4,3	2,6	± 0,6
Orina	4,7	4,6	6,7	2,7	12,8	6,3	± 1,7
Bazo (punta)	1,4	1,5	0,8	2,9	3,4	2,0	± 0,5
Corazón	0,5	0,7	0,2	0,5	0,9	0,6	± 0,1
Pulmón (D, lóbulo superior)	0,9	2,3	0,8	0,9	X	1,2	± 0,4
Tiroides	181,3	153,4	X	314,3	X	216,4	± 49,6
Esófago	2,4	5,6	1,2	5,3	8,8	4,7	± 1,3
Tráquea	1,7	1,6	0,9	3,7	X	2,0	± 0,6
CPM convencional de fármaco	6.696.942	6.103.589	7.168.742	7.168.742	7.168.742	6.861.351	± 210.321
CPM convencional de fármaco	6.548.447	6.157.644	7.028.950	7.028.950	7.028.950	6.758.588	± 176.717

CPM fármaco	convencional	de	6.631.733	5.962.084	7.513.889	7.513.889	7.513.889	7.027.097	± 316.344
----------------	--------------	----	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------------	------------------

X = valor aberrante eliminado del análisis en el sitio de administración del fármaco I.N., las concentraciones promedio de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron de 124.509 nM y 3.191 nM, respectivamente. Se observó un gradiente rostro-caudal de IgG 8,0 nM a 3,1 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de IgG 1,5 nM a 0,6 nM. La concentración en corteza promedio de IgG después de administración I.N. fue de 0,5 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 0,3 nM en el tálamo hasta un máximo de 0,65 nM en el núcleo septal. Se descubrió que el hipocampo contenía IgG 0,5 nM. La concentración promedio de IgG en el material cerebral extra muestreado fue de 0,4 nM, similar a la concentración en corteza promedio, y se observó un gradiente de concentración rostro-caudal. De manera similar, se observó un gradiente de concentración rostro-caudal (de 0,6 nM a 0,2 nM) en la médula espinal. La concentración promedio de IgG en la duramadre del cerebro fue de 8,6 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 0,7 nM. Otros tejidos muestreados del cráneo ventral, la hipófisis y el quiasma óptico, contenían IgG 2,8 nM y 1,9 nM, respectivamente.

La concentración en sangre de IgG en el punto final de 30 min fue 223,0 nM. Las concentraciones de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 0,6 nM en el corazón hasta un máximo de 2,6 nM en el riñón, conteniendo la orina 6,3 nM. Las concentraciones de IgG en las arterias basilar y carótida fueron similares a la concentración en la arteria renal (5,8 y 6,3 nM frente a 3,7 nM). La concentración promedio de IgG en los ganglios linfáticos muestreados fue de 2,5 nM. Los niveles de IgG en los tejidos medidos para evaluar la variabilidad de la administración I.N. y la dificultad para respirar (pulmón, esófago y tráquea) concordaron bastante en todos los animales. Los niveles de IgG en la tiroides variaron mucho antes de la eliminación de los valores aberrantes.

De forma global, la administración I.N. de la preparación líquida de IgG dio como resultado concentraciones en cerebro mayores que la preparación de microesferas cuando se normalizó a una dosis de 6,0 mg, oscilando concentraciones en cerebro desde 0,4 hasta 1,7 nM. Se presenta un resumen de los datos I.N., I.V. y Fab en la tabla 8. Esto podría explicarse por menores concentraciones de la IgG en microesferas que alcanzan los epitelios olfativo y respiratorio. La preparación de microesferas intranasal también dio como resultado concentraciones de IgG aproximadamente diez veces mayores en la sangre que la preparación líquida.

Normalizadas a una dosis de 6 mg I.N., las concentraciones en tejido de Fab fueron en promedio 19 veces mayores en el cerebro que las preparaciones líquidas de IgG. Se presenta un resumen de las concentraciones tisulares de IgG normalizadas a una dosis de 6 mg en la tabla 9. El peso molecular tres veces menor de Fab frente a IgG intacta es probablemente responsable de la mayor eficiencia de la administración directa desde la cavidad nasal al SNC. Si el Fab tiene efectos biológicos similares a los de la IgG para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, sería un candidato prometedor para la administración I.N.

Las comparaciones de las concentraciones en tejido cerebral (nM) después de las preparaciones líquidas de IgG intranasales y las preparaciones de microesferas en los puntos finales de 30 y 90 min se muestran la figura 2A y la figura 2B.

Resultados de la administración I.N. y I.V. de la preparación de proteína líquida después de 30 min. En promedio, la administración I.N. de la preparación líquida de IgG dio como resultado concentraciones en cerebro menores que una dosis I.V. equivalente administrada en el punto final de 30 min (por ejemplo, la concentración en corteza promedio de 1,3 nM frente a 2,6 nM). Sin embargo, para lograr estas concentraciones en cerebro de IgG, la administración I.V. dio como resultado concentraciones en sangre que eran cien veces mayores que la administración I.N. (1.361 nM frente a 13,9 nM). También se observaron mayores concentraciones de IgG en órganos y sistemas periféricos con la administración I.V. frente a I.N. Por ejemplo, las concentraciones de IgG en el sistema linfático fueron diez veces mayores con la administración I.V. frente a I.N. (43,6 nM frente a 4,7 nM).

Al normalizar las concentraciones tisulares a concentraciones en sangre, hígado o sistema linfático, fue evidente que la administración I.N. se dirige al sistema nervioso central. La razón de las concentraciones tisulares y las concentraciones en sangre de IgG intranasal e intravenosa se presenta en la tabla 12. Por ejemplo, para la corteza frontal, la administración I.N. da como resultado una concentración 48 veces mayor que I.V. cuando se normaliza con la concentración en sangre, 40 veces mayor cuando se normaliza a la concentración en hígado y 5 veces mayor cuando se normaliza a la concentración promedio en linfa. La administración intranasal aumentó el direccionamiento de IgG aproximadamente 50 veces más que la administración I.V. (en relación con la sangre) a áreas del cerebro que se sabe que acumulan amiloide β y hemo (ambos se unen a la IgG), incluyendo la corteza frontal, el hipocampo y las paredes de vaso sanguíneo de la cerebrovasculatura. Es importante destacar que el β -amiloide se une estrechamente al hemo y el hemo es un fuerte agente prooxidante y proinflamatorio que se sabe que inactiva los receptores cerebrales involucrados en la memoria.

ES 2 759 226 T3

Tabla 12. Comparación del direccionamiento intranasal e intravenoso de IgG.

	Razones de tejido con respecto a sangre			Razones de tejido con respecto a hígado			Razones de tejido con respecto a linfa prom.		
	I.V.	I.N.	I.N./I.V.	I.V.	I.N.	I.N./I.V.	I.V.	I.N.	I.N./I.V.
Epitelio olfativo	0,032	31.649	1002,1	0,319	266.650	836,2	0,986	94.481	95,8
Epitelio respiratorio	0,030	9764.511	323269,6	0,305	82267.965	269754,1	0,943	29149.726	30898,8
Nervio trigémino anterior	0,008	0,937	122,0	0,078	7,896	101,8	0,240	2,798	11,7
Nervio trigémino posterior	0,005	0,427	92,8	0,046	3,600	77,5	0,144	1,276	8,9
Bulbos olfativos	0,002	0,294	119,4	0,025	2,478	99,6	0,077	0,878	11,4
Núcleo olfativo anterior	0,001	0,105	73,3	0,014	0,883	61,2	0,045	0,313	7,0
Corteza frontal	0,002	0,102	48,1	0,022	0,863	40,1	0,067	0,306	4,6
Corteza parietal	0,002	0,066	26,9	0,025	0,556	22,5	0,077	0,197	2,6
Corteza temporal	0,002	0,081	38,2	0,022	0,686	31,9	0,067	0,243	3,7
Corteza occipital	0,002	0,130	78,1	0,017	1,093	65,2	0,052	0,387	7,5
Corteza extra	0,001	0,073	54,9	0,013	0,611	45,8	0,041	0,217	5,3
Cuerpo amigdalino	0,001	0,103	73,5	0,014	0,867	61,3	0,044	0,307	7,0
Cuerpo estriado	0,001	0,052	39,2	0,014	0,442	32,7	0,042	0,156	3,7
Núcleo septal	0,001	0,065	48,9	0,013	0,549	40,8	0,042	0,194	4,7
Hipotálamo	0,001	0,120	80,8	0,015	1,008	67,4	0,046	0,357	7,7
Tálamo	0,001	0,030	24,7	0,012	0,254	20,6	0,038	0,090	2,4
Mesencéfalo	0,001	0,049	37,7	0,013	0,411	31,4	0,040	0,146	3,6
Hipocampo	0,001	0,041	51,8	0,008	0,346	43,2	0,025	0,123	5,0
Protuberancia	0,001	0,062	48,3	0,013	0,522	40,3	0,040	0,185	4,6
Médula	0,001	0,062	47,4	0,013	0,526	39,5	0,041	0,186	4,5
Cerebelo	0,001	0,056	40,0	0,014	0,470	33,4	0,044	0,166	3,8
Corte extra n.º 1	0,001	0,116	77,8	0,015	0,978	64,9	0,047	0,346	7,4
Corte extra n.º 2	0,002	0,071	47,2	0,015	0,602	39,4	0,047	0,213	4,5
Corte extra n.º 3	0,002	0,059	36,5	0,016	0,497	30,5	0,050	0,176	3,5
Corte extra n.º 4	0,002	0,050	28,2	0,018	0,422	23,5	0,056	0,149	2,7
Corte extra n.º 5	0,002	0,053	28,1	0,019	0,451	23,5	0,059	0,160	2,7
Corte extra n.º 6	0,002	0,066	33,9	0,020	0,553	28,3	0,060	0,196	3,2
Hipófisis	0,007	0,585	79,0	0,075	4,928	65,9	0,231	1,746	7,5
Quiasma óptico	0,004	0,528	141,8	0,038	4,450	118,3	0,116	1,577	13,6
Duramadre dorsal	0,020	1,100	54,2	0,205	9,268	45,2	0,634	3,284	5,2
Duramadre ventral	0,017	1,075	62,2	0,174	9,053	51,9	0,539	3,208	5,9
Duramadre espinal	0,035	0,200	5,8	0,351	1,688	4,8	1,084	0,598	0,6

ES 2 759 226 T3

Médula espinal cervical superior	0,001	0,089	60,3	0,015	0,749	50,3	0,046	0,265	5,8
Médula espinal cervical inferior	0,002	0,044	23,2	0,019	0,372	19,4	0,059	0,132	2,2
Médula espinal torácica	0,001	0,032	27,7	0,012	0,269	23,1	0,036	0,095	2,6
Médula espinal lumbar	0,002	0,022	14,4	0,016	0,188	12,0	0,049	0,067	1,4
Círculo de Willis y arteria basilar	0,013	0,837	62,8	0,135	7,048	52,4	0,416	2,497	6,0
Arteria carótida	0,024	1,013	41,6	0,246	8,537	34,7	0,761	3,025	4,0
Arteria renal (l)	0,082	0,315	3,9	0,825	2,651	3,2	2,552	0,939	0,4
Ganglios superficiales (2)	0,019	0,341	18,4	0,187	2,876	15,3	0,580	1,019	1,8
Ganglios cervicales (2)	0,046	0,398	8,7	0,465	3,356	7,2	1,438	1,189	0,8
Ganglios axilares (2)	0,031	0,265	8,4	0,318	2,235	7,0	0,983	0,792	0,8
Muestra de sangre	1,000	1,000	1,0	10,097	8,425	0,8	31,233	2,985	0,1
Músculo (D, deltoides)	0,014	0,190	13,6	0,142	1,603	11,3	0,438	0,568	1,3
Hígado (D, lóbulo superficial)	0,099	0,119	1,2	1,000	1,000	1,0	3,093	0,354	0,1
Riñón (l, punta)	0,261	0,440	1,7	2,635	3,711	1,4	8,150	1,315	0,2
Orina	0,068	0,584	8,6	0,687	4,917	7,2	2,124	1,742	0,8
Bazo (punta)	0,168	0,434	2,6	1,693	3,658	2,2	5,236	1,296	0,2
Corazón	0,046	0,095	2,0	0,469	0,803	1,7	1,452	0,284	0,2
Pulmón (D, lóbulo superior)	0,192	0,210	1,1	1,936	1,769	0,9	5,990	0,627	0,1
Tiroides	0,393	10,607	27,0	3,963	89,366	22,5	12,259	31,665	2,6
Esófago	0,021	0,312	15,1	0,209	2,627	12,6	0,645	0,931	1,4
Tráquea	0,021	0,281	13,5	0,209	2,365	11,3	0,647	0,838	1,3

Ocho ratas recibieron preparación líquida de IgG I.V. a una dosis promedio de 6,0 mg en 47,4 µl que contenían 69,5 µCi (diluido en solución salina hasta un volumen total de 500 µl para inyección) con un punto final de 30 min. Los animales toleraron bien la administración I.V. y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 30 min. Un animal (BAX-3) se eliminó del análisis de la media, el error estándar y los valores aberrantes porque la concentración en sangre fue menor del 20% del valor observado en todos los demás animales, lo que sugiere que la infusión I.V. no tuvo éxito. Las concentraciones nanomolares de la preparación líquida de IgG administrada por vía intravenosa se midieron en siete ratas en el punto final de 30 min y se presentan en la tabla 13.

- 5
- 10 Tabla 13. Las concentraciones tisulares de la preparación líquida de IgG administrada por vía intravenosa se midieron en ratas en el punto final de 30 min y se eliminaron los valores aberrantes.

	BAX-5	BAX-7	BAX-9	BAX-10	BAX-11	BAX-13	BAX-15	Promedio	EE
Volumen administrado (µl)	47,0	47,0	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	47,7	± 0,2
µCi administrado	69,7	69,5	70,5	70,3	70,1	68,3	68,3	69,5	± 0,3

ES 2 759 226 T3

mg administrados	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9	6,0	± 0,03
Epitelio olfativo	33,0	40,5	40,4	43,0	56,5	32,0	55,5	43,0	± 3,7
Epitelio respiratorio	30,4	33,5	46,7	39,1	59,5	29,0	49,4	41,1	± 4,3
Nervio trigémino anterior	7,4	14,8	13,5	10,3	10,1	7,9	9,2	10,5	± 1,0
Nervio trigémino posterior	4,2	11,0	8,3	6,7	5,4	3,5	4,8	6,3	± 1,0
Bulbos olfativos	2,2	2,8	5,5	3,7	3,2	1,9	4,2	3,4	± 0,5
Núcleo olfativo anterior	1,1	2,1	3,3	1,8	1,9	1,2	2,2	1,9	± 0,3
Corteza frontal	2,5	4,0	3,2	1,8	2,7	1,2	4,9	2,9	± 0,5
Corteza parietal	3,3	5,2	3,0	1,6	2,6	1,3	6,4	3,3	± 0,7
Corteza temporal	1,7	3,7	2,5	2,2	5,8	1,5	X	2,9	± 0,7
Corteza occipital	1,9	2,8	2,5	2,3	X	1,8	X	2,3	± 0,2
Corteza extra	1,4	2,1	2,6	1,8	X	1,1	X	1,8	± 0,3
Cuerpo amigdalino	1,5	1,9	X	2,1	2,0	1,8	2,2	1,9	± 0,1
Cuerpo estriado	2,4	1,6	1,6	1,3	1,5	1,8	2,6	1,8	± 0,2
Núcleo septal	1,6	1,4	2,0	1,6	X	2,0	2,2	1,8	± 0,1
Hipotálamo	1,2	2,4	2,7	1,7	1,9	1,5	2,7	2,0	± 0,2
Tálamo	1,2	1,3	1,8	1,3	2,1	0,9	3,1	1,7	± 0,3
Mesencéfalo	1,1	1,4	2,3	1,3	2,2	1,1	2,9	1,8	± 0,3
Hipocampo	1,1	1,3	0,6	1,3	X	1,1	X	1,1	± 0,1
Protuberancia	1,1	1,6	2,4	1,4	1,6	1,3	2,8	1,7	± 0,2
Médula	1,2	1,4	2,7	1,5	X	1,2	2,7	1,8	± 0,3
Cerebelo	1,3	1,7	2,5	1,8	2,9	1,2	X	1,9	± 0,3
Corte extra n.º 1	1,5	2,8	2,7	1,7	2,2	1,3	2,1	2,0	± 0,2
Corte extra n.º 2	1,6	3,6	2,2	1,4	1,8	1,2	2,7	2,1	± 0,3
Corte extra n.º 3	1,9	3,3	2,1	1,4	2,0	1,1	3,6	2,2	± 0,3
Corte extra n.º 4	1,9	3,1	2,5	1,4	2,6	1,1	4,3	2,4	± 0,4
Corte extra n.º 5	1,7	3,0	2,1	1,5	3,4	1,1	5,3	2,6	± 0,6

ES 2 759 226 T3

Corte extra n.º 6	1,9	2,4	2,2	1,6	3,9	1,3	5,3	2,6	± 0,5
Hipófisis	10,9	X	12,7	9,4	8,7	7,1	11,8	10,1	± 0,8
Quiasma óptico	5,9	5,2	8,4	3,9	4,7	2,9	4,6	5,1	± 0,7
Duramadre dorsal	14,8	31,7	30,7	31,0	29,5	18,2	37,4	27,6	± 3,0
Duramadre ventral	16,4	31,0	34,4	19,6	18,9	13,8	30,4	23,5	± 3,1
Duramadre espinal	52,3	45,9	54,8	37,6	X	53,4	39,5	47,2	± 3,0
Médula espinal cervical superior	1,4	2,3	2,7	1,8	2,1	1,7	2,0	2,0	± 0,2
Médula espinal cervical inferior	2,5	2,5	3,7	3,4	1,4	2,4	2,2	2,6	± 0,3
Médula espinal torácica	1,6	1,9	2,8	1,1	1,0	1,2	1,3	1,6	± 0,2
Médula espinal lumbar	2,8	1,8	2,5	2,0	1,3	1,3	3,1	2,1	± 0,3
Círculo de Willis y arteria basilar	16,8	23,8	X	14,2	15,7	9,9	28,4	18,1	± 2,8
Arteria carótida	21,7	33,8	37,2	37,5	37,4	43,9	20,6	33,2	± 3,3
Arteria renal (l)	98,8	129,2	76,5	94,4	129,3	139,0	X	111,2	± 10,1
Ganglios superficiales (2)	20,3	29,6	22,9	31,9	35,3	12,6	24,1	25,3	± 2,9
Ganglios cervicales (2)	32,5	39,6	78,7	43,4	83,9	65,5	94,9	62,6	± 9,2
Ganglios axilares (2)	103,2	31,9	75,4	18,6	37,9	14,1	18,6	42,8	± 12,8
Muestra de sangre	1.224,9	1.234,2	1.543,3	1.322,6	1.364,7	1.413,4	1.422,9	1.360,9	± 42,5
Músculo (D, deltoides)	39,06	19,5	24,6	13,3	13,0	10,7	13,4	19,1	± 3,8
Hígado (D, lóbulo superficial)	74,2	72,2	115,0	126,1	122,2	186,3	247,5	134,8	± 23,7
Riñón (l, punta)	347,7	313,9	287,3	459,1	397,7	441,0	238,9	355,1	± 30,8
Orina	32,9	174,5	187,3	41,1	68,3	122,8	21,1	92,6	± 26,0
Bazo (punta)	234,3	241,9	196,8	317,5	232,6	175,8	198,1	228,1	± 17,5
Corazón	57,7	42,1	87,5	53,5	44,2	35,6	122,1	63,2	± 11,7

Pulmón (D, lóbulo superior)	392,8	289,6	219,1	104,5	482,5	177,0	161,4	261,0	± 51,3
Tiroides	317,8	651,8	832,2	522,9	545,5	372,0	496,9	534,2	± 65,0
Esófago	24,8	41,3	28,0	42,8	24,4	20,5	15,1	28,1	± 3,9
Tráquea	14,6	29,2	17,9	39,2	13,4	59,0	24,2	28,2	± 6,2
CPM convencional de fármaco	7.378.277	7.493.218	7.635.815	7.367,61 1	7.809.027	6.770.035	7.683.717	7.448.243	± 128.561,8
CPM convencional de fármaco	7.962.330	7.709.707	6.369.627	-	6.846.596	6.401.005	7.249.509	7.089.796	± 272.233,7
CPM convencional de fármaco	7.947.735	8.077.594	-	-	6.447.049	6.626.261	7.855.283	7.390.784	± 351.624,3

X = valor aberrante eliminado del análisis

5 La concentración en sangre de IgG en el punto final de 30 min fue de 1.361 nM. Las concentraciones de IgG en los epitelios respiratorio y olfativo fueron bajas tal como se esperaba (43 nM y 41 nM, respectivamente). Se observó un gradiente rostro-caudal de IgG 10,5 nM a 6,3 nM en el nervio trigémino. Se observó un gradiente similar desde el bulbo olfativo hasta el núcleo olfativo anterior de IgG 3,4 nM a 1,9 nM. La concentración en corteza promedio de IgG después de administración I.V. fue de 2,6 nM. Las concentraciones de IgG en otras regiones del cerebro oscilaron desde un mínimo de 1,1 nM en el hipocampo hasta un máximo de 2,0 nM en el hipotálamo. La concentración promedio de IgG en el material cerebral extra muestreado fue de 2,3 nM, similar a la concentración en corteza promedio, y no se observó un gradiente de concentración. De manera similar, no se observó un gradiente de concentración en la médula espinal y la concentración promedio de IgG fue de 2,1 nM. La concentración promedio de IgG en la duramadre del cerebro fue de 25,6 nM en comparación con una concentración en la duramadre de la médula espinal de 47,2 nM. Otros tejidos muestreados del cráneo ventral, la hipófisis y el quiasma óptico, contenían IgG 10,1 nM y 5,1 nM, respectivamente.

15 Las concentraciones de IgG en los órganos periféricos oscilaron desde un mínimo de 19,1 nM en el músculo hasta un máximo de 355,1 en el riñón, conteniendo la orina 92,6 nM. Las concentraciones de IgG en las arterias basilar y carótida fueron considerablemente menores que en la arteria renal (18,1 y 33,2 nM frente a 111,2 nM). La concentración promedio de IgG en los ganglios linfáticos muestreados fue de 43,6 nM.

20 *Ejemplo 3 - El efecto de la administración I.N. y I.V. sobre la integridad de IgG*

Se realizó un estudio para examinar si la IgG permanece intacta después de administración I.N. y I.V. Específicamente, se les administró a ratas IgG marcada con ¹²⁵I por vía intranasal o intravenosa y la IgG total intacta y degradada se determinó 30 min después de la administración.

25 Diseño experimental: se anestesiaron las ratas y se administró IgG tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Se tomaron muestras de sangre y cerebro y se detectó la IgG intacta.

30 Se tomaron muestras de sangre aproximadamente 30 min después de la administración intranasal antes de perfundir con al menos 100 ml de solución salina que contenía inhibidores de proteasa y se procesó el suero.

35 Se añadió cada muestra de sangre (1,0 ml) a un homogeneizador de vidrio/tejido que contenía 2,0 ml de tampón de homogeneización (H.B. (*homogenization buffer*), tampón Tris 10 mM, pH 8,0 que contenía inhibidores de proteasa) y aprotinina (100 µl por ml de sangre). Se homogeneizó la muestra manualmente (30 pasadas) y luego se transfirió a un tubo cónico pesado previamente (15 ml) y se almacenó en hielo. Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado para el recuento en contador gamma.

40 Se centrifugó la muestra a 1.000 x g (3.160 rpm) durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante de sangre en un tubo de ultracentrifuga pesado previamente y se almacenó en hielo. Se repitió el procedimiento de extracción con el sedimento de sangre una segunda vez (es decir, se añadió el mismo volumen de tampón de homogeneización al tubo de ensayo cónico que contenía el sedimento, se invirtió varias veces para desplazar el sedimento, se transfirió al homogeneizador de vidrio, se homogeneizó con 15 pasadas, se transfirió al mismo tubo de ensayo cónico pesado previamente, se centrifugó y se retiró el sobrenadante de sangre). Todo el sobrenadante de sangre se agrupó y almacenó en el mismo tubo cónico pesado previamente. Se repitió el procedimiento de extracción con el sedimento de sangre por tercera vez. Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado de sobrenadante de sangre agrupado para el recuento en contador gamma.

5 Se sometieron a ultracentrifugación 2 ml de sobrenadante de sangre agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 minutos a 4°C en un tubo de filtro de 100 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que los animales que siguieron, se centrifugó sólo 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado. Al mismo tiempo, se sometieron a ultracentrifugación 2 ml del sobrenadante de sangre agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 min a 4°C en un tubo de filtro de 30 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que para los animales que siguieron, sólo se centrifugó 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado.

10 Y se sometieron a ultracentrifugación 2 ml de sobrenadante de sangre agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 minutos a 4°C en un tubo de filtro de 10 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que para los animales que siguieron sólo se centrifugó 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado. Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado para recuento en contador gamma del filtrado (tubo de filtro de 100 kDa), el material retenido (tubo de filtro de 100 kDa), el filtrado (tubo de filtro de 30 kDa), el material retenido (tubo de filtro de 30 kDa), el filtrado (tubo de filtro de 10 kDa) para recuento en contador gamma, el material retenido (tubo de filtro de 10 kDa) para recuento en contador gamma.

20 Se extirpó cada cerebro (en hielo), se pesó y se colocó en un homogeneizador de tejido de vidrio. Se homogeneizó el cerebro manualmente (40-50 pasadas) con tampón de homogeneización a una dilución 1:3 (es decir, 2 ml de tampón por g de cerebro húmedo) y se transfirió el homogeneizado a un tubo cónico pesado previamente (15 ml) y se almacenó en hielo. Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado de homogeneizado de cerebro para recuento en contador gamma. Se centrifugó la muestra a 1.000 x g (3.160 rpm) durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante de cerebro en un tubo de ultracentrífuga pesado previamente y se almacenó en hielo.

25 Se repitió el procedimiento de extracción por segunda vez con el sedimento (es decir, se añadió el mismo volumen de tampón de homogeneización al tubo de ensayo cónico que contenía el sedimento, se invirtió varias veces para desplazar el sedimento, se transfirió al homogeneizador de vidrio, se homogeneizó con 20-30 pasadas, se transfirió al mismo tubo de ensayo cónico pesado previamente, se centrifugó y se retiró el sobrenadante). Todo el sobrenadante de cerebro se agrupó y almacenó en el mismo tubo cónico pesado previamente. Se repitió el procedimiento de extracción por tercera vez con los sedimentos. Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado de sobrenadante de cerebro agrupado para el recuento en contador gamma.

35 Se sometieron a ultracentrifugación 2 ml de sobrenadante de cerebro agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 minutos a 4°C en un tubo de filtro de 100 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que para los animales que siguieron sólo se centrifugó 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado. Al mismo tiempo, se sometieron a ultracentrifugación 2 ml del sobrenadante de cerebro agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 minutos a 4°C en un tubo de filtro de 30 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que para los animales que siguieron sólo se centrifugó 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado. Y se sometieron a ultracentrifugación 2 ml del sobrenadante de cerebro agrupado a 5.000 x g (7.071 rpm) durante 90 minutos a 4°C en un tubo de filtro de 10 kDa. Después de las dos primeras ratas, se encontró que llevó mucho tiempo filtrar los 2 ml, así que para los animales que siguieron sólo se centrifugó 1 ml del sobrenadante de sangre agrupado.

45 Se retiraron muestras de 25 µl por triplicado para recuento en contador gamma del filtrado (tubo de filtro de 100 kDa), el material retenido (tubo de filtro de 100 kDa), el filtrado (tubo de filtro de 30 kDa), el material retenido (tubo de filtro de 30 kDa), el filtrado (tubo de filtro de 10 kDa) para recuento en contador gamma, el material retenido (tubo de filtro de 10 kDa) para recuento en contador gamma.

50 Resultados: Dos ratas recibieron preparación líquida de IgG I.V. y dos ratas recibieron preparación líquida de IgG I.N. a una dosis promedio de 52 µl que contenían 56 µCi (diluido en solución salina hasta un volumen total de 500 µl para inyección I.V.) con un punto final de 30 min. Los animales toleraron bien la administración y todos sobrevivieron hasta el punto final deseado de 30 min.

55 En el cerebro, aproximadamente el 80% de los recuentos en contador gamma de IgG marcada con ¹²⁵I después de administración I.N. y I.V. fue mayor de 100 kD, lo que sugiere proteína intacta. En la sangre, el 100% de recuentos en contador gamma de IgG marcada con ¹²⁵I después de administración I.V. fue mayor de 100 kD, lo que sugiere que toda estaba intacta. Con la administración I.N., sólo el 33% de los recuentos en contador gamma de IgG marcada con ¹²⁵I hallada en sangre fue mayor de 100 kD, lo que sugiere que la IgG marcada con ¹²⁵I puede descomponerse y entrar en la sangre como parte del proceso de eliminación de la cavidad nasal, el cerebro o ambos. Esto también proporciona evidencias adicionales de que la IgG que entra en el SNC después de administración I.N. no se desplaza desde la cavidad nasal a la sangre y al cerebro, sino más bien a lo largo de rutas directas que involucran los nervios olfativo y trigémino. Se presenta un resumen de la integridad de la IgG en el cerebro y la sangre después de administración intranasal o intravenosa en la tabla 14.

Tabla 14. Resumen de la integridad de IgG en el cerebro y la sangre.

SANGRE	I.N.			I.V.		
	R1	R3	Promedio	R2	R4	Promedio
% mayor de 100 kD	30	36	33	123	113	118
% mayor de 30 kD	34	34	34	123	110	116
% mayor de 10 kD	67	57	62	99	108	104
CEREBRO	R1	R3	Promedio	R2	R4	Promedio
% mayor de 100 kD	93	70	81	78	77	77
% mayor de 30 kD	87	78	82	83	84	83
% mayor de 10 kD	88	78	83	88	93	91

Ejemplo 4 - Efecto de la administración intranasal de IgG sobre las cargas de placas de amiloide

- 5 Se realizó un estudio para examinar si la administración intranasal de IgG disminuye las cargas de placas de amiloide en el cerebro *in vivo*. El propósito del estudio fue determinar si el tratamiento prolongado con IgG administrada por vía intranasal a dos dosis (0,4 g/kg/2 semanas y 0,8 g/kg/2 semanas) tendría algún efecto sobre la carga de placas de amiloide en un modelo de ratón con amiloide transgénico de enfermedad de Alzheimer.
- 10 Diseño experimental: se usó el modelo de ratón con amiloide TG2576 ("TG") en este estudio como modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer y se usaron ratones C57 como controles. Los ratones TG2576 (n.º de cat. 1349-RD1-M) se adquirieron de Taconic, Inc. en dos lotes de 50 espaciados con un mes de diferencia (lote 1 y lote 2). Los animales se alojaron individualmente con libre acceso a alimentos y agua, y se mantuvieron en un ciclo de luz de 12 horas. Para la dosificación con el fármaco en un esquema de dosificación de mg/kg, se dividieron los ratones en tres clases de tamaño dentro de cada grupo de tratamiento, pequeño, medio y grande. Se hizo que los grupos de tamaño incluyesen 1/3 de animales en cada grupo de tamaño. Volvieron a evaluarse los ratones para formar nuevos grupos de tamaño cada dos semanas. Se dividieron los ratones en cinco grupos de tratamiento de 20 ratones tal como se describe en la tabla 15.
- 15
- 20 Tabla 15. Grupos de tratamiento asignados para la administración intranasal de IgG.

Cepa de ratón	Administración de fármaco	Descripción
Tg2576	IgG I.N. 0,4 g/kg/2 semanas	"TG-High"
Tg2576	IgG I.N. 0,8 g/kg/2 semanas	"TG-Low"
Tg2576	solución salina I.N. (control)	"TG-Saline"
C57	IgG I.N. 0,8 g/kg/2 semanas	"WT-High"
C57	solución salina I.N. (control)	"WT-Saline"

- 25 Se pidieron los ratones y se recibieron en la instalación para animales a los 2 meses de edad y se alojaron individualmente y se dejaron envejecer durante 6 meses. A los 8 meses de edad, se aclimataron los ratones a la manipulación para la administración intranasal despiertos en el transcurso de 1 mes. Se trataron los ratones por vía intranasal con IgG o solución salina tres veces/semana durante 7 meses. A los 16 meses de edad, se realizaron pruebas conductuales durante 5 semanas mientras se continuó con el tratamiento intranasal. A los 17 meses de edad, se sacrificaron 12 ratones/grupo y se recogió tejido cerebral para su análisis.
- 30 Se prepararon la IgG y la solución salina para la administración I.N. los viernes por la tarde a partir de las existencias enviadas por Baxter y se almacenaron a ~4°C para su uso la semana siguiente. Se produjeron disoluciones para administrar una dosis de 0,4 mg/kg/2 semanas de IgG o 0,8 mg/kg/2 semanas de IgG, y se produjeron para administrar un total de 24 µl. También se produjo fármaco para atender a cada una de las tres clases de tamaño dentro de un grupo de tratamiento.
- 35 Se aclimataron los ratones a la manipulación durante un periodo de dos a cuatro semanas antes del inicio de la dosificación intranasal. La aclimatación a la manipulación fue importante, ya que ayudó a asegurar una posición corporal correcta para una máxima eficacia de la administración de fármacos intranasales despiertos. Además, los ratones que no se han acostumbrado adecuadamente a este proceso pueden tener una reacción de ansiedad intensa después de la dosificación. Los ratones pasaron de 1 a 3 días en cada una de las nueve etapas antes de avanzar a la siguiente, dependiendo de la comodidad del animal en la manipulación. El nivel de estrés del ratón se usó como medida de progreso. Esto significa monitorizar los movimientos del ratón, la cantidad/frecuencia de micción, defecación, temblor y mordeduras. Si un ratón tuvo una moviéndose de alto estrés, permaneció en ese paso antes de
- 40

avanzar al siguiente hasta que se reduzca la respuesta. Puede verse un programa de aclimatación de muestra en la tabla 16. La aclimatación de los ratones progresó a través de los siguientes pasos una vez al día. Las etapas no se realizaron más de una vez al día para minimizar la ansiedad en los ratones.

- 5 En primer lugar, se colocó el ratón en la palma de la mano durante un periodo de dos a tres minutos, no más de un pie por encima de la parte superior de la jaula, ya que los animales saltaron con frecuencia durante esta etapa introductoria. Si el ratón intentaba salir arrastrándose de la mano y subir por el brazo, se levantaba el ratón por la base de la cola y se volvía a colocar en la mano. En segundo lugar, el ratón se colocó en la palma de la mano durante tres minutos y se acarició suavemente. El ratón se acarició direccionalmente de la cabeza a la cola, mientras se permitía que el animal se moviera libremente. En tercer lugar, el ratón se colocó en la palma de la mano durante tres minutos mientras se masajeara detrás de las orejas (pellizcando ligeramente de forma conjunta la piel en la parte posterior del cuello con el pulgar y el dedo índice). En cuarto lugar, el ratón fue sostenido/levantado por el pescuezo durante 30 segundos, dejando que el ratón descansara sobre la parte superior de la jaula durante 30 segundos antes de repetir la retención de nuevo. En quinto lugar, el ratón se sostuvo usando el agarre intranasal, sin invertir el animal, durante un periodo de 30 segundos y luego se soltó de nuevo en la parte superior de la jaula. Esto se repitió por segunda vez después de un periodo de descanso de un minuto. En sexto lugar, el ratón se sostuvo con el agarre intranasal mientras se invertía el animal de modo que su lado ventral quedara orientado hacia arriba, hacia el techo con el cuello del animal paralelo al suelo. Esta posición se mantuvo durante 30 segundos y luego se repitió una segunda vez después de un periodo de descanso de un minuto. Si el ratón se soltaba del agarre, se volvió a colocar en la parte superior de la jaula y se volvió a agarrar. Si el nivel de estrés del ratón aumentaba demasiado, el ratón se devolvía a la jaula. En séptimo lugar, el ratón se sostuvo con el agarre intranasal, se invirtió y se colocó brevemente un pipeteador con una punta vacía sobre cada orificio nasal durante 30 segundos. Esta etapa se repitió después de un periodo de descanso de un minuto. En octavo lugar, el ratón se sostuvo con el agarre intranasal, se invirtió y se les administraron por vía intranasal 6 µl de solución salina en las narinas izquierda y derecha. En noveno lugar, el ratón se sostuvo con el agarre intranasal, se invirtió y se les administraron por vía intranasal 6 µl de solución salina en las narinas izquierda y derecha colocando dos veces el animal de vuelta a la parte superior de la jaula.

Tabla 16. Ejemplo de cronograma para la aclimatación para la administración de fármacos I.N. despiertos

N.º de día	Día	Acción
1	L	Sostener durante ~2-3 min
2	M	Sostener durante ~2-3 min
3	X	Sostener y acariciar ~2-3 min
4	J	Sostener y acariciar ~2-3 min
5	V	Pellizcar ligeramente/sostener por el pescuezo
6	L	Ligeramente pulgadas/ sostener por el pescuezo
7	M	Sostener por el pescuezo y levantar
8	X	Sostener por el pescuezo y levantar
9	J	Agarre intranasal
10	V	Agarre intranasal
11	L	Agarre intranasal (I.N.) e inversión
12	M	Agarre intranasal (I.N.) e inversión
13	X	Agarre I.N., inversión, punta de pipeta vacía
14	J	Agarre I.N., inversión, punta de pipeta vacía
15	V	Agarre I.N., inversión, administración de 1 tanda de solución salina a cada narina
16	L	Agarre I.N., inversión, administración de 1 tanda de solución salina a cada narina
17	M	Agarre I.N., inversión, administración de 2 tandas de solución salina a cada narina
18	X	Agarre I.N., inversión, administración de 2 tandas de solución salina a cada narina

- 30 Para la administración intranasal del fármaco despierto, el agarre intranasal, cada ratón se sujetó dos veces y se sostuvo con su cuello paralelo al suelo mientras se administraba un volumen de 24 µl de líquido. Específicamente, se agarraron ratones no anestesiados por el pescuezo y se sostuvieron suavemente, pero de manera firme, en una posición invertida para que el ratón no pudiera moverse. A cada ratón se le administraron cuatro gotas nasales de 6 µl (narinas alternas) usando un pipeteador de 20 µl. La administración intranasal de fármacos comenzó cuando los ratones tenían 9 meses de edad.

A los 16 meses de edad, se sometieron los ratones a una batería de cinco semanas de pruebas conductuales para evaluar cambios en la memoria, sensitivomotores y ansiolíticos. Estas incluyeron pruebas con plataforma oculta y visible del laberinto de agua de Morris (memoria de referencia, capacidad visual), laberinto de agua de brazos radiales (memoria de trabajo), tarea de evitación pasiva (memoria), laberinto de Barnes (memoria), prueba de campo abierto (conducta exploratoria), laberinto en cruz elevado (ansiedad) y varilla rotatoria (*rotarod*, habilidades motoras).

Después de la conducta, se sacrificaron 12 ratones de cada grupo de tratamiento y se extirparon sus cerebros para análisis bioquímicos. Estos análisis incluyen inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) para detectar placas de amiloide, marcadores inflamatorios y amiloide soluble e insoluble.

Antes del sacrificio mediante perfusión transcardiaca, se anestesiaron los ratones con pentobarbital sódico (60 mg/kg diluido 1:4 con solución salina estéril). Se administró un primer refuerzo de la mitad de la dosis completa seguido de un refuerzo adicional de un cuarto de dosis, si fuera necesario. Se monitorizaron el nivel de anestesia y la sensibilidad al dolor cada cinco minutos en la totalidad del procedimiento mediante pruebas de reflejos, incluyendo pellizcar la pata trasera y la cola. Luego se sacrificaron los ratones con perfusión transcardiaca con 15 ml de solución salina enfriada con hielo (no se necesita inhibidor de proteasas) y se extrajo sangre del corazón. En resumen, se pegaron con cinta adhesiva las patas delanteras del ratón. Se cortó la piel para dejar al descubierto el esternón. Se usó una pinza hemostática para sostener el esternón, mientras que se usaron tijeras de disección romas para cortar en vertical a ambos lados del esternón realizando una incisión en forma de V para dejar al descubierto el corazón. Se extrajo sangre del corazón antes de la perfusión y se procesó para obtener suero. Se realizó un pequeño orificio en el ventrículo izquierdo usando una cánula de calibre 24. Se insertó la cánula en la aorta y se mantuvo en su lugar. Se unieron tubos de extensión (llenos con 5 ml de NaCl al 0,9%) a la cánula y se perfundió el animal manualmente con 15 ml de solución salina.

Se centrifugó la sangre y se dividió el suero en dos alícuotas. Una alícuota fue de 50 μ l y eventualmente se agrupará y se enviará para análisis de la salud general del grupo de tratamiento. El suero restante se colocó en su propio tubo y se congeló instantáneamente para otros análisis.

Se extirpó el cerebro y se sometió a hemisección sagitalmente en una matriz cerebral de ratón. La mitad izquierda del cerebro se diseccionó en bulbos olfativos, mezcla de corteza/hipocampo, tabique, mesencéfalo/diencéfalo, tronco encefálico (hasta la V de la médula espinal cervical superior) y cerebelo. Estos tejidos se colocaron en un tubo de microcentrifuga y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. La mitad derecha se dejó en la matriz y se cortó a 3 mm de la línea central. La parte interna hacia el centro del cerebro se fijó posteriormente en formalina (en un tubo cónico de 15 ml lleno con 10 ml de formalina) y se cortó para análisis mediante IHC. La parte externa se congeló en nitrógeno líquido para su eventual análisis de inflamación.

La sección sagital a 3 mm media de la mitad derecha del cerebro del ratón se fijó colocándolas en 20 ml de formalina al 10%. Estas muestras se fijaron durante varias horas a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C en un balancín de movimiento lento. Las secciones cerebrales sagitales fijadas se colocaron con el lado medio hacia abajo en casetes de patología etiquetados. El departamento de patología del Hospital de la Región llevó a cabo el procesamiento y la inclusión de parafina (deshidratar, infiltrar con parafina, preparar bloques de parafina). Los bloques de parafina se enmascararon mediante codificación/nuevo etiquetado.

Los bloques de parafina se seccionaron con un grosor de 5 μ m usando el microtomo Leica RM2235 y se recogieron en portaobjetos de microscopio Superfrost Plus (Cardinal Health, n.º de cat. M6146-PLUS). Se recogieron siete secciones por ratón, con al menos/aproximadamente 100 μ m de tejido retirado entre las colecciones de secciones de tejido (etiquetadas como 1-6 desde la parte media a lateral). Para aumentar la calidad de las secciones que iban a teñirse, se usó un microscopio de disección para identificar y retirar una de las siete secciones.

Los portaobjetos se desparafinaron e hidrataron. Específicamente, los portaobjetos se colocaron en un soporte de cubeta de tinción de vidrio para facilitar la transferencia entre placas de tinción. Se retiró la cera de parafina con lavados con xileno (limpieza) y luego se hidrató con etanol/agua. Específicamente, los portaobjetos se lavaron en xileno tres veces durante intervalos de cinco minutos, se lavaron en etanol al 100% dos veces durante intervalos de cinco minutos, se lavaron en etanol al 95% una vez durante cinco minutos, se enjuagaron en agua corriente durante cinco minutos y se enjuagaron en PBS durante cinco minutos.

Se usó recuperación de epítomos inducida por calor (HIER, por sus siglas en inglés) para pretratar los portaobjetos antes de la tinción de anticuerpos. Se usó un tampón Tris/EDTA (pH 9). Los portaobjetos se sumergieron en una placa a prueba de vaporizador que contenía la disolución de recuperación objetivo (Tris/EDTA pH 9) precalentada hasta 70°C. La placa con portaobjetos se colocó en el vaporizador y se incubó durante 30 min a 97°C. El vaporizador se apagó y se dejó enfriar hasta al menos 65°C. El contenedor de portaobjetos se retiró del vaporizador y se dejó enfriar durante otros 10-15 min. Luego, los portaobjetos se retiraron del contenedor y se enjuagaron en PBS durante 10 min en una cubeta Coplin.

Luego se bloquearon los sitios de unión inespecífica con disolución de bloqueo de suero normal (300 μ l/portaobjetos)

durante 1 hora en una cámara de humedad. Se incubaron secciones en una caja húmeda con anticuerpo primario contra amiloide (anticuerpo monoclonal anti-beta-amiloide purificado, 17-24 (4G8), de Covance (SIG-39220)) a una dilución 1:200 en tampón de dilución de anticuerpo primario (PBS 0,01 M pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron secciones en anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón, Alexa Fluor 647 (2 mg/ml) de Invitrogen (A21235), tampón de dilución (PBS 0,01 M, pH 7,2) con una concentración secundaria de 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Entonces se sometieron a contratinción los portaobjetos con DAPI. Se usó DAPI diluido 300 nM en PBS. Se diluyó 1 μ l de caldo DAPI 14,3 mM en 48 ml de PBS, se agitó en vórtex y se mezcló meticulosamente. La disolución de DAPI se vertió en una cubeta Coplin que contenía los portaobjetos. Se incubaron los portaobjetos durante 20 min a TA. Los portaobjetos se enjuagaron rápidamente en PBS, luego 2 x 10 min en tampón de lavado, seguido de una incubación de 10 min en PBS.

Inmediatamente después de la tinción, los portaobjetos se deshidrataron, despejaron y prepararon. Específicamente, se incubaron los portaobjetos en etanol al 95% durante 5 min, etanol al 100% durante dos incrementos de cinco minutos, xileno durante tres incrementos de cinco minutos, y se prepararon con un cubreobjetos en DPX sin dejar que la muestra se secase. Los portaobjetos preparados se almacenaron a temperatura ambiente.

Se capturaron imágenes de las placas teñidas con fluorescencia con el microscopio AZ100 Multizoom con el accesorio confocal espectral C1si y un objetivo AZ Plan Apo 4X. La localización inicial y el enfoque del hipocampo y la corteza se realizaron a través de imágenes de epifluorescencia usando filtros para la tinción con DAPI. El microscopio se cambió a obtención de imágenes confocales usando el láser de 637 nm para la adquisición del amiloide marcado con IHF. El ajuste fino dentro del eje z para la detección óptima de la señal se confirmó con una resolución de 512 x 512 píxeles. Luego, se capturaron imágenes a 1024 x 1024 con el software Nikon EZ-C1 y los archivos de imagen sin procesar se guardaron en el formato de archivo ".ids" de Nikon. Se generaron archivos tiff correspondientes del canal de 637 nm usando Fiji (ImageJ). Los archivos tiff luego se convirtieron en imágenes de 8 bits (a partir de 16 bits) y el contraste se mejoró en el 0,5% a través del procesamiento por lotes (programación de macros) en Fiji (ImageJ).

Las placas se cuantificaron en regiones seleccionadas de interés en el hipocampo y la corteza determinando el número promedio de placas detectadas en cada región y determinando el porcentaje de área cubierta por placas dentro de cada región. El procesamiento y análisis de imágenes se realizó en Fiji. Las placas se definieron dentro de Fiji usando el análisis de partículas y la función de umbral para seleccionar un valor de píxel mínimo que definiera cada partícula identificada como calificada como placa. Estos valores se determinaron analizando múltiples controles positivos y negativos y verificando qué valores identificaban correctamente las placas en estos portaobjetos de control. La región de interés dentro de cada imagen la eligió un investigador desconocedor de la verdadera que recibió instrucciones de colocar la región de interés en la posición que maximizara la inclusión de placas. El tamaño (píxeles) y el número de placas identificadas se copiaron en Excel para el análisis de datos. Las placas se caracterizaron entonces por su tamaño relativo. Los tamaños de placa notificados en este estudio se refieren al radio calculado de una placa suponiendo que la partícula se adaptaba a la forma de un círculo perfecto. El número de placas y el porcentaje de área cubierta por placas calculados a partir de cada región de interés se usaron como un único punto de datos en la comparación de los grupos de tratamiento. Se usaron pruebas de la t bilaterales para evaluar la significación entre los grupos.

Antes de teñir el conjunto completo de secciones de tejido recogidas, se realizó una verificación inicial del análisis mediante tinción y microscopía con controles de tinción relevantes. Estos controles incluyeron, un control positivo usando secciones de uno de los ratones transgénicos que recibieron solución salina, controles negativos en los que se omitió la incubación de anticuerpos primarios o secundarios del procedimiento de tinción y un control negativo usando secciones de uno de los ratones de tipo natural que recibieron solución salina. Controles adicionales, incluyendo la titulación de anticuerpos primarios y secundarios y la comparación de diferentes métodos de recuperación de epítomos se han realizado previamente en este laboratorio usando estos anticuerpos y el mismo procedimiento experimental.

Se analizaron sobrenadantes de tejido usando kits de Life Technologies (anteriormente Invitrogen; Carlsbad, CA; n.^{os} de pieza KHB3482 (A β 40) y KHB3442 (A β 42)). En general, se determinaron en primer lugar las diluciones adecuadas con tres muestras de ratones o bien TG o bien WT, y luego se procesaron todas las muestras a esa dilución. Las muestras se cuantificaron usando una ecuación polinómica ajustada a una curva patrón. Las cantidades de AB medidas en los pocillos se corrigieron entonces para las diluciones y proteínas totales (según lo determinado mediante un ensayo de BCA).

Resultados: La medición inmunohistoquímica de placas de amiloide en cortes de tejido cerebral demostró que había un efecto farmacológico significativo. Ambos grupos de ratones TG a los que se les administró IgG por vía intranasal tuvieron cargas de placas disminuidas significativamente en la corteza (figuras 3A, 3B y 3E).

La administración nasal tanto de la dosis baja como de dosis alta de IgG redujo significativamente el porcentaje de área total cubierta por placas en la corteza de ratones TG2576 (figura 3A). El porcentaje de área cubierta por placas disminuyó en el 25,7% (dosis baja; p = 0,014) y el 24,3% (dosis alta; p = 0,037), respectivamente. El cambio en el

porcentaje de área cubierta por placas fue ligeramente más pronunciado en el 27,1% para la dosis baja y el 26,0% para la dosis alta cuando el umbral mínimo para definir una placa se aumentó de un radio de 25 μm a 50 μm (valores de p de 0,01 y 0,026, respectivamente). La disminución de la carga de placas también fue significativa cuando el umbral mínimo se estableció en 100 μm (valores de p de 0,035 y 0,021, respectivamente). Un cambio en el porcentaje de área cubierta por placas no fue evidente cuando se usaron exclusivamente las placas más pequeñas (menos de 50 μm de radio) en el análisis. Por tanto, la reducción de placas en la corteza parecen ser placas más pronunciadas de más de 50 μm .

El número de placas en la corteza de los grupos de tratamiento con IgG a dosis baja y dosis alta mostró una tendencia hacia una disminución del número de placas detectadas (figura 3B). Esta disminución alcanzó significación en el grupo de tratamiento con IgG a dosis baja cuando las placas pequeñas (menos de 50 μm de radio) no se incluyeron en el análisis. Específicamente, el tratamiento con IgG administrada por vía intranasal proporcionó una reducción significativa de la carga de placas cuando se analizaron los datos mediante la inclusión de placas que tenían un radio de 50 μm a 100 μm , mayor de 100 μm y mayor de 50 μm . La disminución de la carga de placas alcanzó significación para el grupo de tratamiento con IgG a dosis alta cuando el radio de las placas analizadas se estableció en más de 100 μm .

A diferencia de los resultados observados en la corteza cerebral, los tratamientos con IgG no dieron como resultado un cambio significativo ni en el porcentaje de área cubierta por placas ni en el número de placas detectadas en el hipocampo (figuras 3C y 3D). Aunque la administración intranasal de IgG a dosis baja y dosis alta pareció dar como resultado una carga de placas ligeramente reducida en el hipocampo, la reducción fue mínima y no alcanzó significación en esta región del cerebro.

La tinción inmunofluorescente de placas de amiloide en el hipocampo y la corteza de ratones TG de edad avanzada se representa en la figura 3E. Tal como se muestra, hay una disminución de la tinción de las placas de amiloide en el hipocampo y la corteza en ratones que se trataron con IgG a dosis baja y dosis alta en comparación con los ratones TG tratados con solución salina.

Ejemplo 5 - Efecto de IgG administrada por vía intranasal sobre AB40 y AB42 solubles e insolubles

Se realizó un estudio para evaluar la eficacia de la administración intranasal (I.N.) prolongada de IgG a dos dosis en un modelo de ratón con amiloide transgénico. Específicamente, se realizaron mediciones de los péptidos beta-amiloide solubles e insolubles A β 40 y A β 42 antes y tras la administración de IgG intranasal a (modelo de ratón con amiloide) de tipo natural y Tg2576. El propósito del estudio fue determinar si el tratamiento prolongado con IgG administrada por vía intranasal a dos dosis (0,4 g/kg/2 semanas y 0,8 g/kg/2 semanas) tendría algún efecto sobre la carga de placas de amiloide en un modelo de ratón con amiloide transgénico de enfermedad de Alzheimer.

Diseño experimental: Tal como se describe en el ejemplo 4, se usó el modelo de ratón con amiloide TG2576 ("TG") en este estudio como modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer y se usaron ratones C57 como controles. La manipulación de los ratones, la preparación del fármaco y la administración del fármaco se realizaron tal como se describió anteriormente en el ejemplo 4.

Se dividieron los ratones en cinco grupos de tratamiento de 20 ratones tal como se describe en la tabla 15. Aproximadamente a los 17 meses de edad y a los 12 meses de tratamiento, se sacrificaron 12 ratones de cada grupo de tratamiento y se midió la concentración de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en los cerebros de los ratones TG y de control mediante ELISA para determinar si podían detectarse cambios de las concentraciones de placas de amiloide.

Se midieron A β 40 y A β 42 mediante ELISA usando kits de ELISA de Invitrogen. Los kits de ELISA se guardaron en la nevera hasta que estuvieron listos para su uso. Los kits se sacaron de la nevera y se permitió que se calentasen hasta temperatura ambiente antes de su uso.

Los patrones y las muestras se ejecutaron por duplicado. Las muestras y los patrones se ejecutaron en un cóctel de inhibidores de proteasas con AEBSF 1 mM (un inhibidor de serina proteasa). El AEBSF fue importante porque las serina proteasas pueden degradar rápidamente los péptidos A β . Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que estuvieron listas para aplicarse a la placa de ELISA.

La matriz de muestra tiene un impacto drástico sobre la recuperación de A β . Para garantizar una cuantificación precisa, se generaron las curvas patrón en el mismo diluyente que las muestras. Se preparó un tampón de reconstitución de patrón disolviendo 2,31 gramos de bicarbonato de sodio en 500 ml de agua desionizada y se ajustó el pH usando hidróxido de sodio 2 N hasta que el pH fue de 9,0.

Se prepararon los patrones para una curva patrón cuantitativa. Se usó el patrón de Hu A β 42. El patrón de Hu A β 42 se permitió que se equilibrase a temperatura ambiente (TA) y luego se reconstituyó a 100 ng/ml con tampón de reconstitución de patrón (bicarbonato de sodio 55 mM, pH 9,0). Se agitó la mezcla de patrón y se mezcló suavemente

y se dejó asentar durante 10 minutos para asegurar la reconstitución completa. Se agitó en vórtex el patrón brevemente antes de preparar la curva patrón. La generación de la curva patrón usando el patrón de péptido A β se realizó usando la misma composición de tampones usada para las muestras experimentales diluidas. Se añadieron 0,1 ml del patrón reconstituido a un tubo que contenía 0,9 ml del tampón de diluyente de patrón y se etiquetaron como Hu A β 40 10.000 pg/ml. Se mezcló el patrón y luego se añadieron 0,1 ml del patrón 10.000 pg/ml a un tubo que contenía 1,9 ml de tampón de diluyente de patrón y se marcó como mezcla de Hu A β 40 500 pg/ml. Se mezcló el patrón y luego se añadieron 0,15 ml de tampón diluyente de patrón a cada uno de los 6 tubos etiquetados como Hu A β 40 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 y 0 pg/ml para realizar diluciones en serie del patrón.

Las muestras se prepararon entonces para la placa. Específicamente, se retiraron las muestras del congelador, se permitió que se descongelasen y se diluyeron hasta la dilución deseada usando el tampón de dilución proporcionado con el kit mezclado con una pastilla de inhibidores de proteasas. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se cargaron en los pocillos de la placa.

Las placas se etiquetaron como o bien AB40 o bien AB42 con un rotulador Sharpie. Se añadieron 50 μ l de patrones y muestra a los pocillos etiquetados previamente. Se añadieron a cada pocillo 50 μ l de disolución de anticuerpo de detección de Hu A β 40 o A β 42 proporcionada con el kit. La placa se cubrió y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación. Poco antes de que expiraran las 3 horas, se preparó la disolución de trabajo de IgG anti-conejo-HRP. Para ello, se diluyeron 10 μ l de disolución concentrada de IgG anti-conejo-HRP (100X) en 1 ml de diluyente de HRP por cada tira de 8 pocillos usada en el ensayo y se etiquetaron como disolución de trabajo de IgG anti-conejo-HRP.

Se decantó meticulosamente la disolución de los pocillos y se lavaron los pocillos 5 veces con 300 μ l de disolución de lavado. Se golpearon con fuerza las placas sobre la mesa de laboratorio para asegurarse de que estuviera seco. Se añadieron 100 μ l de la disolución de trabajo IgG anti-conejo-HRP a cada pocillo. Se cubrió la placa y se permitió que se asentara a temperatura ambiente durante 30 min. Se decantó meticulosamente la disolución de los pocillos y se lavaron los pocillos 5 veces con 300 μ l de disolución de lavado. Se golpearon con fuerza las placas sobre la mesa de laboratorio para asegurarse de que estuviera seco. Se añadieron 100 μ l de cromógeno estabilizado a cada pocillo y se colocó la placa inmediatamente en la oscuridad y se permitió que se asentara durante 20 min. Se añadieron 100 μ l de disolución de parada a cada pocillo y se golpearon suavemente los lados de la placa para mezclar.

Se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm después de haber hecho un blanco del lector de placas dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la disolución de parada. Las concentraciones se determinaron usando la curva patrón.

Resultados: Las placas de ELISA para A β 40 y A β 42 adquiridas de Invitrogen produjeron curvas patrón consistentes. Las mejores diluciones de sobrenadante de cerebro para muestras de A β 40 y A β 42 solubles, y A β 40 y A β 42 insolubles fueron 10x, sin diluir, 10000x y 2500x, respectivamente. Las concentraciones en cerebro de cada proteína se analizaron determinando en primer lugar la concentración de la muestra en el pocillo en la placa de ELISA basándose en la curva patrón. Estos valores se corrigieron para la dilución del sobrenadante, la dilución del proceso de extracción, y luego se les proporcionó un factor de corrección de un análisis de BCA de la proteína total extraída. Para cada proteína, se excluyeron entre 1 y 4 muestras por ser valores aberrantes estadísticos o por ser demasiado altas/bajas como para ajustarse a la curva patrón. Se presenta un resumen de las concentraciones de A β 40 soluble e insoluble en la tabla 17 y la tabla 18. Un resumen de las concentraciones de A β 42 soluble e insoluble se presenta en la tabla 19 y la tabla 20. Las razones de A β 40/A β 42 soluble se proporcionan en la tabla 21 y las razones de A β 40/A β 42 insoluble se proporcionan en la tabla 22.

Tabla 17. A β 40 soluble detectado en el cerebro.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)
1	TG-Low	1-Oct	9078	33	TG-Saline	1-Oct	3940
6	TG-Low	1-Oct	3964	38	TG-Saline	1-Oct	1328
11	TG-Low	1-Oct	3110	43	TG-Saline	1-Oct	1983
16	TG-Low	1-Oct	2788	48	TG-Saline	1-Oct	3656

ES 2 759 226 T3

21	TG-Low	1-Oct	3934	53	TG-Saline	1-Oct	6650
26	TG-Low	1-Oct	3747	58	TG-Saline	1-Oct	6159
31	TG-Low	1-Oct	3796	4	WT-High	9-Oct	0
36	TG-Low	1-Oct	5450	9	WT-High	9-Oct	0
41	TG-Low	27-Sep	5261	14	WT-High	9-Oct	0
46	TG-Low	1-Oct	2082	19	WT-High	9-Oct	0
51	TG-Low	1-Oct	2520	24	WT-High	9-Oct	0
56	TG-Low	1-Oct	9448	29	WT-High	9-Oct	0
2	TG-High	1-Oct	3061	34	WT-High	9-Oct	0
7	TG-High	1-Oct	1814	39	WT-High	9-Oct	0
12	TG-High	1-Oct	4681	44	WT-High	9-Oct	0
17	TG-High	1-Oct	2509	49	WT-High	9-Oct	0
22	TG-High	1-Oct	7869	54	WT-High	9-Oct	0
27	TG-High	1-Oct	6363	59	WT-High	9-Oct	0
32	TG-High	1-Oct	5541	5	WT-Saline	9-Oct	0
37	TG-High	27-Sep	5190	10	WT-Saline	9-Oct	0
42	TG-High	1-Oct	3609	15	WT-Saline	9-Oct	0
47	TG-High	1-Oct	1122	20	WT-Saline	9-Oct	0
52	TG-High	1-Oct	12163	25	WT-Saline	9-Oct	0
57	TG-High	1-Oct	1502	30	WT-Saline	9-Oct	0
3	TG-Saline	27-Sep	3708	35	WT-Saline	9-Oct	0
8	TG-Saline	1-Oct	4833	40	WT-Saline	9-Oct	0
13	TG-Saline	1-Oct	1673	45	WT-Saline	9-Oct	0
18	TG-Saline	1-Oct	4039	50	WT-Saline	9-Oct	0
23	TG-Saline	1-Oct	2373	55	WT-Saline	9-Oct	0
28	TG-Saline	1-Oct	4133	60	WT-Saline	9-Oct	0
	Promedio	Desviación estándar	Error estándar				
TG-Low	4598.418	2395.218	691.4399				
TG-High	3932.644	1782.644	630.2598				
TG-Saline	3706.334	1570.737	473.595				
WT-High	0	0	0				
WT-Saline	0	0	0				

Tabla 18. A β 40 insoluble detectado en el cerebro.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	Concentración (ug/ml)	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	Concentración (ug/ml)
1	TG-Low	8-Oct	10257199	10,26	33	TG-Saline	8-Oct	25512730	25,51
6	TG-Low	8-Oct	11697779	11,70	38	TG-Saline	8-Oct	19414980	19,41
11	TG-Low	8-Oct	7575663	7,58	43	TG-Saline	8-Oct	26032547	26,03
16	TG-Low	8-Oct	8322854	8,32	48	TG-Saline	8-Oct	39277004	39,28
21	TG-Low	8-Oct	28084221	28,08	53	TG-Saline	8-Oct	19280789	19,28
26	TG-Low	8-Oct	22248049	22,25	58	TG-Saline	8-Oct	39064072	39,06
31	TG-Low	8-Oct	14817934	14,82	4	WT-High	18-Oct	79052	0,07905
36	TG-Low	8-Oct	25661660	25,66	9	WT-High	18-Oct	48296	0,04830
41	TG-Low	3-Oct	25537069	25,54	14	WT-High	18-Oct	48256	0,04826
46	TG-Low	8-Oct	9547715	9,55	19	WT-High	18-Oct	9511	0,00951
51	TG-Low	8-Oct	5688511	5,69	24	WT-High	18-Oct	249003	0,24900
56	TG-Low	8-Oct	9606698	9,61	29	WT-High	18-Oct	31520	0,03152
2	TG-High	8-Oct	4410637	4,41	34	WT-High	18-Oct	39666	0,03967
7	TG-High	8-Oct	15713013	15,71	39	WT-High	18-Oct	25225	0,02522
12	TG-High	8-Oct	18125865	18,13	44	WT-High	18-Oct	134629	0,13463
17	TG-High	8-Oct	4945207	4,95	54	WT-High	18-Oct	15163	0,01516
22	TG-High	8-Oct	33296598	33,30	59	WT-High	18-Oct	23228	0,02323
27	TG-High	8-Oct	68491264	68,49	5	WT-Saline	18-Oct	3764	0,00376
32	TG-High	8-Oct	50062749	50,06	10	WT-Saline	18-Oct		
37	TG-High	3-Oct	36070736	36,07	15	WT-Saline	18-Oct	10815	0,01081
42	TG-High	8-Oct	26864520	26,86	20	WT-Saline	18-Oct	38643	0,03864
47	TG-High	8-Oct	3774286	3,77	25	WT-Saline	18-Oct		
52	TG-High	8-Oct	42493407	42,49	30	WT-Saline	18-Oct	4356	0,00436
57	TG-High	8-Oct	8907543	8,91	35	WT-Saline	18-Oct		
3	TG-Saline	3-Oct	13934212	13,93	40	WT-Saline	18-Oct	5701	0,00570
8	TG-Saline	8-Oct	28128069	28,13	45	WT-Saline	18-Oct	14256	0,01426
13	TG-Saline	8-Oct	18908021	18,91	50	WT-Saline	18-Oct	2986	0,00299
18	TG-Saline	8-Oct	18777770	18,78	55	WT-Saline	18-Oct	3072	0,00307
28	TG-Saline	8-Oct	20470065	20,47	60	WT-	18-Oct	3008	0,00301

ES 2 759 226 T3

						Saline		
--	--	--	--	--	--	--------	--	--

	Promedio	Desviación estándar	Error estándar
TG-Low	14,92045	8,129698	2,346842
TG-High	24,60567	20,93301	6,31154
TG-Saline	24,43639	8,31837	2,401306
WT-High	0,063959	0,070783	0,021342
WT-Saline	0,009622	0,011582	0,003861

Tabla 19. Aβ42 soluble detectado en cerebro.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)
1	TG-Low	1-Oct	1455	33	TG-Saline	2-Oct	626
6	TG-Low	2-Oct	551	38	TG-Saline	2-Oct	393
11	TG-Low	2-Oct	511	43	TG-Saline	2-Oct	562
16	TG-Low	2-Oct	744	48	TG-Saline	2-Oct	432
21	TG-Low	2-Oct	705	53	TG-Saline	1-Oct	1295
26	TG-Low	2-Oct	623	58	TG-Saline	1-Oct	1361
31	TG-Low	2-Oct	463	4	WT-High	9-Oct	0
36	TG-Low	2-Oct	609	9	WT-High	9-Oct	0
41	TG-Low	27-Sep	1564	14	WT-High	9-Oct	0
46	TG-Low	2-Oct	606	19	WT-High	9-Oct	0
51	TG-Low	1-Oct	825	24	WT-High	9-Oct	0
56	TG-Low	1-Oct	1526	29	WT-High	9-Oct	0
2	TG-High	2-Oct	579	34	WT-High	9-Oct	0
7	TG-High	2-Oct	446	39	WT-High	9-Oct	0
12	TG-High	2-Oct	880	44	WT-High	9-Oct	0
17	TG-High	2-Oct	410	49	WT-High	9-Oct	0
22	TG-High	1-Oct	1198	54	WT-High	9-Oct	0
27	TG-High	2-Oct	851	59	WT-High	9-Oct	0

32	TG-High	2-Oct	877	5	WT-Saline	9-Oct	0
37	TG-High	27-Sep	1470	10	WT-Saline	9-Oct	0
42	TG-High	2-Oct	880	15	WT-Saline	9-Oct	0
47	TG-High	2-Oct	290	20	WT-Saline	9-Oct	0
52	TG-High	1-Oct	3050	25	WT-Saline	9-Oct	0
57	TG-High	2-Oct	385	30	WT-Saline	9-Oct	0
3	TG-Saline	27-Sep	791	35	WT-Saline	9-Oct	0
8	TG-Saline	2-Oct	990	40	WT-Saline	9-Oct	0
13	TG-Saline	2-Oct	562	45	WT-Saline	9-Oct	0
18	TG-Saline	2-Oct	733	50	WT-Saline	9-Oct	0
23	TG-Saline	2-Oct	521	55	WT-Saline	9-Oct	0
28	TG-Saline	2-Oct	737	60	WT-Saline	9-Oct	0

	Promedio	Desviación estándar	Error estándar
TG-Low	848.4637	414.464	119.6455
TG-High	751.4925	368.8014	111.1978
TG-Saline	750.1043	315.7884	91.16026
WT-High	0	0	0
WT-Saline	0	0	0

Tabla 20. Aβ42 insoluble detectado en el cerebro.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	Concentración (ug/ml)	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Fecha de medición	Concentración (pg/ml)	Concentración (ug/ml)
1	TG-Low	3-Oct	4493237	4,49	33	TG-Saline	3-Oct	3705386	3,71
6	TG-Low	3-Oct	7320913	7,32	38	TG-Saline	3-Oct	6032562	6,03
11	TG-Low	3-Oct	2641985	2,64	43	TG-Saline	3-Oct	6871640	6,87
16	TG-Low	3-Oct	1644845	1,64	48	TG-Saline	3-Oct	12292890	12,29
21	TG-Low	3-Oct	10670528	10,67	53	TG-Saline	3-Oct	6847851	6,85
26	TG-Low	3-Oct	2902253	2,90	58	TG-Saline	3-Oct	11978111	11,98
31	TG-	3-Oct	5435473	5,44	4	WT-	18-Oct	32757	0,0328

ES 2 759 226 T3

	Low					High			
36	TG-Low	3-Oct	5458033	5,46	9	WT-High	18-Oct	53457	0,0535
41	TG-Low	2-Oct	5807761	5,81	14	WT-High	18-Oct	38889	0,0389
46	TG-Low	3-Oct	2751646	2,75	19	WT-High	18-Oct	5910	0,0059
51	TG-Low	3-Oct	1474153	1,47	24	WT-High	18-Oct	76083	0,0761
56	TG-Low	3-Oct	6022267	6,02	29	WT-High	18-Oct	19765	0,0198
2	TG-High	3-Oct	1984182	1,98	34	WT-High	18-Oct	26479	0,0265
7	TG-High	3-Oct	2733892	2,73	39	WT-High	18-Oct	20134	0,0201
12	TG-High	3-Oct	10072470	10,07	44	WT-High	18-Oct	79499	0,0795
17	TG-High	3-Oct	1786008	1,79	54	WT-High	18-Oct	19179	0,0192
22	TG-High	3-Oct	7201686	7,20	59	WT-High	18-Oct	23360	0,0234
27	TG-High	3-Oct	11756896	11,76	5	WT-Saline	18-Oct	3891	0,0039
32	TG-High	3-Oct	7338861	7,34	10	WT-Saline	18-Oct	3916	0,0039
37	TG-High	2-Oct	10547976	10,55	15	WT-Saline	18-Oct	9542	0,0095
42	TG-High	3-Oct	6116270	6,12	20	WT-Saline	18-Oct	13878	0,0139
47	TG-High	3-Oct	954559	0,95	25	WT-Saline	18-Oct		
52	TG-High	3-Oct	14015195	14,02	30	WT-Saline	18-Oct	4040	0,0040
57	TG-High	3-Oct	1353498	1,35	35	WT-Saline	18-Oct		
3	TG-Saline	2-Oct	3362018	3,36	40	WT-Saline	18-Oct	4698	0,0047
8	TG-Saline	3-Oct	6261392	6,26	45	WT-Saline	18-Oct	15173	0,0152
13	TG-Saline	3-Oct	6056766	6,06	50	WT-Saline	18-Oct	2862	0,0029
18	TG-Saline	3-Oct	5685368	5,69	55	WT-Saline	18-Oct	3151	0,0032
28	TG-Saline	3-Oct	3122150	3,12	60	WT-Saline	18-Oct	3320	0,0033

	Promedio	Desviación estándar	Error estándar
TG-Low	4,718591	2,656887	0,766977
TG-High	5,622391	4,045875	1,219877

ES 2 759 226 T3

TG-Saline	6,565103	3,065648	0,884976
WT-High	0,035956	0,024034	0,007247
WT-Saline	0,006447	0,004669	0,001477

Tabla 21. Relaciones de A β 40/A β 42 solubles.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Razón AB42/AB40	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Razón AB42/AB40
1	TG-Low	0,160295	33	TG-Saline	0,1588125
6	TG-Low	0,13894	38	TG-Saline	0,2960768
11	TG-Low	0,164329	43	TG-Saline	0,2834986
16	TG-Low	0,266987	48	TG-Saline	0,1180902
21	TG-Low	0,179196	53	TG-Saline	0,19472
26	TG-Low	0,16629	58	TG-Saline	0,2209363
31	TG-Low	0,1219	4	WT-High	0
36	TG-Low	0,111683	9	WT-High	0
41	TG-Low	0,297232	14	WT-High	0
46	TG-Low	0,290904	19	WT-High	0
51	TG-Low	0,327174	24	WT-High	0
56	TG-Low	0,161546	29	WT-High	0
2	TG-High	0,189314	34	WT-High	0
7	TG-High	0,245964	39	WT-High	0
12	TG-High	0,188097	44	WT-High	0
17	TG-High	0,163459	49	WT-High	0
22	TG-High	0,152272	54	WT-High	0
27	TG-High	0,13377	59	WT-High	0
32	TG-High	0,158201	5	WT-Saline	0
37	TG-High	0,283163	10	WT-Saline	0
42	TG-High	0,243714	15	WT-Saline	0
47	TG-High	0,258574	20	WT-Saline	0
52	TG-High	0,250769	25	WT-Saline	0
57	TG-High	0,25651	30	WT-Saline	0
3	TG-Saline	0,2132	35	WT-Saline	0
8	TG-Saline	0,204815	40	WT-Saline	0
13	TG-Saline	0,335658	45	WT-Saline	0
18	TG-Saline	0,181432	50	WT-Saline	0
23	TG-Saline	0,219518	55	WT-Saline	0
28	TG-Saline	0,1783	60	WT-Saline	0
	Promedio	Desviación estándar	Error estándar		
TG-Low	0,198873	0,075008	0,0217		
TG-High	0,20664	0,05204	0,0157		
TG-Saline	0,217088	0,061325	0,0177		

ES 2 759 226 T3

WT-High	0	0	0
WT-Saline	0	0	0

Tabla 22. Relaciones de A β 40/A β 42 insolubles.

N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Razón AB42/AB40	N.º de pedido de bolsa de ratón	Grupo	Razón AB42/AB40
1	TG-Low	0,43806	33	TG-Saline	0,14524
6	TG-Low	0,62584	38	TG-Saline	0,31072
11	TG-Low	0,34875	43	TG-Saline	0,26396
16	TG-Low	0,19763	48	TG-Saline	0,31298
21	TG-Low	0,37995	53	TG-Saline	0,35516
26	TG-Low	0,13045	58	TG-Saline	0,30663
31	TG-Low	0,36682	4	WT-High	0,41437
36	TG-Low	0,21269	9	WT-High	1,10685
41	TG-Low	0,22742	14	WT-High	0,80589
46	TG-Low	0,2882	19	WT-High	0,62142
51	TG-Low	0,25915	24	WT-High	0,30555
56	TG-Low	0,62688	29	WT-High	0,62708
2	TG-High	0,44986	34	WT-High	0,66754
7	TG-High	0,17399	39	WT-High	0,79817
12	TG-High	0,5557	44	WT-High	0,5905
17	TG-High	0,36116	54	WT-High	1,26484
22	TG-High	0,21629	59	WT-High	1,00566
27	TG-High	0,17166	5	WT-Saline	1,0335
32	TG-High	0,14659	10	WT-Saline	
37	TG-High	0,29242	15	WT-Saline	0,88232
42	TG-High	0,22767	20	WT-Saline	0,35914
47	TG-High	0,25291	25	WT-Saline	
52	TG-High	0,32982	30	WT-Saline	0,92744
57	TG-High	0,15195	35	WT-Saline	
3	TG-Saline	0,24128	40	WT-Saline	0,82407
8	TG-Saline	0,2226	45	WT-Saline	1,06434
13	TG-Saline	0,32033	50	WT-Saline	0,95864
18	TG-Saline	0,30277	55	WT-Saline	1,02571
28	TG-Saline	0,15252	60	WT-Saline	1,10371
	Promedio	Desviación estándar	Error estándar		
TG-Low	0,3418191	0,15905	0,04591		
TG-High	0,2727456	0,13256	0,04192		
TG-Saline	0,2667446	0,06933	0,02001		
WT-High	0,7461702	0,28933	0,08724		
WT-Saline	0,9087633	0,22479	0,07493		

El resultado más obvio y esperado fue que tanto A β 40 como A β 42 solubles e insolubles fueron drásticamente mayores en todos los ratones TG que en ratones WT. Los A β 40 y A β 42 solubles no eran detectables en ratones WT, mientras que A β 40 y A β 42 insolubles estaban presentes, aunque aproximadamente 1000 veces menores que en ratones TG. El siguiente resultado más obvio fue que en todos los ratones TG, la concentración de A β 40 y A β 42 insolubles fue mucho mayor que de A β 40 y A β 42 solubles, aproximadamente 5000 y 7500 veces más, respectivamente.

Con respecto a las comparaciones de grupos entre los tres grupos TG, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos para A β 40 o A β 42 soluble o insoluble usando un ANOVA. Esto fue algo sorprendente para el amiloide insoluble ya que había claras diferencias en las placas en la corteza entre los ratones TG tratados con fármaco y tratados con solución salina. La explicación más probable es que el ELISA no era tan sensible a estas diferencias como los portaobjetos de placas para IHC.

Ejemplo 6 - Efecto de la administración intranasal de IgG sobre el peso y la supervivencia

Se realizó un estudio para evaluar la eficacia de la administración intranasal (I.N.) prolongada de IgG a dos dosis en un modelo de ratón con amiloide transgénico. El objetivo del estudio fue determinar si el tratamiento prolongado con IgG administrada por vía intranasal a dos dosis (0,4 g/kg/2 semanas y 0,8 g/kg/2 semanas) tendría algún efecto sobre el peso y la supervivencia del ratón.

Diseño experimental: Tal como se describe en el ejemplo 4, se usó el modelo de ratón con amiloide TG2576 ("TG") en este estudio como modelo de ratón para enfermedad de Alzheimer y se usaron ratones C57 como controles. La manipulación de los ratones, la preparación del fármaco y la administración del fármaco se realizaron tal como se describió anteriormente en el ejemplo 4.

Se dividieron los ratones en cinco grupos de tratamiento de 20 ratones tal como se describe en la tabla 15. El peso y la supervivencia de los ratones fueron monitorizados durante 103 semanas. El peso de cada ratón se registró semanalmente (datos no mostrados).

Resultados: estos experimentos mostraron que la IgG intranasal aumenta la longevidad de los ratones TG. La figura 4A muestra que los ratones TG tienen una mayor longevidad cuando se les administra una dosis alta (0,8 g/kg/2 semanas) o baja (0,4 g/kg/2 semanas) de IgG intranasal en comparación con los ratones TG a los que se les administró solución salina por vía intranasal (control). La figura 4B muestra que los ratones TG a los que se les administró IgG intranasal tenían una longevidad más larga que los ratones WT. Aunque este estudio comenzó con 20 ratones en cada cohorte, debido al sacrificio masivo realizado para evaluar el contenido de placas de amiloide (tal como se describe en el ejemplo 5), se realizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier usando el subgrupo de 8 ratones en cada cohorte que no se sacrificaron. La dosificación a los ratones en los subgrupos se continuó tal como se describió anteriormente durante la totalidad del experimento.

Ejemplo 7 - Efecto de la administración intranasal de IgG sobre la memoria

Se realizó un estudio para examinar si la administración intranasal de IgG afecta a la memoria en el cerebro *in vivo*. El propósito de este estudio fue examinar si el tratamiento prolongado con IgG administrada por vía intranasal a dos dosis (0,4 g/kg/2 semanas y 0,8 g/kg/2 semanas) tendría algún efecto sobre la memoria en un modelo de ratón con amiloide transgénico de enfermedad de Alzheimer.

Diseño experimental: A los 15 meses de edad, los ratones descritos en el ejemplo 4 se sometieron a una batería de seis semanas de pruebas conductuales para evaluar los cambios de memoria, sensitivomotores y ansiolíticos. Estas incluyeron pruebas con plataforma oculta y visible del laberinto de agua de Morris (memoria de referencia, capacidad visual), laberinto de agua de brazos radiales (memoria de trabajo), tarea de evitación pasiva (memoria), laberinto de Barnes (memoria), prueba de campo abierto (conducta exploratoria), laberinto en cruz elevado (ansiedad) y varilla rotatoria (habilidades motoras).

Resultados: Para cada prueba conductual, se analizaron los datos de comparación usando pruebas de la t tal como se describió anteriormente en la tabla 23. Se realizaron pruebas estadísticas con los datos después de la eliminación de los valores aberrantes estadísticos y los ratones que no cumplían, que se especificaron para cada prueba conductual. Se analizaron los datos en primer lugar comparando ratones WT-saline (WT-Sal) con ratones TG-Saline (TG-Sal) para determinar si existe un efecto transgénico (modelo) para esa prueba. También se realizaron comparaciones entre todos los ratones TG y todos los ratones WT. Aunque este último análisis se confunde por el tratamiento farmacológico, gana poder al aumentar el tamaño de muestra y sirve para dar una imagen general de un posible efecto transgénico (modelo). Se realizaron comparaciones entre los grupos de tratamiento con fármaco individuales. Específicamente, los grupos TG tratados con fármaco se compararon directamente con el grupo TG de solución salina para determinar si el fármaco tuvo algún efecto.

Tabla 23. Pruebas de la t usadas para evaluar los resultados de los estudios conductuales en modelos de ratones de

tipo natural y enfermedad de Alzheimer a los que se les administró IgG por vía intranasal.

Comparación	Motivo de la comparación
WT-Saline frente a TG-Saline	Para determinar si hay un efecto transgénico del modelo.
WT-all frente a TG-all (todos = solución salina e IgG I.N.)	Para proporcionar una vista a mayor escala del efecto transgénico del modelo.
TG-Saline frente a IgG I.N. de TG a dosis baja	Para determinar si los ratones TG tratados con la dosis baja de IgG rindieron de manera diferente a los ratones TG tratados con solución salina.
TG-Saline frente a IgG I.N. de TG a dosis alta	Para determinar si los ratones TG tratados con la dosis alta de IgG rindieron de manera diferente a los ratones TG tratados con solución salina.

De forma global, en las tres pruebas de memoria visoespacial, los ratones aprendieron con el tiempo, y en general hubo un rendimiento mejorado en los ratones WT en comparación con los ratones TG, lo que era de esperar. También hubo una diferencia entre los ratones WT y TG en el laberinto en cruz elevado. Hubo diferencias mínimas observadas en las pruebas de campo abierto y de varilla rotatoria, pero no se esperaban diferencias. El cumplimiento sólo fue un problema en el laberinto de Barnes, sin embargo, cuando se retiraron los ratones que no cumplían, estaban presentes tendencias de aprendizaje y el efecto del modelo reflejaba los observados en MWM y RAWM.

El laberinto de agua de Morris con plataforma oculta (MWM, por sus siglas en inglés). MWM es una prueba convencional de memoria espacial. El rendimiento de MWM se evaluó usando pruebas de plataforma oculta (4 días, 4 ensayos/día). Antes de que comenzaran los ensayos, se aclimataron los ratones a nadar en el agua. Para cada uno de estos bloques de ensayos, los ratones se colocaron aleatoriamente en cuatro cuadrantes dentro del MWM (tina redonda con agua) y se les permitió nadar durante 60 segundos o hasta que llegaron a la plataforma. La capacidad del ratón para llegar a la plataforma dependía de su capacidad para recordar pistas visuales de ensayos anteriores y su ubicación en relación con la plataforma. Los ratones que no llegaron a la plataforma después de 60 segundos se colocaron sobre la plataforma. Se permitió a los ratones permanecer/descansar sobre la plataforma durante 20 segundos entre ensayos. Se registraron todos los datos usando el software MouseApp, que registra la latencia de escape.

El laberinto de agua de Morris con plataforma visible está diseñado para evaluar la capacidad visual. Se ejecutó igual que el MWM con plataforma oculta, excepto en que la plataforma se elevó justo por encima de la superficie del agua, tiene una bandera en la parte superior para identificarla y rayas a lo largo del costado para que sea más visible. Sólo se ejecutó un día. Se realizó un análisis igual que con las pruebas de MWM con plataforma oculta.

En general, las pruebas del laberinto de agua de Morris con plataforma oculta mostraron que había una clara tendencia de aprendizaje tanto durante la semana como durante los días individuales, lo que demuestra que la prueba era eficaz para medir la memoria. Las latencias de escape fueron menores durante los días 3 y 4, y fueron especialmente las más bajas durante los ensayos 3 y 4 en estos días.

Hubo evidencia de un efecto de modelo transgénico. La tabla 25 y la tabla 26 muestran que ambos grupos WT tenían latencias de escape menores que los tres grupos TG en los días 3 y 4. Los ratones WT-Sal tenían latencias de escape menores que los ratones TG-Sal (tabla 24, tabla 25, tabla 26, tabla 27 y tabla 28). Sin embargo, cuando los grupos WT y TG se juntaron, hubo varias diferencias significativas, incluyendo B1-T2, B3-T4, B4-T1, B4-T3 y B4-T4 ($p < 0,05$ ó $0,01$; tabla 24, tabla 27 y tabla 28). Gran parte del poder de esta diferencia provino de los ratones TG-high, que rindieron particularmente bien en esta tarea.

Tabla 24. Resumen de pruebas de la t para comparaciones específicas en pruebas conductuales. Las pruebas son bilaterales y para datos independientes. Los números notificados son valores de p. Celdas en color gris $p < 0,05$, celdas recuadradas $p < 0,1$.

Prueba	Medición	Bloque	Ensayo	WT-Sal frente a TG-Sal	WT-All frente a TG-All	TG-Sal frente a TG-Low	TG-Sal frente a TG-High
RAWM	Escape	1	1	0,023	0	0,883	0,539
RAWM	Escape	1	2	0,689	0,558	0,141	0,298
RAWM	Escape	1	3	0,088	0,215	0,592	0,15
RAWM	Escape	1	4	0,615	0,358	0,803	0,335
RAWM	Escape	2	1	0,159	0,215	0,653	0,607
RAWM	Escape	2	2	0,194	0,926	0,675	0,13
RAWM	Escape	2	3	0,161	0,497	0,06	0,046
RAWM	Escape	2	4	0,446	0,219	0,271	0,918
RAWM	Escape	3	1	0,959	0,767	0,619	0,65

ES 2 759 226 T3

RAWM	Escape	3	2	0,069	0,001	0,5	0,202
RAWM	Escape	3	3	0,995	0,806	0,185	0,597
RAWM	Escape	3	4	0,281	0,002	0,198	0,257
RAWM	Escape	4	1	0,785	0,487	0,217	0,701
RAWM	Escape	4	2	0,35	0,274	0,433	0,627
RAWM	Escape	4	3	0,357	0,149	0,348	0,292
RAWM	Escape	4	4	0,232	0,008	0,583	0,513
RAWM	Errores	1	1	0,538	0,001	0,154	0,881
RAWM	Errores	1	2	0,284	0,105	0,06	0,233
RAWM	Errores	1	3	0,062	0,196	0,236	0,089
RAWM	Errores	1	4	0,443	0,255	0,577	0,293
RAWM	Errores	2	1	0,656	0,753	0,223	0,136
RAWM	Errores	2	2	0,227	0,642	0,606	0,022
RAWM	Errores	2	3	0,17	0,706	0,247	0,139
RAWM	Errores	2	4	0,719	0,385	0,601	0,954
RAWM	Errores	3	1	0,86	0,678	0,783	0,551
RAWM	Errores	3	2	0,043	0,002	0,207	0,336
RAWM	Errores	3	3	0,946	0,75	0,55	0,526
RAWM	Errores	3	4	0,393	0,02	0,998	0,391
RAWM	Errores	4	1	0,437	0,229	0,397	0,814
RAWM	Errores	4	2	0,064	0,048	0,154	0,263
RAWM	Errores	4	3	0,357	0,214	0,296	0,432
RAWM	Errores	4	4	0,135	0,007	0,935	0,566
MWM oc.	Escape	1	1	0,262	0,186	0,007	0,095
MWM oc.	Escape	1	2	0,069	0,086	0,663	0,532
MWM oc.	Escape	1	3	0,62	0,26	0,5	0,419
MWM oc.	Escape	1	4	0,663	0,171	0,111	0,189
MWM oc.	Escape	2	1	0,882	0,555	0,357	0,702
MWM oc.	Escape	2	2	0,24	0,568	0,091	0,963
MWM oc.	Escape	2	3	0,393	0,71	0,802	0,276
MWM oc.	Escape	2	4	0,986	0,256	0,638	0,963
MWM oc.	Escape	3	1	0,475	0,419	0,906	0,163
MWM oc.	Escape	3	2	0,681	0,173	0,109	0,549
MWM oc.	Escape	3	3	0,905	0,106	0,908	0,864
MWM oc.	Escape	3	4	0,355	0,072	0,874	0,6
MWM oc.	Escape	4	1	0,672	0,045	0,044	0,102
MWM oc.	Escape	4	2	0,147	0,127	0,264	0,991
MWM oc.	Escape	4	3	0,592	0,03	0,585	0,802
MWM oc.	Escape	4	4	0,507	0,02	0,436	0,192
Barnes	Escape	1	1	0,681	0,35	0,946	0,696
Barnes	Escape	1	2	0,925	0,643	0,587	0,337
Barnes	Escape	1	3	0,098	0,277	0,876	0,408
Barnes	Escape	2	1	0,478	0,576	0,542	0,63
Barnes	Escape	2	2	0,673	0,64	0,132	0,534
Barnes	Escape	2	3	0,501	0,529	0,284	0,496
Barnes	Escape	3	1	0,943	0,313	0,189	0,764
Barnes	Escape	3	2	0,764	0,88	0,678	0,626
Barnes	Escape	3	3	0,581	0,274	0,826	0,657
Barnes	Escape	4	1	0,623	0,052	0,072	0,606
Barnes	Escape	4	2	0,138	0,21	0,29	0,482
Barnes	Escape	4	3	0,916	0,986	0,925	0,845
Barnes	Errores	1	1	0,485	0,851	0,807	0,75
Barnes	Errores	1	2	0,057	0,033	0,436	0,416
Barnes	Errores	1	3	0,231	0,414	0,541	0,603
Barnes	Errores	2	1	0,48	0,519	0,731	0,434
Barnes	Errores	2	2	0,085	0,15	0,41	0,383
Barnes	Errores	2	3	0,423	0,079	0,17	0,341
Barnes	Errores	3	1	0,979	0,894	0,875	0,759
Barnes	Errores	3	2	0,54	0,741	0,802	0,535
Barnes	Errores	3	3	0,864	0,952	0,806	0,764
Barnes	Errores	4	1	0,928	0,245	0,185	0,355
Barnes	Errores	4	2	0,885	0,965	0,736	0,758
Barnes	Errores	4	3	0,013	0,116	0,19	0,707

MWM vis.	Escape	1	1	0,074	0,282	0,134	0,589
MWM vis.	Escape	1	2	0,507	0,222	0,665	0,597
MWM vis.	Escape	1	3	0,863	0,237	0,516	0,959
MWM vis.	Escape	1	4	0,898	0,448	0,46	0,593
Campo abierto	Cruces de línea	n/a	n/a	0,534	0,138	0,112	0,688
Campo abierto	Velocidad	n/a	n/a	0,38	0,057	0,25	0,618
En cruz elev.	Tiempo en los brazos abiertos	n/a	n/a	0,036	0,001	0,726	0,225
En cruz elev.	Frecuencia en los brazos abiertos	n/a	n/a	0,034	0	0,372	0,13
Varilla rotatoria	Mejor ejecución	n/a	n/a	0,98	0,153	0,64	0,875
Varilla rotatoria	Ejecución promedio	n/a	n/a	0,856	0,131	0,557	0,973
Evitación pas.	Escape	Aprendizaje	n/a	0,032	0,001	0,952	0,825
Evitación pas.	Escape	Prueba	n/a	0,072	0	0,34	0,207

Tabla 25. Latencias de escape promedio (s) de las pruebas de laberinto de agua de Morris.

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG-Low (N = 18)	34,54	30,47	25,03	24,68
TG-High (N = 18)	33,38	27,06	24,50	30,51
TG-Saline (N = 16)	24,80	22,20	24,25	24,02
WT-High (N = 16)	23,38	23,58	17,73	16,11
WT-Saline (N = 18)	27,26	26,82	24,85	26,82

5 Tabla 26. Latencias de escape promedio (s) de las pruebas de laberinto de agua de Morris con el incumplimiento eliminado.

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG-Low (N = 15-18)	31,36	25,53	25,03	23,46
TG-High (N = 15-16)	28,73	20,55	20,06	25,57
TG-Saline (N = 14-15)	23,25	19,68	21,87	19,68
WT-High (N = 14-15)	20,93	19,30	14,92	13,18
WT-Saline (N = 13-16)	21,65	22,67	18,07	15,87

Tabla 27. Promedio de latencias de escape diarias (s) de las pruebas de laberinto de agua de Morris.

Grupo	Día	Día 2	Día 3	Día 4
TG ALL (N = 52)	31,14	26,75	24,61	26,50
WT ALL (N = 34)	25,43	25,29	21,50	21,78

10 Tabla 28. Promedio de latencias de escape diarias (s) de las pruebas de laberinto de agua de Morris con el incumplimiento eliminado.

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG ALL (N = 45-49)	27,86	21,92	22,44	22,99
WT ALL (N = 28-30)	21,29	21,10	16,49	14,43

Al igual que con RAWM, los tres grupos transgénicos se agrupan estrechamente en la tabla 25 y la tabla 26. Las únicas diferencias significativas entre TG-Sal y TG-low provinieron de B1-T1, B2-T2 y B4-T1 (tabla 24), y en cada caso, los

ratones TG-Sal tenían latencias de escape más cortas que los ratones TG-Low, que rindieron particularmente mal en esta tarea. Sólo hubo un ejemplo en el que hubo una diferencia estadística entre TG-high y TG-Sal (B1-T1). En este caso, a TG-Sal les fue muy bien y superaron a los ratones TG-High. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los ratones WT-high superaron constantemente a todos los demás grupos en esta tarea. Aunque las pruebas de la t realizadas en cada ensayo no mostraron diferencias estadísticas entre WT-high y WT-Saline, ANOVA de medidas repetidas demostrará una diferencia entre estos dos grupos.

Para la prueba de MWM con plataforma oculta, se recopiló la latencia de escape (tiempo para encontrar la plataforma). Se realizaron pruebas de la t para cada día de cada ensayo (1-4). Se analizaron los datos con ratones que no cumplían eliminados para representar con mayor precisión la memoria. Los ratones que no cumplían se definieron como cualquier ratón que tuviera latencias de escape de 60 segundos (el tiempo completo asignado) para los ensayos 3 y 4, cuando deberían haber estado aprendiendo en cierta medida. Se registró el porcentaje de ratones que no cumplían para cada grupo. Para las pruebas con plataforma oculta, el incumplimiento fue el siguiente: TG-Low = 8,3%; TG-High = 15,3%; TG-Saline = 7,8%; WT-High = 7,8% y WT-Saline = 18,1%.

El laberinto de agua de brazos radiales (RAWM, por sus siglas en inglés). Se usa RAWM para evaluar la memoria de trabajo a corto plazo. De manera similar a MWM, esta prueba tiene una tina redonda con agua, pistas visuales por toda la habitación y una plataforma oculta. Es único en que se colocan insertos en el tanque para crear seis brazos distribuidos radialmente de igual tamaño que emanan del centro. Antes de que comenzaran los ensayos, se aclimataron los ratones para nadar en el agua. Los ratones se dejaron caer en 4 brazos radiales, en un orden seleccionado al azar para cada ensayo, y se les dio 1 minuto para encontrar la plataforma, con 20 segundos de descanso entre cada ensayo. Los ensayos tuvieron lugar diariamente durante doce días y cada día la plataforma se trasladó a una nueva ubicación. A mitad de las pruebas, se añadió una pista visual dentro del laberinto adicional al tanque en un esfuerzo por facilitar un poco la prueba. La pista visual era una gran 'X' hecha de cinta y colocada en la pared interna del laberinto por encima del brazo con la plataforma de escape. Se registraron tanto los errores como la latencia de escape.

Tabla 29. Latencia de escape de RAWM (segundos) de ratones agrupados en los bloques 1-4.

	Bloque 1				Bloque 2				Bloque 3				Bloque 4			
	T1(1)	T2(1)	T3(1)	T4(1)	T1(2)	T2(2)	T3(2)	T4(2)	T1(3)	T2(3)	T3(3)	T4(3)	T1(4)	T2(4)	T3(4)	T4(4)
TG-Low (N = 18)	49,20	50,48	49,44	45,02	48,06	42,98	40,42	46,66	44,17	35,45	36,25	40,67	37,46	26,44	22,72	29,89
TG-High (N = 18)	49,72	47,13	44,94	47,33	47,78	34,09	42,11	42,96	40,00	45,02	35,56	41,59	32,70	27,20	29,76	29,57
TG-Saline (N = 16)	50,58	44,13	48,96	42,94	49,92	41,58	34,98	43,50	39,94	36,21	28,45	32,98	32,75	29,06	28,04	29,42
WT-High (N = 18)	39,96	47,11	43,04	42,02	44,81	41,61	34,72	41,70	41,91	33,52	39,54	34,93	40,15	28,28	24,78	24,43
WT-Saline (N = 18)	40,62	38,50	41,76	40,26	43,28	35,98	40,15	40,81	42,41	31,70	33,83	33,70	33,09	27,87	24,96	25,20

En general, RAWM fue demasiado difícil para los ratones en los bloques 1 y 2, tal como lo demuestra una tendencia general para que la latencia de escape no sea inferior a unos 35 segundos (tabla 30). Después de añadir la pista visual adicional en los bloques 3 y 4, se hizo evidente una tendencia clara de disminución del tiempo para encontrar la plataforma y los errores en todos los grupos de tratamiento desde el ensayo 1 hasta el ensayo 4 (tabla 30, tabla 31 y tabla 32). Esto demostró que la prueba fue eficaz para medir la memoria.

Tabla 30. Latencia de escape de RAWM (segundos) de los bloques 1 y 2.

LATENCIA DE ESCAPE (BLOQUE)								
	T1(1)	T2(1)	T1(2)	T2(2)	T1(3)	T2(3)	T1(4)	T2(4)
TG-Low (N = 18)	49,20	50,48	48,06	42,98	44,17	35,45	37,46	26,44
TG-High (N = 18)	49,72	47,13	47,78	34,09	40,00	45,02	32,70	27,20
TG-Saline (N = 16)	50,58	44,13	49,92	41,58	39,94	36,21	32,75	29,06
WT-High (N = 18)	39,96	47,11	44,81	41,61	41,91	33,52	40,15	28,28
WT-Saline (N = 18)	40,62	38,50	43,28	35,98	42,41	31,70	33,09	27,87

Tabla 31. Latencia de escape de RAWM (segundos) de los bloques 1 y 3.

LATENCIA DE ESCAPE (BLOQUE)								
	T1(1)	T3(1)	T1(2)	T3(2)	T1(3)	T3(3)	T1(4)	T3(4)
TG-Low (N = 18)	49,20	49,44	48,06	40,42	44,17	36,25	37,46	22,72
TG-High (N = 18)	49,72	44,94	47,78	42,11	40,00	35,56	32,70	29,76
TG-Saline (N = 16)	50,58	48,96	49,92	34,98	39,94	28,45	32,75	28,04
WT-High (N = 18)	39,96	43,04	44,81	34,72	41,91	39,54	40,15	24,78
WT-Saline (N = 18)	40,62	41,76	43,28	40,15	42,41	33,83	33,09	24,96

Tabla 32. Latencia de escape de RAWM (segundos) de los bloques 1 y 4.

LATENCIA DE ESCAPE (BLOQUE)								
	T1(1)	T4(1)	T1(2)	T4(2)	T1(3)	T4(3)	T1(4)	T4(4)
TG-Low (N = 18)	49,20	45,02	48,06	46,66	44,17	40,67	37,46	29,89
TG-High (N = 18)	49,72	47,33	47,78	42,96	40,00	41,59	32,70	29,57
TG-Saline (N = 16)	50,58	42,94	49,92	43,50	39,94	32,98	32,75	29,42
WT-High (N = 18)	39,96	42,02	44,81	41,70	41,91	34,93	40,15	24,43
WT-Saline (N = 18)	40,62	40,26	43,28	40,81	42,41	33,70	33,09	25,20

5
 10
 15
 20

Hubo evidencia clara de un efecto de modelo transgénico en RAWM (tabla 33 y tabla 34). En la tabla 35, un resumen global de todos los grupos promediados a lo largo de todos los días muestra que en los cuatro ensayos, ambos grupos WT tuvieron tiempos menores para encontrar la plataforma que los tres grupos TG. Esto también fue cierto para los errores de los ensayos 2-4 (tabla 36). En la tabla 33, la tabla 34, la tabla 35 y la tabla 36, pueden verse bloques y ensayos individuales. Para la latencia de escape, los ratones WT-Sal tuvieron latencias de escape significativamente más cortas que los ratones TG-Sal en B1-T1 (lote 1-ensayo (*trial*) 1), B1-T3 y B3-T2 ($p < 0,05$ ó $0,1$) (tabla 24). Para los errores (tabla 36), los ratones WT-Sal tuvieron significativamente menos errores que los ratones TG-Sal en B1-T3, B3-T2 y B4-T2 ($p < 0,05$ ó $0,1$) (tabla 24). Cuando todos los ratones WT se combinaron y compararon con todos los ratones TG (independientemente del tratamiento), quedó claro que los ratones WT superaron a los ratones TG. Cuando se combinaron todos los días, los ratones WT tuvieron una latencia de escape más corta y menos errores que los ratones TG en todos los ensayos (tabla 35 y tabla 36). De manera similar, en bloques y ensayos individuales, todos los ratones WT tuvieron una latencia de escape más corta y menos errores en todos los ensayos en los bloques 2-4 (tabla 35 y tabla 36). Estadísticamente, los ratones WT tenían latencias de escape más cortas que los ratones TG en B1-T1, B3-T2, B3-T4 y B4-T4 ($p < 0,05$) (tabla 24). Estadísticamente, los ratones WT tenían menos errores que los ratones TG en B1-T1, B3-T2, B3-T4, B4-T2 y B4-T4 ($p < 0,05$) (tabla 24).

Tabla 33. Latencias de escape de RAWM (segundos) registradas durante 12 días de pruebas de RAWM.

	TG ALL (N = 52)				WT ALL (N = 36)			
	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3	Brazo 4	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3	Brazo 4
Día 1	51,67	53,33	49,08	45,24	45,94	45,56	46,81	45,22
Día 2	51,15	45,58	48,54	46,87	36,11	40,22	40,06	37,47
Día 3	46,60	43,19	45,60	43,41	38,86	42,64	40,33	40,72
Día 4	50,29	37,31	39,87	43,27	43,17	37,67	37,03	34,83
Día 5	49,85	40,62	38,27	44,76	41,94	38,14	36,61	44,08
Día 6	45,41	40,45	39,84	45,20	47,00	40,58	38,67	44,86
Día 7	45,76	38,76	37,14	42,38	41,53	32,08	34,53	40,67
Día 8	38,79	41,61	39,20	38,92	43,36	28,36	38,36	28,97
Día 9	39,75	36,79	24,71	34,63	41,57	37,39	37,17	33,31
Día 10	34,42	29,90	29,69	29,94	39,81	27,19	27,50	25,47
Día 11	34,13	23,69	24,10	31,15	35,50	27,50	26,08	28,94

Día 12	34,54	28,94	26,60	27,81	34,56	29,53	21,03	20,03
--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabla 34. Latencias de escape de RAWM (segundos) de los bloques 1-4.

	Bloque 1				Bloque 2				Bloque 3				Bloque 4			
	T1(1)	T2(1)	T3(1)	T4(1)	T1(2)	T2(2)	T3(2)	T4(2)	T1(3)	T2(3)	T3(3)	T4(3)	T1(4)	T2(4)	T3(4)	T4(4)
TG ALL (N = 52)	49,81	47,37	47,73	45,18	48,54	39,45	39,32	44,40	41,42	39,04	33,62	38,62	34,37	27,51	26,79	29,63
WT ALL (N = 36)	40,29	42,81	42,40	41,14	44,06	38,80	37,44	41,26	42,16	32,61	36,69	34,31	36,62	28,07	24,87	24,81

Tabla 35. Promedio de 12 días de latencias de escape de RAWM (segundos).

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
TG ALL (N = 52)	43,53	38,35	36,89	39,46
WT ALL (N = 36)	40,78	35,57	35,35	35,38

5

Tabla 36. Promedio de 12 días de errores RAWM (promedios de prueba).

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
TG ALL (N = 52)	4,77	4,64	4,28	4,42
WT ALL (N = 36)	4,52	3,84	3,71	3,72

10

15

20

Hubo evidencia de un efecto del modelo de TG en RAWM. Un resumen de todos los grupos promediados a lo largo de todos los días (tabla 35) muestra que en los cuatro ensayos, ambos grupos WT tuvieron tiempos menores para encontrar la plataforma que los tres grupos TG. Esto también fue cierto para los errores de los ensayos 2-4 (tabla 35 y tabla 36). En la tabla 35 y la tabla 36, pueden verse bloques y ensayos individuales. Para la latencia de escape, los ratones WT-Sal tuvieron latencias de escape significativamente más cortas que los ratones TG-Sal en B1-T1 (lote 1-ensayo 1), B1-T3 y B3-T2 ($p < 0,05$ ó $0,1$) (tabla 24). Tal como se muestra en la tabla 36, los ratones WT-Sal tuvieron significativamente menos errores que los ratones TG-Sal en B1-T3, B3-T2 y B4-T2 ($p < 0,05$ ó $0,1$) (tabla 24). Cuando se combinaron todos los ratones WT y compararon con todos los ratones TG (independientemente del tratamiento), quedó claro que los ratones WT superaron a los ratones TG. Cuando se combinaron todos los días, los ratones WT tuvieron una latencia de escape más corta y menos errores que los ratones TG en todos los ensayos (tabla 35). De manera similar, en bloques y ensayos individuales, todos los ratones WT tuvieron una latencia de escape más corta y menos errores en todos los ensayos en los bloques 2-4 (tabla 35 y tabla 36). Estadísticamente, los ratones WT tenían latencias de escape más cortas que los ratones TG en B1-T1, B3-T2, B3-T4 y B4-T4 ($p < 0,05$) (tabla 24). Estadísticamente, los ratones WT tenían menos errores que los ratones TG en B1-T1, B3-T2, B3-T4, B4-T2 y B4-T4 ($p < 0,05$) (tabla 24).

25

30

El laberinto de Barnes. El laberinto de Barnes es una tarea de memoria visual basada en encontrar un orificio de escape en una tabla, ayudado por pistas visuales por toda la habitación. La tabla era redonda, elevada a 1 m del suelo y tenía 40 orificios de escape espaciados equitativamente alrededor de la periferia de la tabla. Uno de estos orificios tenía una caja de escape directamente debajo, mientras que los otros estaban abiertos. La motivación para encontrar la caja de escape fue un estímulo aversivo en forma de luces brillantes y ventiladores que soplaban sobre la superficie de la tabla. La caja de escape se ubicó en una ubicación en la duración del estudio. Al ratón se le dieron 4 días, con 3 ensayos/día, para conocer la ubicación de la caja de escape. A los ratones se les dieron hasta dos minutos sobre la tabla para encontrar el orificio de escape. Si después de 2 minutos no encontraban la caja de escape, se colocaban en la caja. Tanto la latencia de escape para encontrar el orificio como los errores se registraron y analizaron. Los errores se definieron como meter la cabeza a través de orificios que no tienen la caja de escape.

35

40

De forma global, la prueba del laberinto de Barnes no funcionó bien para los ratones en este estudio. Esta fue la única prueba conductual en la que el incumplimiento fue un problema (aproximadamente el 50% de todos los ratones no realizaron la tarea). Mientras se realizaban las pruebas, los ratones generalmente no tenían miedo de los estímulos aversivos. Sin embargo, entre los ratones que cumplían y que se incluyeron en los análisis, hubo una tendencia de aprendizaje a lo largo de los días y los ensayos, que puede verse en las latencias de escape.

45

Hubo evidencia de un efecto de modelo con esta prueba. La tabla 37 y la tabla 38 muestran que ambos grupos WT tienen latencias de escape menores en los días 3 y 4 que los tres grupos TG. Esto refleja los datos recopilados con las pruebas RAWM y MWM, las otras dos tareas de memoria a largo plazo. Esta diferencia también se ve cuando todos los ratones WT y TG se combinaron como en la tabla 39 y la tabla 40.

Tabla 37. Latencias de escape promedio (s) del laberinto de agua de Barnes por tratamiento.

Tiempo (s)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG-Low (N = 18)	105,15	99,76	95,44	85,67
TG-High (N = 18)	107,74	94,57	100,30	97,33
TG-Saline (N = 16)	95,48	89,10	90,10	82,31
WT-High (N = 17)	99,06	95,98	93,65	82,04
WT-Saline (N = 18)	94,15	97,41	93,43	87,63

Tabla 38. Latencias de escape promedio (s) del laberinto de agua de Barnes por tratamiento con incumplimiento eliminado.

Tiempo (s)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG-Low (N = 7-12)	82,81	78,25	83,60	72,75
TG-High (N = 6-8)	84,28	72,14	75,71	68,86
TG-Saline (N = 7-9)	79,71	65,38	74,30	71,48
WT-High (N = 8-10)	83,74	79,17	66,29	60,13
WT-Saline (N = 7-10)	69,17	68,43	73,00	60,74

5

Tabla 39. Latencias de escape promedio (s) del laberinto de agua de Barnes por genotipo.

Tiempo (s)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG ALL (N = 52)	103,07	94,69	95,48	88,67
WT ALL (N = 35)	96,53	96,71	93,53	84,91

Tabla 40. Latencias de escape promedio (s) del laberinto de agua de Barnes por genotipo con incumplimiento eliminado.

Tiempo (s)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG ALL (N = 21-28)	82,05	72,21	78,16	71,37
WT ALL (N = 17-19)	76,88	74,75	70,02	60,42

10

No hubo evidencia de un efecto farmacológico en las pruebas de laberinto de Barnes (tabla 37, tabla 38, tabla 39, tabla 40, tabla 41, tabla 42). La única significación estadística fue en B4-T1, en el que los ratones TG-Low tuvieron un rendimiento muy pobre y tuvieron una latencia de escape más larga que los ratones con TG-Sal ($p < 0,1$; tabla 24).

15

Tabla 41. Número promedio de errores del laberinto de agua de Barnes por tratamiento.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG-Low (N = 18)	8,48	5,57	6,24	5,39
TG-High (N = 18)	6,85	5,54	4,15	4,04
TG-Saline (N = 16)	11,90	8,02	6,29	5,69
WT-High (N = 17)	6,96	6,45	4,69	4,00
WT-Saline (N = 18)	9,46	8,44	5,35	4,89

Tabla 42. Errores promedio del laberinto de agua de Barnes por genotipo.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
TG ALL (N = 52)	8,97	6,31	5,53	5,01
WT ALL (N = 35)	8,25	7,48	5,03	4,46

20

Para el laberinto de Barnes, se recogieron tanto la latencia de escape (tiempo para encontrar el orificio de escape) como los errores (número de veces que un ratón mete la cabeza en un orificio que no tiene la caja de escape). Se realizaron pruebas de la t para cada día de cada ensayo (1-3). Se analizaron los datos con ratones que no cumplieran eliminados para representar con mayor precisión la memoria. Los ratones que no cumplieran se definieron como

cualquier ratón que tuviera latencias de escape de 120 segundos (el tiempo completo asignado) para los ensayos 3, cuando deberían haber estado aprendiendo en cierta medida. Se registró el porcentaje de ratones que no cumplían para cada grupo y fue el siguiente: TG-Low = 48,6%; TG-High = 61,1%; TG-Saline = 48,4%; WT-High = 45,6%; y WT-Saline = 52,8%.

5 *Laberinto en cruz elevado.* El laberinto en cruz elevado es una prueba convencional de ansiedad basal en la que el animal se coloca en el centro de un laberinto elevado de 4 brazos que consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados. Se registró el número de veces que el animal entrada en cada uno de los brazos y el tiempo que pasó en cada brazo a lo largo de 4 minutos. La prueba se usó para determinar la respuesta incondicionada a un entorno potencialmente peligroso (los brazos abiertos y sin protección) y se midió la conducta relacionada con ansiedad mediante el grado en que el roedor evita los brazos abiertos del laberinto.

10
15
20 Hubo un efecto transgénico en el laberinto en cruz elevado. En este modelo, todos los ratones TG pasaron más tiempo y realizaron entradas en brazo más frecuentes en los brazos abiertos del laberinto que todos los ratones WT, lo que demuestra la inhibición de la conducta exploratoria y la ansiedad que los ratones WT tienen con respecto a los espacios abiertos. Cuando se compararon los ratones WT-Sal con los ratones TG-Sal, los ratones TG pasaron significativamente más tiempo y tuvieron significativamente más entradas en brazo en los brazos abiertos (tabla 24, tabla 43y tabla 44). Cuando se combinaron todos los ratones WT y todos los ratones TG, se observaron los mismos resultados (tabla 44 y tabla 45), $p < 0,05$; tabla 24).

Tabla 43. Tiempo promedio de permanencia en brazos abiertos durante el laberinto en cruz elevado.

	TIEMPO (S)							
	SUMA				PORCENTAJE			
	Tiempo promedio cerrado	Tiempo promedio abierto	Error estándar cerrado	Error estándar abierto	Tiempo promedio cerrado	Tiempo promedio abierto	Error estándar cerrado	Error estándar abierto
TG-Low (N = 18)	115,2	31,4	10,8	5,3	48,0	13,1	4,5	2,2
TG-High (N = 16)	128,7	48,9	11,2	8,7	53,7	20,4	4,7	3,6
TG-Saline (N = 15)	117,5	34,6	11,6	7,4	49,0	14,4	4,9	3,1
WT-High (N = 16)	151,9	20,6	8,6	3,7	63,4	8,6	3,6	1,6
WT-Saline (N = 16)	169,8	15,9	11,6	4,4	70,8	6,6	4,8	1,8
TG ALL (N = 49)	120,3	38,1	6,4	4,2	50,2	15,9	2,7	1,8
WT ALL (N = 32)	160,8	18,3	7,3	2,9	67,1	7,6	3,0	1,2

Tabla 44. Frecuencia promedio de entradas en brazos abiertos durante el laberinto en cruz elevado.

	FRECUENCIA							
	SUMA				PORCENTAJE			
	Frecuencia promedio cerrado	Frecuencia promedio abierto	Error estándar cerrado	Error estándar abierto	Frecuencia promedio cerrado	Frecuencia promedio abierto	Error estándar cerrado	Error estándar abierto
TG-Low (N = 18)	16,6	10,8	2,0	2,0	60,9	39,1	5,1	5,1
TG-High (N = 16)	16,0	14,8	2,2	3,6	57,8	42,2	5,2	5,2
TG-Saline (N = 15)	15,9	8,1	2,4	2,2	69,6	30,4	5,8	5,8
WT-High (N = 16)	13,8	3,4	1,5	0,5	82,1	17,9	2,4	2,4

WT-Saline (N = 16)	9,8	3,0	1,1	0,8	81,9	18,1	3,8	3,8
TG ALL (N = 49)	16,2	11,3	1,2	1,6	62,5	37,5	3,1	3,1
WT ALL (N = 32)	11,8	3,2	1,0	0,5	82,0	18,0	2,2	2,2

No hubo evidencia de un efecto farmacológico en las pruebas de laberinto en cruz elevado. Aunque el grupo TG-high tuvo la mayor cantidad de entradas en brazo y pasó la mayor parte del tiempo en los brazos abiertos, no fue significativamente diferente de los otros grupos (tabla 24, tabla 43 y tabla 44).

5 Para el laberinto en cruz elevado, se registraron tanto el tiempo que pasaron en brazos abiertos y cerrados como el número de entradas en brazo (también denominado frecuencia de entradas en brazo). Los ratones no se incluyeron en los análisis si se cayeron del laberinto en menos de 120 segundos. Hubo 3 ratones que se cayeron, todos de diferentes grupos. Para los valores aberrantes, se eliminaron los ratones tanto si el tiempo que pasaron en los brazos abiertos como la frecuencia de las entradas en brazos abiertos fueron de más de dos desviaciones estándar con respecto a la media de su grupo de tratamiento. Los valores aberrantes incluyeron 3 ratones, todos de diferentes grupos.

15 *La prueba en laberinto de campo abierto.* La prueba en laberinto de campo abierto se usa para detectar cualquier cambio en la actividad locomotora espontánea debido al tratamiento farmacológico o a ansiedad. A cada ratón se le dieron 4 min para explorar individualmente una caja rectangular, mientras se hacía un seguimiento mediante el sistema de seguimiento de vídeo EthoVision. Para el análisis, la caja se subdividió en 16 cuadrados de igual tamaño que están separados por líneas trazadas manualmente usando la función "dibujar línea" en EthoVision. Se midió el número de cruces de línea y los patrones de exploración.

20 No hubo evidencia de un efecto transgénico o farmacológico en las pruebas en laberinto de campo abierto. Todos los grupos de ratones tenían cruces de línea y velocidad muy similares (tabla 24, tabla 45, tabla 46, tabla 47 y tabla 48).

Tabla 45. Velocidad promedio de los ratones.

	Velocidad promedio	Desv. est.	Error est.
TG Low (N = 18)	7,66	2,48	0,58
TG High (N = 18)	9,32	3,73	0,88
TG Saline (N = 15)	8,73	2,78	0,72
WT High (N = 16)	10,03	2,50	0,63
WT Saline (N = 17)	9,71	3,38	0,82

25 Tabla 46. Velocidad promedio de los ratones, promediada por genotipo.

	Velocidad promedio	Error estándar
TG ALL (N = 51)	8,66	0,44
WT ALL (N = 33)	9,46	0,56

Tabla 47. Número promedio de cruces de línea por ratón.

	Cruces de línea promedio	Desv. est.	Error est.
TG Low (N = 18)	87,56	32,93	7,76
TG High (N = 18)	110,94	44,01	10,37
TG Saline (N = 15)	105,53	29,47	7,61
WT High (N = 16)	113,06	30,10	7,53
WT Saline (N = 17)	112,59	33,44	8,11

30 Tabla 48. Número promedio de cruces de línea por ratones, promediado por genotipo.

	Cruces de línea promedio	Error estándar
TG ALL (N = 51)	102,65	5,33

WT ALL (N = 33)	107,83	6,21
-----------------	--------	------

5 Para el laberinto de campo abierto, se midieron tanto el número de cruces de línea como la velocidad global. Los valores aberrantes se eliminaron si los cruces de línea de un ratón individual eran de más de 2 desviaciones estándar con respecto a la media del grupo de tratamiento. Esto incluyó 3 ratones, cada uno de diferentes grupos de tratamiento. Se realizó un análisis para ambos cruces de línea y velocidad.

10 *La prueba de rendimiento de varilla rotatoria.* La prueba de rendimiento de varilla rotatoria se usa para detectar cualquier cambio en la resistencia, el equilibrio y la coordinación. Los ratones se colocaron en una barra rotatoria automatizada y se les permitió caminar sobre la barra durante hasta 60 segundos. La velocidad de rotación se aumentó gradualmente y la capacidad del roedor para permanecer en la barra rotatoria se registró como el tiempo total que pasó en la barra. A los ratones se les dio tres ensayos, y se usa el mejor tiempo para el análisis.

15 No hubo efecto de modelo transgénico en las pruebas de varilla rotatoria. Todos los grupos rindieron esencialmente igual y no hubo diferencias estadísticas entre los grupos (tabla 24 y tabla 49, tabla 50 y tabla 51). Hubo una tendencia no significativa para todos los ratones WT a superar a todos los ratones TG (tabla 49, tabla 50 y tabla 51).

Tabla 49. Ejecuciones promedio más largas en la varilla rotatoria por grupo de tratamiento.

	Mejor ensayo (promedio) (s)
TG-Low (N = 18)	30,59
TG-High (N = 18)	37,33
TG-Saline (N = 16)	35,38
WT-High (N = 16)	54,13
WT-Saline (N = 18)	35,67
TG ALL (N = 52)	37,33
WT ALL (N = 34)	35,38

Tabla 50. Tiempo de ejecución promedio en la varilla rotatoria por grupo de tratamiento.

	Tiempo promedio (s)
TG-Low (N = 18)	19,43
TG-High (N = 18)	23,30
TG-Saline (N = 16)	22,35
WT-High (N = 16)	35,24
WT-Saline (N = 18)	22,25
TG ALL (N = 52)	23,30
WT ALL (N = 34)	22,35

20 Tabla 51. Promedio de prueba de tiempo de ejecución (s) en la varilla rotatoria por grupo de tratamiento.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
TG-Low (N = 18)	10,53	21,25	27,06
TG-High (N = 18)	15,72	20,44	33,72
TG-Saline (N = 16)	16,60	25,63	24,60
WT-High (N = 16)	19,56	43,00	44,20
WT-Saline (N = 18)	17,00	17,06	32,39
TG ALL (N = 52)	15,72	20,44	33,72
WT ALL (N = 34)	16,60	25,63	24,60

25 No hubo evidencia de un efecto farmacológico entre los grupos transgénicos (tabla 49, tabla 50 y tabla 51). Sin embargo, se observó que los ratones con alto contenido de WT tenían tiempos más largos en la varilla rotatoria que los ratones WT-Sal. Una prueba de la t entre WT-Sal y WT-high produjo un valor de p de 0,089 para la ejecución más larga y un valor de p de 0,041 para la ejecución promedio (las pruebas de la t no se muestran, tabla 49, tabla 50 y tabla 51).

30 Para la prueba de varilla rotatoria, se registró el tiempo en la barra rotatoria antes de que el ratón se cayera. Se realizaron tres ensayos. Si un ratón alcanzó los 120 segundos (el tiempo máximo) antes del ensayo 3, no se realizaron ejecuciones posteriores. Para cada grupo de tratamiento, se analizaron tanto el tiempo promedio en la barra como el tiempo máximo en la barra para cada ratón. Los datos no podían registrarse si el ratón no permanecía en la barra lo suficiente antes de comenzar (~3 segundos), y sólo hubo 1 ratón que no permaneció encima el tiempo suficiente como para comenzar los tres ensayos.

35 *La tarea de evitación pasiva.* La tarea de evitación pasiva es una prueba de condicionamiento clásica usada para valorar la memoria a corto o largo plazo para ratones y ratas. El aparato de evitación pasiva consiste en compartimentos iluminados y oscuros de igual tamaño con una bombilla fija en el centro del techo del compartimento iluminado. El suelo consiste en una rejilla de metal conectada a un aparato de descarga eléctrica. Los dos

compartimentos están separados por una trampilla. El día de aprendizaje (día 1), se colocó un ratón en el compartimento iluminado y se registró el tiempo necesario para entrar en el compartimento oscuro y se denominó latencia inicial. Inmediatamente después de que el ratón entrara en la cámara oscura, se cerró automáticamente una puerta y se suministró una descarga eléctrica en las patas (0,7 mA) durante 3 segundos. Veinticuatro horas después de la prueba de adquisición, se realizó una segunda prueba de retención y el tiempo que tarda el ratón en entrar en el compartimento oscuro se designó como latencia de retención (RL, por sus siglas en inglés; registrado hasta un máximo de 500 segundos, no se administra descarga durante esta entrada). Se realizaron pruebas de la t para comparar los efectos de IgG I.N. WT frente a TG.

Mientras que las pruebas de RAWM, MWM con plataforma oculta y el laberinto de Barnes mostraron todos evidencia de aprendizaje y aprendizaje mejorado en ratones WT que en ratones TG, esta prueba mostró sistemáticamente el efecto contrario, independientemente del tratamiento farmacológico. No hubo evidencia de un efecto farmacológico entre los grupos transgénicos (tabla 24, tabla 52, tabla 53 y tabla 54).

Tabla 52. Latencia de escape del día de aprendizaje de evitación pasiva (s).

	Esc. de aprendizaje	Error est.
TG-Low (N = 17)	44,5	9,4
TG-High (N = 19)	46,3	7,6
TG-Saline (N = 15)	43,7	9,2
WT-High (N = 17)	21,6	6,4
WT-Saline (N = 18)	22,4	3,9
TG ALL (N = 51)	44,9	4,9
WT ALL (N = 35)	22	3,6

Tabla 53. Latencia de escape del día de prueba de evitación pasiva (s).

	Esc. de prueba	Error est.
TG-Low (N = 15)	224,6	8,5
TG-High (N = 17)	229,5	8,3
TG-Saline (N = 13)	207,0	16,8
WT-High (N = 16)	114,3	22,0
WT-Saline (N = 18)	153,8	20,9
TG ALL (N = 45)	221,4	4,9
WT ALL (N = 34)	135,2	3,6

Tabla 54. Promedio de evitación pasiva de diferencias de latencia de escape (s).

	Promedio de diferencias	Error est.
TG-Low (N = 15)	190,2	8,5
TG-High (N = 17)	191,9	8,2
TG-Saline (N = 13)	175,1	16,8
WT-High (N = 16)	98,8	22,4
WT-Saline (N = 18)	131,4	21,4
TG ALL (N = 45)	186,5	6,3
WT ALL (N = 34)	116,1	15,5

Esta prueba demostró un efecto de TG inesperado. Mientras que los ratones TG con problemas de memoria normalmente deberían tener problemas para recordar no entrar en la cámara oscura y recibir una descarga después del entrenamiento, este no fue el caso. Los ratones TG generalmente no entraron en la cámara el día de prueba, mientras que a los ratones WT no pareció importarles si recibían una descarga el día de prueba. Estos resultados pueden verse en la tabla 52, la tabla 53 y la tabla 54. El bajo rendimiento de los ratones WT en comparación con los ratones TG es estadísticamente significativo ($p < 0,05$; tabla 24). La misma disposición para que los ratones WT entren en la cámara oscura puede verse en la fase de aprendizaje y puede desempeñar un papel en la disposición de los ratones WT normales para recibir una descarga dolorosa.

Para la tarea de evitación pasiva, se registraron la latencia de escape tanto en el día de aprendizaje (día 1) como en el día de prueba (día 2) y se calculó la diferencia entre la latencia de escape entre los días de prueba y de aprendizaje. Los ratones no ejecutaron la prueba el día de prueba (día 2) si no recibieron una descarga el día 1, que incluyó 7 ratones distribuidos en 4 grupos. Los ratones no recibieron una descarga simplemente porque no entraron en la cámara oscura. No se calcularon valores aberrantes. Se realizaron análisis para el ensayo de aprendizaje y el ensayo de prueba.

Laberinto de agua de Morris con plataforma visible. No se esperaban diferencias en el rendimiento en esta prueba, ya que todos los ratones se sometieron a prueba genéticamente para el gen RD1 y los ratones no tenían problemas de visión. No hubo efecto de modelo transgénico. Todos los grupos rindieron esencialmente igual y no hubo diferencias estadísticas entre los grupos (tabla 24). La única diferencia estadística se provino del ensayo 1, debido a un fuerte

5 rendimiento de WT-Sal que no se trasladó a ensayos posteriores. Tampoco hubo evidencia de un efecto farmacológico entre los grupos transgénicos (tabla 24, tabla 55, tabla 56, tabla 57 y tabla 58). Sin embargo, al igual que con las pruebas de MWM con plataforma oculta, hubo una tendencia de que los ratones WT-high superaran a todos los demás grupos (tabla 55, tabla 56, tabla 57 y tabla 58). Las comparaciones de prueba de la t entre WT-Sal y WT-high para cada ensayo individual no fueron significativas, pero una prueba de la t para todos los ensayos entre estos dos grupos tuvo un valor de p de 0,06.

Tabla 55. Escape visual (s) por grupo de tratamiento.

Grupo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Promedio
TG-Low (N = 18)	34,83	33,44	39,17	30,22	33,44
TG-High (N = 18)	31,44	33,67	35,33	37,89	33,67
TG-Saline (N = 16)	23,19	36,56	29,75	28,94	36,56
WT-High (N = 16)	28,25	23,44	23,13	22,00	23,44
WT-Saline (N = 18)	29,78	29,06	26,11	25,50	29,06

10 Tabla 56. Escape visual (s) por grupo de tratamiento con incumplimiento eliminado.

Grupo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Promedio
TG-Low (N = 13)	30,46	29,15	31,15	18,77	29,15
TG-High (N = 13)	21,69	27,92	25,85	29,38	27,92
TG-Saline (N = 14)	17,93	33,21	25,43	24,50	33,21
WT-High (N = 14)	25,07	18,57	17,86	16,57	18,57
WT-Saline (N = 17)	31,41	27,24	24,12	23,47	27,24

Tabla 57. Escape visual (s) por grupo de genotipo.

Grupo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Promedio
TG ALL (N = 52)	30,08	34,48	34,94	32,48	34,48
WT ALL (N = 34)	29,06	26,41	24,71	23,85	26,41

Tabla 58. Escape visual (s) por grupo de genotipo con incumplimiento eliminado.

Grupo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Promedio
TG ALL (N = 40)	23,23	30,18	27,43	24,23	30,18
WT ALL (N = 31)	28,55	23,32	21,29	20,35	23,32

15 Para MWM con plataforma visible, se recogió la latencia de escape (tiempo para encontrar la plataforma). Se realizaron pruebas de la t para cada día de cada ensayo (1-4). Se analizaron los datos con ratones que no cumplían eliminados para representar con mayor precisión la memoria. Los ratones que no cumplían se definieron como cualquier ratón que tuviera latencias de escape de 60 segundos (el tiempo completo asignado) para los ensayos 3 y 4, cuando deberían haber estado aprendiendo en cierta medida. Se registró el porcentaje de ratones que no cumplían para cada grupo. Para las pruebas de plataforma visible, el incumplimiento fue el siguiente: TG-Low = 6,9%; TG-High = 6,9%; TG-Saline = 3,1%; WT-High = 3,1%; y WT-Saline = 1,4%.

25 *Ejemplo 8 - ¹²⁵I-IgG radiomarcada llega al SNC con la administración intranasal*

Se realizó un estudio para determinar la viabilidad y optimizar los métodos usados para determinar la cantidad de ¹²⁵I-IgG radiomarcada administrada por vía intravenosa e intranasal que alcanza el SNC en ratas y ratones en un punto de tiempo de dos horas.

30 *Diseño experimental:* Hubo dos fases de este experimento. En la fase 1, se usaron seis ratones y ratas para someter a prueba una variedad de métodos diferentes, incluyendo anestesia con supervivencia de 2 horas, métodos de administración de fármacos (infusión intravenosa a través de canulaciones de la vena yugular en ratas y ratones, método de sonda intranasal en ratas), perfusión transcárdica (con y sin un detergente no iónico) y procesamiento de tejidos para la depleción de capilares y recuento en contador gamma. Los animales y los métodos sometidos a prueba con cada uno se muestran en la tabla 51.

35 Tabla 59. Diseño experimental de la fase 1 del ejemplo 8. R = rata y M = ratón (*mice*).

Animal	Cirugía	Administración I.V.	Administración I.N.	Perfusión	Diseción cerebral
1a-R-1	Canulación de la vena yugular	Sin infusión	Método de sonda I.N.	Solución salina	Extirpación del cerebro completo
1a-R-2	Canulación de la vena yugular	BSA 2 mg/ml hasta la muerte	Método de sonda I.N.	Triton X al 0,05%	Extirpación del cerebro completo

1a-R-3	Canulación de la vena yugular	BSA 2 mg/ml a lo largo de 1 hora	Método de sonda I.N.	Solución salina	Depleción de capilares
1a-R-4	Canulación de la vena yugular	Sin infusión	Sin administración I.N.	Triton X al 0,1%	Extirpación del cerebro completo
1a-R-5	Canulación de la vena yugular	Sin infusión	Método de sonda I.N.	Triton X al 0,1%	Extirpación del cerebro completo
1a-R-6	Canulación de la vena yugular	Sin infusión	Sin administración I.N.	Solución salina	Depleción de capilares
1a-M-1	Canulación de la vena yugular	Sin infusión	Sin administración I.N.	Solución salina	Depleción de capilares
1a-M-2	Canulación de la vena yugular	BSA 2 mg/ml a lo largo de 1 hora	Sin administración I.N.	Triton X al 0,05%	Extirpación del cerebro completo
1a-M-3	Canulación de la vena yugular	BSA 2 mg/ml a lo largo de 1 hora	Sin administración I.N.	Triton X al 0,1%	Extirpación del cerebro completo
1a-M-4	Canulación de la vena yugular	BSA 2 mg/ml a lo largo de 1 hora	Sin administración I.N.	Solución salina	Extirpación del cerebro completo
1a-M-5	Canulación de la vena yugular	IgG 8 g/kg a lo largo de 1 hora	Sin administración I.N.	Triton X al 0,05%	Extirpación del cerebro completo
1a-M-6	Canulación de la vena yugular	IgG 8 g/kg a lo largo de 1 hora	Sin administración I.N.	Triton X al 0,05%	Extirpación del cerebro completo

En la fase 2, se sometieron a prueba tres técnicas de procesamiento de tejidos después de la administración de IGIV a dosis alta en 18 ratas para determinar la técnica óptima de los experimentos de fase 1 posteriores. Las 18 ratas se dividieron en 3 grupos experimentales (tabla 60).

5

Tabla 60. Grupos experimentales para la fase 2.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dosis de ¹²⁵ I-IGIV	200 mg	200 mg	200 mg
Perfusión	140 ml de solución salina	140 ml de solución salina con depleción de capilares	90 ml de solución salina, 25 ml de Triton X-100 al 0,025%, 25 ml de solución salina
n =	6 ratas	6 ratas	6 ratas

Se usaron ratas Sprague Dawley macho adultas (N = 6, peso promedio de 250 g) y ratones C57blk macho adultos (n = 6, 7-8 semanas) para la fase 1. Se usaron ratas Sprague Dawley macho adultas (N = 18, peso promedio de 264 g) para la fase 2. Los animales se alojaron por parejas con libre acceso a alimentos y agua y se mantuvieron en un ciclo de luz de 12 h.

10

Antes de comenzar los experimentos de fase 1 y 2, se permitió que los animales se normalizaran en la instalación durante un periodo de tres días antes de que tuviera lugar la manipulación. Los animales se aclimataron lentamente a la manipulación por humanos durante un periodo de aproximadamente dos semanas. Se les dan golosinas de alimentos enriquecidos después de la manipulación para fomentar un vínculo humano-animal mientras avanza el proceso de aclimatación. Las técnicas de sujeción se mantuvieron breves y se facilitaron mediante el uso de una toalla, dispositivo de sujeción o cogiéndolos por el pescuezo, cuando se trabaja con ratones.

15

20

Se usó un cóctel de anestesia que contenía ketamina HCl (30 mg/kg), xilazina HCl (6 mg/kg) y acepromazina (1 mg/kg). Toda la anestesia se administró como inyecciones subcutáneas. Los refuerzos alternaron entre el cóctel

anterior y ketamina 50 mg/kg. Se sometieron a prueba los reflejos para valorar el nivel de anestesia cada 10-15 minutos en la totalidad del estudio.

La administración intranasal en ratas se realizó con una punta de pipeta especializada. La punta de pipeta especializada se insertó en las narinas de las ratas. La punta de pipeta se creó cortando 23 mm del extremo de una punta de pipeta de carga de gel y uniendo un tubo flexible de 16 mm de longitud (DI = 0,04 mm, DE = 0,07 mm). El tubo flexible se colocó sobre el extremo ancho de la punta de pipeta con un solapamiento de 5,5 mm, y se realizó una marca negra con un rotulador Sharpie a 14,5 mm del extremo más estrecho de la punta de pipeta. El extremo estrecho se insertó finalmente en la nariz de la rata hasta la marca negra.

Para la administración intranasal, la rata completamente anestesiada se colocó sobre su lomo sobre una almohadilla térmica en una bandeja quirúrgica de metal. La almohadilla de calentamiento y la sonda rectal se usaron para mantener la temperatura central de la rata a 37°C. Se colocó una almohadilla de gasa de 2" x 2" en una almohada y se pegó con cinta adhesiva de manera segura. Luego se colocó la almohada debajo del cuello de la rata para asegurar que el lado inferior desde el orificio nasal hasta el torso estuviera plano y en horizontal.

Se colocó un blindaje impregnado de plomo entre la bandeja quirúrgica y el experimentador para la protección contra la radiación. La disolución de dosificación, la pipeta, las puntas de pipeta y el recipiente de desechos se colocaron detrás del blindaje para facilitar el acceso. La punta de pipeta modificada se insertó en la narina de la rata hasta la marca negra. La muestra que iba a administrarse (40-50 μ l) se extrajo en un pipeteador, la punta del pipeteador se colocó en el tubo abierto al final de la punta de pipeta modificada (mientras se mantiene cuidadosamente la punta de pipeta modificada en su lugar en la nariz de la rata), y luego se expulsó la dosis completa lentamente en el orificio nasal de la rata.

Después de que se sacrificaron los animales, se extirparon sus cerebros para su análisis. Con unas tijeras quirúrgicas grandes, se retiró la cabeza del animal cortando de manera dorsal a ventral para evitar la contaminación. Usando un bisturí, se cortó el pelaje y la piel en la parte superior del cráneo desde la nariz hasta el punto de decapitación. Se plegó la piel hacia atrás y se sostuvo con una pequeña almohadilla de gasa para dejar al descubierto la parte superior del cráneo. Usando una pinza hemostática pequeña, se separó el resto de la columna vertebral dejando al descubierto la médula espinal cervical superior y el rombencéfalo (cerebelo). A continuación, se retiró la parte superior del cráneo hasta los bulbos olfativos dejando al descubierto todo el lado dorsal del cerebro. Se insertó la pinza hemostática con una cuchilla raspando la superficie ventral del cráneo. Esto aseguró que se mantuviera la integridad de la superficie dorsal del cerebro. Se usó una pequeña espátula para aflojar las superficies laterales del cerebro del cráneo y la duramadre. Se invirtió el cerebro sobre una placa de Petri limpia. Se cortó el nervio óptico, lo que liberó el cerebro del cráneo. Se valoró el cerebro por la calidad de perfusión.

Se colocó el cerebro con la parte dorsal hacia arriba. Se usó una cuchilla de afeitar de un único filo para separar los bulbos olfativos del cerebro en el ángulo natural. Se recogieron los bulbos olfativos. Se usaron cuchillas de afeitar para cortar el cerebro en siete secciones coronales (véase la figura 5). Cada sección se sometió a hemisección y se colocó en tubos para recuento.

Para la eliminación capilar, se pesó cada sección del cerebro y se transfirió a un homogeneizador de vidrio molido enfriado con hielo. Se añadió al homogeneizador un volumen de 2,857 veces el peso de muestra de tejido del tampón, pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 141 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2,8 mM, MgSO₄-H₂O 1 mM, NaH₂PO₄ 1 mM y D-glucosa 10 mM). Se homogeneizó la muestra de cerebro usando golpes verticales. Se añadió un pequeño volumen de disolución de dextrano al 26% a la muestra de cerebro homogeneizada para proporcionar una concentración final de dextrano del 15,5% en el homogeneizado. Entonces se agitó el vórtex del homogeneizado, se homogeneizó por segunda vez con golpes verticales y luego se decantó en un pequeño tubo de centrifuga de vidrio. Luego se centrifugó el homogeneizado en un rotor de cubeta oscilante durante 15 minutos a 4°C a una velocidad de 5400 x g. Se separó el homogeneizado en las siguientes capas: un sedimento inferior que contenía los segmentos capilares, una capa de líquido transparente y una capa superior de "crema" que contenía el tejido nervioso. Usando una pipeta de transferencia, se transfirieron las capas de crema y líquido transparente a nuevos tubos. Se determinó la radiactividad del sobrenadante y el sedimento usando un contador gamma.

Resultados: Los datos de la fase 2 muestran que 125I-IGIV intravenosa llegó al sistema nervioso central. Los animales con procesamiento de tejido de depleción de capilares tuvieron la mayor cantidad de IGIV en el tejido cerebral (49.791 ng). Los animales sometidos a perfusión con Triton X al 0,025% como segundo perfundido tenían la menor cantidad de IGIV en el tejido cerebral (33.855 ng) (tabla 61 y tabla 62). El sedimento de depleción de capilares que debería contener toda la IGIV adherida a las paredes de los capilares sólo representaba ~ el 3% de la IGIV cerebral completa en esos animales (tabla 63). La baja cantidad de IGIV en el sedimento capilar podría ser el resultado de la fricción de homogeneización durante el procesamiento, liberando la IGIV adherida a las paredes de los capilares y permitiendo que se mezcle con el sobrenadante en lugar de permanecer con los capilares en el sedimento.

Tabla 61. ¹²⁵I-IGIV presente en el sistema nervioso central medido en CPM.

Rata	Método	CPM total cerebro completo	CPM total Líquido	CPM total Sedimento	CPM total Hemisferio derecho	CPM total Hemisferio izquierdo	Perfundido (CPM/ul)	
							(2°)	(3°)
1b-1	Depl. cap.	68.554	65.326	3.228	30.687	37.867		
1b-4	Depl. cap.	40.791	39.372	1.419	28.352	12.439		
1b-7	Depl. cap.	29.048	28.229	819	13.374	15.674		
1b-10	Depl. cap.	15.498	14.851	647	8.104	7.393		
1b-13	Depl. cap.	47.908	46.533	1.376	28.757	19.151		
1b-16	Depl. cap.	69.964	68.128	1.836	29.458	40.505		
1b-3	Control	98.341			52.972	45.368	278	356
1b-6	Control	21.141			10.557	10.584	112	144
1b-11	Control	36.457			19.077	17.380	141	121
1b-15	Control	28.303			14.228	14.075	126	66
1b-17	Control	20.524			9.508	11.016	231	127
1b-18	Control	38.683			19.350	19.333	125	73
1b-2	Triton X	36.984			16.622	20.362	540	216
1b-5	Triton X	49.882			25.617	24.264	98	219
1b-8	Triton X	19.194			11.031	8.163	243	sin muestra
1b-9	Triton X	33.716			15.026	18.690	422	82
1b-12	Triton X	21.255			7.639	13.616	527	151
1b-14	Triton X	14.013			6.712	7.301	441	117
	Depl. cap. promedio	45.294	43.740	1.554	23.122	22.172		
	Control promedio	40.575			20.949	19.626	169	148
	Tritón X promedio	29.174			13.775	15.399	379	157

Tabla 62. ng por grupo

Rata	Método	ng totales cerebro completo	ng totales Líquido	ng totales Sedimento	ng totales Hemisferio derecho	ng totales Hemisferio izquierdo	Perfundido (ng/ul)	
							(2°)	(3°)
1b-1	Depl. cap.	68.537	65.310	3.227	30.679	37.858		
1b-4	Depl. cap.	45.383	43.804	1.579	31.544	13.840		
1b-7	Depl. cap.	32.060	31.156	904	14761	17.300		
1b-10	Depl. cap.	18.231	17.470	761	9.534	8.697		
1b-13	Depl. cap.	57.258	55.614	1.644	34.369	22.889		
1b-16	Depl. cap.	77.276	75.248	2.028	32.537	44.739		
1b-3	Control	108.404			58.393	50.011	306	392
1b-6	Control	24.824			12.397	12.428	132	169
1b-11	Control	35.411			18.530	16.881	137	118
1b-15	Control	36.686			18.442	18.244	163	86
1b-17	Control	25.940			12.017	13.923	292	160

1b-18	Control	50.757			25.390	25.367	165	95
1b-2	Triton X	46.547			20.921	25.626	680	272
1b-5	Triton X	56.294			28.910	27.383	111	247
1b-8	Triton X	22.577			12.975	9.601	285	sin muestra
1b-9	Triton X	39.032			17.396	21.637	488	95
1b-12	Triton X	22.099			7.943	14.157	548	157
1b-14	Triton X	16.581			7.942	8.639	522	138
Depl. cap. promedio		49.791	48.101	1.690	25.571	24.220		
Control promedio		47.004			24.195	22.809	199	170
Tritón X promedio		33.855			16.014	17.841	439	182

Tabla 63. ng por grupo.

	ng est. en sangre *	ng est. en 2º perfundido	ng est. en el 3º perfundido	Porcentaje est. en sangre	Porcentaje de ng administrados (cerebro completo)	Porcentaje de cerebro completo (líquido)	Porcentaje de cerebro completo (sedimento)	Porcentaje de ng administrados (2º perfundido)	Porcentaje de ng administrados (3º perfundido)
Depl. cap promedio	124.564.379			62%	0,02%	97%	3%		
Control promedio	151.853.766	4.978.470	4.249.634	76%	0,02%			2,5%	2,1%
Tritón X promedio	134.662.521	10.980.039	4.543.372	67%	0,02%			5,5%	2,3%

* El volumen de sangre total estimado se determinó como el peso corporal multiplicado por 0,06 más 0,77 (Lee y Blafox, 1985).

5

Los métodos de perfusión con Triton X dieron como resultado una reducción del 28% de la concentración de IGIV en cerebro completo frente al control de perfusión salina. El perfundido debe mostrar la cantidad de IGIV eliminada de los vasos sanguíneos en el transcurso de los 25 ml (perfundidos a una velocidad de 15 ml/min). Se contaron tres muestras de 250 µl de cada perfundido en el contador gamma. Se calcularon los promedios de los tres. Para determinar la cantidad total de IGIV en cada perfundido, se determinó la concentración de IGIV ng/µl y se multiplicó por 25000 (los 25 ml de perfundido usados). Los primeros perfundidos (~90 ml a 15 ml/min) no se recogieron ya que esta etapa fue igual en todos los animales en el estudio. En el grupo sometido a perfusión con Triton X al 0,025%, se retiró más cantidad de ¹²⁵I-IGIV (439 ng/µl) que en los grupos sometidos a perfusión con solución salina (199 ng/µl). Esta diferencia no se vio en los 3º perfundido, destinado a eliminar cualquier cantidad restand de Tritón X de los vasos sanguíneos (170 ng/µl y 182 ng/µl, respectivamente) (tablas 1 y 2), lo que sugiere que se logró la eliminación máxima de IGIV de los vasos a esta concentración de Tritón X. Una mayor concentración de Tritón X en el perfundido puede producir una reducción adicional.

En estos resultados, aproximadamente el 0,02% de la IGIV administrada total que se infundió llegó al cerebro (tabla 55) en todos los métodos. Durante los experimentos de la fase 2, se observó que los tejidos cerebrales eran ligeramente rosados, lo que sugiere que el volumen total perfundido no era adecuado para retirar completamente la sangre del cerebro. Esta ligera coloración apareció de manera sistemática en todos los animales en cada grupo experimental. Un aumento del volumen total de perfundido en la siguiente fase debería resolver este problema.

25 Ejemplo 9 - Biodistribución de IgG administrada por vía intranasal e intravenosa en ratones

Se realizó un estudio para comparar la biodistribución de inmunoglobulina G (IgG) humana combinada administrada a ratones por vía intranasal e intravenosa. Se determinaron la administración de IgG al cerebro y la IgG residual en el torrente sanguíneo.

5 *Diseño experimental:* IgG radiomarcada con yodo-125 (¹²⁵I-IgG) o bien se infundió en la vena femoral izquierda (administración intravenosa; I.V.) o bien se administró por vía intranasal (I.N.) en forma de gotas a ratas anestesiadas a lo largo de 14 minutos. Se sacrificaron los animales y se determinaron las concentraciones de ¹²⁵I-IgG en el cerebro, la sangre y el cuerpo de los ratones en nueve puntos de tiempo diferentes (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 72 h tras la administración de IgG). Se extrajeron muestras de sangre del corazón, se sometieron los animales a perfusión y se extirparon los cerebros. La IgG radiomarcada se detectó con un contador gamma para análisis cuantitativo. La mitad de cada cerebro se procesó en sobrenadante y se hizo pasar a través de una columna de exclusión molecular para explorar la integridad del marcador de ¹²⁵I. A las tres cohortes experimentales se les administró IgG tal como se describe en la tabla 64.

Tabla 64. Grupos de tratamiento asignados para la administración intranasal de IgG.

Cohorte	Dosificación de IgG	Administración
Gotas intranasales - Dosis alta (gota I.N. - alta)	0,02 g/kg	una gota cada 2 minutos a narinas alternas; infusión de solución salina
Gotas intranasales: dosis baja (gota I.N. - baja)	0,002 g/kg	una gota cada 2 minutos a narinas alternas; infusión de solución salina
Dispositivo intranasal - (dispositivo I.N.)	0,02 g/kg	dos inhalaciones a narinas alternas a los 0 y 10 minutos, con infusión de solución salina intravenosa de control
Intravenosa (I.V.)	0,02 g/kg	infusión a la vena femoral izquierda a lo largo de catorce minutos

* 3 ratas/punto de tiempo para un total de 27 ratas por grupo experimental

15 El día de la administración, se retiró cada alícuota de ¹²⁵I-IgG del congelador y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos). Entonces se agitaron suavemente las alícuotas. Se colocó una muestra de 1 µl en 999 µl de agua y se agitó en vórtex (dilución 1:1.000). Se retiraron tres muestras de 20 µl de la dilución y se colocaron en tubos gamma marcados. Se colocaron 10 µl adicionales en 90 µl de agua y se agitó en vórtex (dilución 1:10.000). Se retiraron tres muestras de 20 µl de la dilución 1:10.000 y se colocaron en tubos gamma marcados. Más tarde se cuantificaron los patrones mediante recuento en contador gamma. Todas las dosis dentro de los grupos se igualaron para volumen, peso (mg) y radiactividad (µCi) variando la dilución con solución salina para tener en cuenta la desintegración de ¹²⁵I.

25 En este experimento se usaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (Centro de Cuidado de Animales en el Hospital de la Región de Harlan) con la vena femoral izquierda canulada. Todas las ratas pesaban aproximadamente 250 g para garantizar una dosificación precisa. Los animales se alojaron individualmente con libre acceso a alimentos y agua. Se mantuvieron los animales en un ciclo de luz de 12 horas.

30 Para las administraciones de gota I.N., dispositivo I.N. e I.V., se usó un cóctel de anestesia que contenía ketamina HCl (30 mg/kg), xilazina HCl (6 mg/kg) y acepromazina (1 mg/kg). Se administró toda la anestesia como inyecciones subcutáneas. Los refuerzos alternaron entre el cóctel descrito anteriormente y ketamina 50 mg/kg. Se sometieron a prueba los reflejos para valorar el nivel de anestesia cada 10-15 minutos en la totalidad del estudio. A los animales en grupos sacrificados a las 4 h y más se les permitió recuperarse de la anestesia y volvieron a anestesiarse antes del sacrificio.

35 Para la administración de gota I.N., se colocaron ratas anestesiadas sobre su lomo sobre una almohadilla térmica. Se administró ¹²⁵I-IgG por vía intranasal en forma de 8 gotas nasales x 6 µl con un pipeteador Eppendorf a narinas alternas cada 2 minutos para un volumen total de 48 µl. Se monitorizaron los animales para detectar efectos adversos y niveles de anestesia hasta que se alcanzó el punto de tiempo de sacrificio. Durante la administración intranasal, se infundió una muestra de 500 µl de solución salina a lo largo de 14 minutos a través de la vena femoral izquierda. Todos los animales se hicieron rodar sobre su lomo a los 15 minutos después de completarse la administración.

40 Para la administración con el dispositivo I.N., se colocaron animales anestesiados sobre su lomo y se les insertó un tubo de aproximadamente 14 mm de profundidad en el orificio nasal. El tubo se conectó a un actuador que suministró 15 µl de disolución de dosificación hacia el epitelio olfativo. Se pulverizó un bolo al inicio de la administración, uno se pulverizó a los 10 minutos después del inicio de la administración. Se monitorizaron los animales para detectar efectos adversos y niveles de anestesia hasta que se alcanzó el punto de tiempo de sacrificio. Durante la administración intranasal, se infundió una muestra de 500 µl de solución salina a lo largo de 14 minutos a través de la vena femoral izquierda. Todos los animales se hicieron rodar sobre su lomo a los 15 minutos después de completarse la administración.

50 Para la administración I.V., se colocaron animales anestesiados sobre su lomo. Se insertó una aguja roma de calibre 22 unida a una jeringa de 1 cc en la cánula de la vena femoral. Se preparó ¹²⁵I-IgG en alícuotas de 500 µl y se infundió

a lo largo de 14 minutos. Se monitorizaron los animales para detectar efectos adversos y niveles de anestesia hasta que se alcanzó el punto de tiempo de sacrificio.

5 En el tiempo final experimental, se extrajo sangre directamente del corazón y se sometieron los animales a perfusión con 120 ml de solución salina enfriada con hielo directamente a través del corazón. Se colocó una pequeña gota de sangre en un tubo gamma marcado, pesado previamente y se colocaron aproximadamente 0,6 ml en un tubo separador de suero marcado. Se centrifugó el tubo separador de suero y se recogió el suero. Se diluyó el suero en tampón de homogeneización. Se centrifugó adicionalmente el suero diluido en un dispositivo de filtración por exclusión molecular de 100 kDa. Se recogieron muestras tanto de la parte superior del filtro como de la parte inferior y se colocaron en tubos gamma marcados. El filtro también se recogió y se colocó en un tubo gamma marcado.

10 Se extrajo el cerebro del cráneo y se sometió a hemisección. El hemisferio izquierdo se procesó adicionalmente tal como se describe a continuación. Se pesó el hemisferio derecho, se cortó en 7 trozos y se colocó en tubos gamma marcados.

15 Además, se recogieron por separado los epitelios olfativo y respiratorio. Se esperaba que los epitelios contuvieran mayores cantidades de ¹²⁵I que el límite de cuantificación del contador gamma, por lo que ambos se dividieron en varios trozos. Cada trozo de epitelio se colocó en un tubo gamma marcado, pesado previamente.

20 El hemisferio izquierdo se pesó después de la extracción del cráneo. Se homogeneizó y se centrifugó para recuperar el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente en un dispositivo de filtración por exclusión molecular de 100 kDa. Se recogieron muestras tanto de la parte superior del filtro como de la parte inferior y se colocaron en tubos gamma marcados. Se recogió el sedimento y se colocó en un tubo gamma marcado, pesado previamente. El filtro también se recogió y se colocó en un tubo gamma marcado.

25 Se recogieron muestras de 3-5 mm de tejidos corporales y se colocaron en tubos gamma marcados, pesados previamente. Los tejidos corporales incluyen: hígado, bazo, riñón, intestino delgado, pulmón, esófago, tráquea y sangre (extraída directamente del corazón tal como se describió anteriormente). Los tubos gamma que contenían muestras se sometieron a recuento usando un contador COBRA II Auto-Gamma.

30 **Resultados:** La integridad de IgG en el cerebro fue ligeramente menor con las administraciones intranasales (ejemplo: I.N. alta - 49%, I.N. baja - 49%, dispositivo I.N. - 40% a los 15 minutos) en comparación con la administración intravenosa (69% a los 15 minutos) en los puntos de tiempo anteriores (tabla 65, tabla 66, tabla 67 y tabla 68). Sin embargo, debido al método no validado para calcular la integridad y las limitaciones de la máquina de recuento gamma, ¹²⁵I no intacto o "libre" puede verse magnificado. Los recuentos de CPM de los tubos gamma para alícuotas que representan la "parte inferior" de los tubos del dispositivo de filtración (donde se esperaba la IgG no intacta) fueron bastante bajos en muchos de los animales tratados por vía I.N. Habitualmente, se desea que los recuentos alcancen al menos dos veces el fondo (en este estudio sería ~50 CPM).

40 Tabla 65. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de gotas nasales a dosis alta (0,02 g de IgG/kg).

ug/g de gotas I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta
Tiempo	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h	
ug/g en bruto	92.625.403	99.889.203	97.886.218	111.043.619	101.049.672	99.398.932	78.063.258	108.114.877	76.689.700	
ug/g dosificados (60 uCi)										
ug/g totales										
Epitelio olfativo	585	127	120	938	167	118	20	10	0,56	
Epitelio respiratorio	8.614	11.790	13.222	16.686	5.189	1.312	41	10	2,4	
Hemisferio derecho	0,24	0,22	0,18	0,10	0,11	0,15	0,22	0,16	0,039	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,11	0,272	0,200	0,126	0,095	0,128	0,231	0,145	0,029	
Disolución de	38.594	41.621	40.786	46.268	42.104	41.416	32.526	45.048	31.954	

ES 2 759 226 T3

dosificación (1:1.000)									
ug/g									
Sangre	3,1	3,3	4,4	4,0	3,7	5,3	7,3	5,4	0,8
Hígado	0,23	0,46	0,51	0,43	0,44	1,0	0,9	1,1	0,24
Bazo	0,55	1,1	1,4	1,2	1,4	1,2	2,4	1,5	0,16
Riñón	0,9	1,9	2,7	1,5	1,6	2,8	3,8	2,2	0,39
Intestino delgado	0,32	0,4	0,91	0,75	2,2	2,5	6,3	1,3	0,09
Pulmón	0,9	1,8	1,5	1,0	1,3	2,1	2,4	1,7	0,26
Esófago	0,51	0,61	1,1	0,9	33	126	4,9	6	0,22
Tráquea	0,75	0,77	4,0	1,7	3,0	2,4	17	5	0,25
Integridad									
Cerebro I.N.1	49%	46%	40%	48%	51%	53%	49%	49%	66%
Sangre I.N.1	39%	32%	35%	33%	16%	27%	30%	27%	54%

Tabla 66. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de gotas nasales a dosis baja (0,002 g de IgG/kg).

ug/g gotas I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja	I.N. baja
Tiempo	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h
ug/g dosi- ficados (60 uCi)	91.152.030	71.045.179	83.024.122	109.042.942	102.934.060	64.471.560	78.549.717	12.139.899	64.455.268
ug/g totales									
Epitelio olfativo	118	57,6	58,7	58,0	56	1,9	25,9	6,69	0,571
Epitelio respiratorio	9.930	12.284	10.402	6.716	3.055	101	111	7,8	1,20
Hemisferio derecho	0,060	0,048	0,031	0,020	0,015	0,026	0,032	0,015	0,0044
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,057	0,042	0,023	0,018	0,016	0,027	0,030	0,014	0,0040
Disolución de dosificación (1:1.000)	37.980	29.602	34.593	45.435	42.889	26.863	32.729	30.058	26.856
ug/g									
Sangre	0,41	0,56	0,51	0,44	0,37	0,78	0,99	0,57	0,067
Hígado	0,091	0,09	0,06	0,086	0,061	0,15	0,19	0,12	0,036
Bazo	0,15	0,21	0,31	0,19	0,12	0,38	0,30	0,20	0,023
Riñón	0,22	0,26	0,27	0,1	0,20	0,53	0,63	0,28	0,042
Intestino delgado	0,075	0,16	0,10	0,13	0,18	0,33	0,29	0,058	0,012
Pulmón	0,14	0,25	0,09	0,15	0,17	0,26	0,43	0,29	0,032
Esófago	0,076	0,13	0,13	0,17	14	3,4	0,69	0,47	0,028
Tráquea	0,14	0,36	0,26	0,19	0,58	4	0,50	0,30	0,034

ES 2 759 226 T3

Integridad									
Cerebro I.N.2	49%	46%	45%	48%	50%	65%	48%	49%	72%
Sangre I.N.2	28%	22%	29%	19%	26%	37%	25%	31%	52%

Tabla 67. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de un dispositivo intranasal a dosis alta (0,02 g de IgG/kg).

ug/g Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.	Dispositivo I.N.
Tiempo	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h
ug/g dosificados (60 uCi)	99.099.000	125.565.000	60.108.000	77.362.000	73.446.000	67.726.000	87.418.000	83.486.000	74.898.000
ug/g totales									
Epitelio olfativo	5.076	5.276	2.016	3.917	2.134	381	103	14	1,7
Epitelio respiratorio	5.658	5.970	3.285	6.850	3.099	262	46	10	1,4
Hemisferio derecho	0,6	1,07	1,5	0,22	0,2	0,36	0,23	0,14	0,042
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,831	1,32	0,365	0,229	0,139	0,15	0,202	0,122	0,0527
Disolución de dosificación (1:1.000)	66.067	83.710	40.072	51.575	48.964	45.151	58.279	55.657	49.932
ug/g									
Sangre	11	18	11	8,3	4,7	6,7	5,9	4,7	0,61
Hígado	0,45	4,3	1,6	0,57	0,4	0,8	1,1	0,76	0,23
Bazo	1,4	3,2	4,8	1,7	1,3	2,1	2,3	1,2	0,13
Riñón	1,5	4,9	5,6	2,3	1,3	3,3	3,2	1,0	0,26
Intestino delgado	0,52	1,2	3,2	1,3	1,2	6,6	2,5	0,61	0,079
Pulmón	1,4	4,5	5,9	2,0	1,8	3,1	5,1	3,2	0,17
Esófago	1,5	3,1	4,9	3,4	488	19	2,5	1,3	0,12
Tráquea	1,8	2,5	4,2	22	5,2	3,6	3,3	1,7	0,22
Integridad									
Cerebro I.N.3	40%	44%	46%	43%	45%	46%	51%	47%	66%
Sangre I.N.3	34%	29%	34%	30%	26%	32%	25%	30%	67%

5 Tabla 68. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas mediante infusión intravenosa a dosis alta (0,02 g de IgG/kg).

ug/g I.V. alta	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.
Tiempo	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h
ug/g dosificados (60 uCi)	125.946.138	76.865.000	88.715.556	150.181.389	86.270.833	105.588.889	81.584.098	74.669.134	64.916.672
ug/g totales									

ES 2 759 226 T3

Epitelio olfativo	14,4	19	21	24	7	18	18	12	0,41
Epitelio respiratorio	9,8	14	17	13,1	5,3	20	10	7	0,7
Hemisferio derecho	0,425	0,5	0,6	0,63	0,36	0,34	0,39	0,14	0,038
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,533	0,52	0,56	0,548	0,411	0,306	0,315	0,134	0,036
Disolución de dosificación (1:1.000)	5.038	3.075	3.549	6.007	3.451	4.224	3.263	2.987	2.597
ug/g									
Sangre	141	96	79	59	35	26	13	8	0,8
Hígado	80	34	28	34	25	15	15	10	3,6
Bazo	57	30	28	32	20	14	14	10	2,6
Riñón	112	100	77	59	38	29	29	19	10
Intestino delgado	13,4	8	9	9,2	7,1	5,2	3,1	2,4	0,29
Pulmón	24	89	21	33	13,1	7,2	6,8	4,2	0,7
Esófago	7,0	4	4	5,0	5,7	5,5	2,8	4,3	0,28
Tráquea	9,7	9	11	9,4	8,8	6,3	2,1	5,4	0,34
Integridad									
Cerebro I.V.	69%	68%	63%	59%	56%	56%	48%	51%	68%
Sangre I.V.	94%	92%	94%	90%	83%	74%	57%	53%	79%

Tabla 69. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de gotas nasales a dosis alta (0,02 g de IgG/kg), corregido para la integridad de inmunoglobulina G.

ug/g gotas I.N. alta - corregido para la integridad	Gotas I.N. alta								
Minutos	15	30	60	120	240	480	720	1.440	4.320
Corregido									
Hemisferio derecho	0,12	0,10	0,07	0,05	0,05	0,08	0,11	0,08	0,03
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,05	0,12	0,08	0,06	0,05	0,07	0,11	0,07	0,02
Sangre	1,20	1,07	1,53	1,331	0,604	1,427	2,20	1,47	0,454
Sin corregir									
Hemisferio derecho	0,24	0,22	0,18	0,10	0,11	0,15	0,22	0,16	0,04
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,11	0,27	0,20	0,13	0,10	0,13	0,23	0,15	0,03
Sangre	3,05	3,32	4,38	4,01	3,73	5,27	7,31	5,44	0,84
Calc. de trap.									AUC
Hemisferio derecho	1,6	2,6	3,5	6,0	16,0	22,2	66,6	151,9	270,4

ES 2 759 226 T3

Hemisferio izquierdo (total recuperado)	1,3	3,1	4,2	6,5	13,9	21,6	65,7	129,0	245,4
Sangre	17,0	39,0	86,0	116,1	243,7	435,3	1.323,3	2.777,1	5.038
Calc. de trap. sin corregir									
Hemisferio derecho	3,4	5,9	8,2	12,1	30,7	44,0	137,1	293,1	534,5
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	2,9	7,1	9,8	13,3	26,8	43,0	135,2	250,8	488,8
Sangre	47,8	115,5	251,6	464,2	1.079,2	1.508,9	4.587,5	9.041,8	17.096
Integridad									
Cerebro I.N.1	49%	46%	40%	48%	51%	53%	49%	49%	66%
Sangre I.N.1	39%	32%	35%	33%	16%	27%	30%	27%	54%

Tabla 70. Biodistribución e integridad de IgG administrada a las ratas a través de gotas nasales de dosis baja (0,002 g de IgG/kg), corregido para la integridad de inmunoglobulina G.

ug/g gotas I.N. baja - corregido para la integridad	I.N. baja									
Minutos	15	30	60	120	240	480	720	1.440	4.320	
Corregido										
Hemisferio derecho	0,029	0,022	0,014	0,0096	0,0073	0,017	0,016	0,0072	0,0032	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,028	0,019	0,010	0,009	0,0078	0,0175	0,014	0,0068	0,0029	
Sangre	0,12	0,12	0,14	0,08	0,10	0,28	0,25	0,17	0,035	
Sin corregir										
Hemisferio derecho	0,060	0,048	0,031	0,020	0,015	0,026	0,032	0,015	0,004	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,057	0,042	0,023	0,018	0,016	0,027	0,030	0,014	0,004	
Sangre	0,41	0,56	0,51	0,44	0,37	0,78	1,0	0,57	0,067	
Calc. de trap. corregido										AUC
Hemisferio derecho	0,4	0,5	0,7	1,0	2,9	3,9	8,2	15,0	33	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,4	0,4	0,6	1,0	3,0	3,8	7,7	14,0	31	
Sangre	1,8	4,0	6,9	10,8	45,7	63,7	151,3	302,0	586	
Calc. de trap. sin corregir										
Hemisferio derecho	0,8	1,2	1,5	2,1	4,9	7,1	17,0	27,6	62	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,7	1,0	1,2	2,0	5,1	6,9	15,9	25,9	59	
Sangre	7,3	15,9	28,4	48,8	137,7	212,1	562,4	919,3	1.932	
Integridad										
Cerebro I.N.2	49%	46%	45%	48%	50%	65%	48%	49%	72%	
Sangre I.N.2	28%	22%	29%	19%	26%	37%	25%	31%	52%	

5 Tabla 71. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de un dispositivo intranasal a dosis alta

ES 2 759 226 T3

(0,02 g de IgG/kg), corregido para la integridad de inmunoglobulina G.

ug/g dispositivo I.N. - corregido para la integridad	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3	I.N.3
Min	15	30	60	120	240	480	720	1.440	4.320
Corregido									
Hemisferio derecho	0,23	0,47	0,71	0,09	0,08	0,16	0,12	0,07	0,03
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,33	0,58	0,17	0,10	0,06	0,07	0,10	0,06	0,03
Sangre	3,9	5,3	3,9	2,5	1,2	2,2	1,5	1,4	0,41
Sin corregir									
Hemisferio derecho	0,6	1,1	1,5	0,2	0,2	0,4	0,2	0,1	0,0
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,8	1,3	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
Sangre	11,5	18,2	11,4	8,3	4,7	6,7	5,9	4,7	0,6
Calc. de trap.									AUC
Hemisferio derecho	5,3	17,7	24,0	10,2	28,9	33,6	65,4	133,2	318
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	6,9	11,2	8,0	9,7	15,8	20,5	57,4	132,1	262
Sangre	68,8	137,6	189,9	221,6	409,6	436,8	1.047,2	2.669,4	5.181
Calc. de trap. sin corregir									
Hemisferio derecho	12,3	39,3	52,8	23,1	63,3	70,5	132,6	259,6	654
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	16,2	25,3	17,8	22,0	34,6	42,2	116,4	250,8	525
Sangre	222,4	444,2	591,4	778,3	1.369,6	1.516,1	3.826,3	7.703,8	16.452
Integridad									
Cerebro I.N.3	40%	44%	46%	43%	45%	46%	51%	47%	66%
Sangre I.N.3	34%	29%	34%	30%	26%	32%	25%	30%	67%

Tabla 72. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas mediante infusión intravenosa a dosis alta (0,02 g de IgG/kg), corregido para la integridad de inmunoglobulina G.

ug/g I.V. alta - corregido para la integridad	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.
Minutos	15	30	60	120	240	480	720	1.440	4.320
Corregido									
Hemisferio derecho	0,29	0,35	0,40	0,37	0,20	0,19	0,19	0,07	0,03
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,37	0,36	0,35	0,32	0,23	0,17	0,15	0,07	0,02
Sangre	132,3	88,4	74,0	53,2	28,6	19,2	7,2	4,2	0,6
Sin corregir									
Hemisferio derecho	0,43	0,52	0,628	0,632	0,36	0,34	0,39	0,14	0,038

ES 2 759 226 T3

Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,53	0,52	0,56	0,55	0,41	0,31	0,32	0,13	0,036
Sangre	141,1	96,2	79,1	58,8	34,6	26,1	12,7	7,8	0,80
Calc. de trap.									AUC
Hemisferio derecho	4,8	11,2	23,1	34,6	47,4	45,5	92,7	139,0	398
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	5,4	10,6	20,3	33,3	48,1	38,6	78,6	133,5	369
Sangre	1.655,5	2.437,1	3.817,6	4.908,0	5.738,1	3.165,3	4.074,7	6.898,1	32.694
Calc. de trap. sin corregir									
Hemisferio derecho	7,1	17,2	37,8	59,6	84,8	88,3	191,1	254,9	741
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	7,69	16,56	34,25	67,06	93,15	76,73	230,14	360,25	886
Sangre	1.779,9	2.630,8	4.138,5	5.602,1	7.279,5	4.651,1	7.366,9	12.398,1	45.847
Integridad									
Cerebro I.V.	69%	68%	63%	59%	56%	56%	48%	51%	68%
Sangre I.V.	94%	92%	94%	90%	83%	74%	57%	53%	79%

5 La administración máxima al cerebro de IgG intacta lograda con el dispositivo I.N. intranasal (0,71 µg de IgG/g de tejido) fue casi el doble de la administración máxima al cerebro lograda con la administración intravenosa (I.V.) (0,40 µg de IgG/g de tejido) de la misma dosis (0,02 g/kg), mientras da como resultado una concentración en sangre máxima de 25 veces menos (dispositivo I.N. - 5,3 µg de IgG/g, I.V. - 132 µg de IgG/g) (tabla 71 y tabla 72).

10 El AUC de la exposición cerebral a lo largo de 72 horas fue bastante equivalente con el dispositivo I.N. frente a la administración intravenosa (dispositivo I.N. 318/262 frente a I.V. 398/369 en el hemisferio derecho/izquierdo corregido para la integridad) mientras que el AUC de la exposición a la sangre fue casi seis veces mayor con administración intravenosa (dispositivo 5.181 frente a 32.694 corregido para la integridad; tabla 73).

Tabla 73. Área bajo la curva y concentraciones máximas de 125I-IgG I.N. e I.V. con el tiempo en ratas a las que se les administró IgG humana agrupada a través de I.N.1, I.N.2 o I.V.

AUC - corregido	I.N.1		I.N.2		I.N.3		I.V.	
Hemisferio derecho	270		33		318		398	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	245		31		262		369	
Sangre	5.038		586,		5.181		32.694	
Concentraciones máximas - corregidas	ug/g	tiempo (min)	ug/g	tiempo	ug/g	tiempo	ug/g	tiempo
Hemisferio derecho	0,12	15	0,029	15	0,71	60	0,40	60
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,12	30	0,028	15	0,58	30	0,37	15
Sangre	2,2	720	0,28	480	5,3	30	132	15
AUC - sin corregir	I.N.1		I.N.2		I.N.3		I.V.	

Hemisferio derecho	534		62		654		741	
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	489		59		525		682	
Sangre	17.096		1.932		16.452		45.847	
Concentraciones máximas - sin corregir	ug/g	tiempo (min)	ug/g	tiempo	ug/g	tiempo	ug/g	tiempo
Hemisferio derecho	0,24	15	0,060	15	1,54	60	0,63	120
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,27	30	0,057	15	1,32	30	0,56	60
Sangre	7,3	720	0,99	720	18,2	30	141	15

Los cuatro métodos de administración mostraron concentraciones decrecientes de IgG en el cerebro con el tiempo (tabla 65, tabla 66, tabla 67, tabla 68, tabla 69, tabla 70, tabla 71 y tabla 72). La administración de gotas intranasales al cerebro era dependiente de la dosis (tabla 65, tabla 66, tabla 69 y tabla 70). Los animales tratados con la dosis alta de IgG tenían una concentración en cerebro máxima cuando se corrigió para la integridad (0,12 µg de IgG/g) que era aproximadamente cuatro veces mayor que la concentración en cerebro (0,029 µg de IgG/g) de los animales tratados con la dosis menor de IgG (tabla 69, tabla 70 y tabla 73).

se observó Un segundo pico de ¹²⁵I-IgG en la mayoría de los tejidos en los grupos de administración I.N. (tabla 65, tabla 66 y tabla 67). Este segundo pico puede deberse a un artefacto del modelo animal. Los animales comenzaron a despertarse de la anestesia aproximadamente a las 2 horas y pudieron comer, beber y lamerse normalmente. Como resultado, pueden haber ingerido parte de la IgG residual que tenían en la nariz y haber pasado a través de la nasofaringe hacia la boca y el esófago una vez que estuvieron erguidos. Por tanto, este segundo pico que apareció después de 4 horas es probablemente el resultado de la administración de IgG degradada de sangre al cerebro en lugar de la administración directa de IgG intacta de nariz a cerebro.

Un pequeño grupo de tres ratas también se trató por vía intranasal con una disolución de dosificación sin potenciador (tabla 74). Este grupo tenía sólo un punto de tiempo (30 minutos) y se le dosificó la misma concentración y con el mismo método que el grupo I.N. alta descrito en el ejemplo 9 y la tabla 65. En el punto de tiempo de 30 minutos, la concentración fue mucho menor tanto en el sistema respiratorio (2.097 µg de IgG/g) como en el olfativo (37 µg de IgG/g) en comparación con el grupo I.N. alta a los 15 minutos (8.614 µg de IgG/g y 585 µg de IgG/g) y los 30 minutos (11.790 µg de IgG/g y 127 µg de IgG/g) respectivamente. El hemisferio derecho es igual (0,22 µg de IgG/g tanto para el grupo alto I.N. como sin potenciador), sin embargo, el hemisferio izquierdo es mucho menor (0,04 µg de IgG/g) en comparación con el grupo I.N. alta.

Tabla 74. Biodistribución e integridad de IgG administrada a ratas a través de gotas nasales a dosis alta (0,02 g de IgG/kg) (I.N. alta) en comparación con la IgG administrada con una disolución de dosificación sin potenciador (I.N.4).

ug/g I.N. alta	I.N. alta	I.N. alta	I.N.4
ug/g en bruto	15 min	30 min	30 min
ug/g dosificados (60 uCi)	92.625.403	99.889.203	685.291.111
ug/g totales			
Epitelio olfativo	585	127	37
Epitelio respiratorio	8.614	11.790	2.097
Hemisferio derecho	0,24	0,22	0,22
Hemisferio izquierdo (total recuperado)	0,11	0,27	0,04
Disolución de dosificación (1:1.000)	38.594	41.621	27.412
ug/g			
Sangre	3,1	3,3	6,9
Hígado	0,23	0,46	0,3
Bazo	0,55	1,1	0,8
Riñón	0,9	1,9	2,6

Intestino delgado	0,32	0,4	0,6
Pulmón	0,9	1,8	1,1
Esófago	0,51	0,61	1,1
Tráquea	0,75	0,77	1,3
Integridad			
Cerebro I.N.1	49%	46%	39%
Sangre I.N.1	39%	32%	37%

5 Se calculó la biodisponibilidad como el porcentaje de CPM medidas en el cerebro (o volumen de sangre estimado) de la cantidad total de CPM administradas. La administración a través del dispositivo intranasal dio como resultado la mayor biodisponibilidad de todos los métodos (0,037% a los 30 min) y fue dos veces mayor que la biodisponibilidad máxima con la administración intravenosa (0,018% a las 2 h) (tabla 75 y tabla 76).

Tabla 75. Biodisponibilidad - Cerebro (% de CPM administradas que llegaron al cerebro – sin corregir para la integridad).

Tiempo	I.N. alta	I.N. baja	Dispositivo I.N.	I.V.
15 min	0,0037%	0,016%	0,020%	0,015%
30 min	0,0072%	0,014%	0,037%	0,016%
1 h	0,0056%	0,008%	0,030%	0,018%
2 h	0,0034%	0,0053%	0,007%	0,0180%
4 h	0,0030%	0,0047%	0,004%	0,012%
8 h	0,0041%	0,008%	0,006%	0,010%
12 h	0,0068%	0,010%	0,006%	0,011%
24 h	0,0047%	0,0045%	0,0039%	0,0041%
72 h	0,0010%	0,0012%	0,0014%	0,0011%

10 Tabla 76. Biodisponibilidad: sangre (% de CPM administradas que llegaron al cerebro, no se corrigió la integridad).

Tiempo	I.N. alta	I.N. baja	Dispositivo I.N.	I.V.
15 min	1,09%	1,47%	4%	50,3%
30 min	1,18%	2,0%	6%	34,3%
1 h	1,56%	1,8%	4%	28,2%
2 h	1,43%	1,58%	3%	21,0%
4 h	1,33%	1,32%	1,7%	12,3%
8 h	1,9%	2,8%	2,4%	9,3%
12 h	2,6%	3,5%	2,1%	4,5%
24 h	1,9%	2,0%	1,7%	2,79%
72 h	0,30%	0,24%	0,22%	0,29%

Además de ser una opción menos invasiva que la infusión intravenosa, se espera que el aumento del direccionamiento al cerebro (es decir, menos exposición a sangre y sistémica) que se logra usando gotas I.N. o un dispositivo I.N. reduzca el riesgo de efectos secundarios sistémicos de la terapia con IgG.

15 *Ejemplo 10 - Estabilidad de IgG administrada mediante gotas I.N. y dispositivo I.N. y direccionamiento al epitelio olfativo*

20 Se comparó la estabilidad de IgG administrada mediante gotas I.N. y el dispositivo I.N. o I.V. para determinar los modos de administración óptimos. Se midió la degradación y agregación de la IgG administrada a través del dispositivo I.N. y se evaluó el direccionamiento olfativo.

Estabilidad de IgG: Se compararon muestras de IgG pulverizada desde el dispositivo I.N. con la disolución de IgG no

pulverizada (representativa de las gotas I.N. y de IGIV). Se prepararon cinco formulaciones de IgG y se dividieron en grupos de ensayo de pulverización y disolución (A = 25% de IgG agrupada, B = 5% de IgG agrupada, C = 10% de IgG agrupada, D = 20% de IgG agrupada, E = 25% de IgG agrupada). Las muestras de IgG pulverizadas y en disolución se procesaron en geles reductores y no reductores. Los geles o bien se tiñeron o bien se sometieron a inmunotransferencia de la siguiente manera: 1) un gel no reducido teñido con Coomassie, y 2) un gel de SDS-PAGE reductor que se sometió a inmunotransferencia de tipo Western y se tiñó con Coomassie.

En el gel no reducido (figura 6A), no hubo agregados aparentes de orden superior o formas de degradación de IgG tanto para la IgG pulverizada como en disolución. En la inmunotransferencia de tipo Western reducida (figura 6B), se observó IgG intacta, así como los fragmentos de cadena pesada (HC) y de cadena ligera (LC) de la IgG. También se observaron combinaciones de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC) en el gel reductor. Según estos resultados, la pulverización de IgG a través de un dispositivo I.N. no aumenta la degradación de IgG ni aumenta la agregación de IgG.

Direccionamiento al epitelio olfativo: Se administró IgG a ratas con el dispositivo intranasal y con gotas intranasales. A una disolución al 25% de IgG formulada en tampón de histidina se le añadieron cantidades conocidas de un indicador de fluoresceína al 0,01%. Luego se administró por vía intranasal a una rata usando un dispositivo intranasal o gotas y se obtuvo una imagen del cerebro de la rata para detectar la deposición neural de IgG-fluoresceína.

Se representan imágenes representativas del patrón de deposición de IgG intranasal (menos de 2 minutos después de la administración del fármaco) en las figuras 7A y 7B. La figura 7A muestra la deposición después de la administración con el dispositivo de 15 μ l de disolución de IgG al 25% a la que se añadieron cantidades conocidas de un indicador de fluoresceína al 0,01% en una rata. La figura 7B muestra el patrón de deposición después de la deposición del mismo compuesto que se administró con gotas nasales. Tal como se puede verse mediante la figura 7, existe una mayor tinción del epitelio olfativo (OE) mediante la administración con el dispositivo.

Ejemplo 11- La administración intranasal de IgG disminuye el área del cerebro cubierta por placas

Se diseñó un experimento para valorar el efecto de la IgG intranasal sobre las placas cerebrales y el amiloide vascular. La tinción con rojo Congo de cerebros de ratón Tg2576 reveló una disminución del área cubierta por placas, el número de placas y la intensidad total de las placas en los grupos de tratamiento intranasal de IgG tanto a dosis baja como a dosis alta. La disminución se aproxima a la reducción de β -amiloide identificada con inmunotinción en la corteza. Por ejemplo, en el grupo de dosis baja, el amiloide disminuyó en el 25,7% cuando se valoró con IHC y en el 22% cuando se analizó con Rojo Congo. Sin embargo, a diferencia de la inmunotinción, la reducción de la tinción de placas con rojo Congo no alcanzó un nivel de significación estadística.

La reducción de placas de amiloide no se observó con el amiloide vascular en los grupos de IgG a dosis baja ni de dosis alta. Aunque no es estadísticamente significativo, se observó un ligero aumento del amiloide vascular con el grupo de IgG a dosis alta.

Diseño experimental: El objetivo de este estudio fue determinar si el tratamiento con IgG intranasal altera la placa y/o el amiloide vascular en el cerebro de ratones Tg2576. A los 9 meses de edad, se trataron los ratones por vía intranasal con IgG o solución salina tres veces a la semana durante 7 meses (se proporciona una descripción de los grupos experimentales en la tabla 15). A los 16 meses de edad, tuvieron lugar pruebas conductuales y a los 17 meses de edad, se sacrificaron 12 ratones por grupo (perfusión transcardiaca con solución salina) y se recogió tejido cerebral para su análisis. Se sometió el cerebro a hemisección sagitalmente, se fijó la mitad derecha en formalina, se incrustó en parafina y se seccionó a 5 μ m. Se usaron secciones de aproximadamente 2,5 mm desde la línea media sagital para la tinción con rojo Congo.

Se analizó la cuantificación tanto de la placa como del amiloide vascular en los cerebros de los grupos de control, WT-PBS y WT-High Dose, y los grupos experimentales Tg2576, Tg-PBS, Tg-Low Dose (400 μ g/kg/2 semanas) y Tg-High Dose (800 μ g/kg/2 semanas) mediante tinción con rojo Congo y microscopía fluorescente. En este procedimiento, se tiñeron secciones sagitales con un procedimiento convencional de rojo Congo y se obtuvieron imágenes fluorescentes usando un microscopio confocal espectral Nikon A1. Específicamente, se usó el software de obtención de imágenes NIS Elements para controlar la adquisición y el análisis. Se usó un objetivo con un aumento de 10X para capturar imágenes. Con este aumento, los vasos sanguíneos más pequeños podían distinguirse fácilmente de las placas. Con este aumento, se necesitó un mosaico de 6x5 de 30 imágenes (solapamiento del 5%) para capturar la sección de cerebro completa. Cada una de estas 30 imágenes se creó a partir de una proyección de intensidad máxima de apilamiento en z de 5 imágenes individuales. Esto corrigió cualquier cambio en el plano focal capturado en la sección de tejido completa. Se usó excitación con láser a 561 nm (voltaje al 10%) para excitar el rojo Congo y se capturó el espectro entre 570-620 nm para cuantificar la fluorescencia.

Se obtuvo una única imagen de la sección sagital completa al unir 150 imágenes individuales (treinta en el plano x-y y cinco en la dimensión z). Se incluyen ejemplos representativos de estas imágenes en la figura 12. La placa y los depósitos de amiloide de la vasculatura se distinguieron manualmente por un investigador ciego a través de la

deselección de los componentes vasculares del amiloide total usando el software Elements AR de Nikon. El área cubierta por el amiloide (Área), el número de depósitos de amiloide individuales (n.º) y la suma de las intensidades de estos objetos (Intensidad de suma) se determinaron para el total de depósitos de amiloide (tanto placa como vascular), y para la placa y los depósitos vasculares individualmente.

5 Específicamente, el análisis de imágenes y la cuantificación consistieron en ajustar en primer lugar tablas de consulta (LUT, por sus siglas en inglés) para una visualización óptima y sistemática para distinguir el amiloide vasculares y de placa. En segundo lugar, se cuantificó el área de cerebro completa de la sección del cerebro para determinar la fracción del cerebro total cubierta por amiloide en la que se estableció el umbral para que se resaltara todo el tejido y se deseleccionó el cerebelo. En tercer lugar, se cuantificaron las áreas ocupadas con amiloide total estableciendo el umbral para seleccionar con precisión los objetos teñidos de amiloide, deseleccionar cualquier tinción debida al fondo o artefactos de tejido/tinción antes de la cuantificación, y deseleccionar el objeto en el cerebelo. En cuarto lugar, se deseleccionó el amiloide de vasculatura haciendo un zoom manual en la imagen a una resolución 1:1 y deseleccionando individualmente las selecciones resaltadas que estaban asociadas con vasos sanguíneos. En quinto lugar, se cuantificaron las áreas ocupadas con amiloide de placa.

Para cada sección sagital, se midieron los objetos teñidos de amiloide totales (Total), las placas teñidas de amiloide (Placas) y los depósitos vasculares teñidos de amiloide (Vasculatura) y se recopilaron los datos. Se capturaron directamente mediciones independientes para Total y Placas. Los valores para Vascular se obtuvieron restando Placas del Total. Para cada uno de los conjuntos de datos, se determinaron parámetros, incluyendo 1) número de objetos, 2) área (% de área ocupada por la colección de objetos) y 3) Intensidad de suma (es igual a la suma de [Intensidad media * Área] para cada objeto individual). Se calcularon dos valores independientes para el parámetro de área: 1) Arealmg (áreas sumadas de la imagen divididas entre el área total de Imagen *100) y 2) AreaTis (áreas sumadas a partir de la imagen divididas entre el área ocupada por el tejido cerebral *100).

Se calcularon valores promedio, desviaciones estándar y errores estándar para cada uno de los tres parámetros para cada uno de los cinco grupos experimentales descritos en la tabla 15. Se analizó la significación de los cinco grupos experimentales usando una prueba de la t bilateral y se realizaron las siguientes comparaciones: WT-Saline frente a Tg-Saline, Tg-Saline frente a Tg-Low, Tg-Saline frente a Tg-High y Tg-Low frente a Tg-High.

30 **Resultados:** Los cambios en la acumulación de amiloide total, de placa o vascular no alcanzaron significación con las pruebas de la t en la comparación del grupo Tg-PBS con el grupo Tg-Low o Tg-High (tabla 77). Sin embargo, para cada uno de los tres parámetros valorados, área cubierta por el amiloide (figura 8A y figura 8B), el número de depósitos de amiloide individuales (figura 8B y figura 9B) y la suma de las intensidades de estos objetos (Intensidad de suma, que representa la cantidad total de amiloide, figura 8C y figura 9C), tanto para el amiloide total como para el amiloide de placa disminuyeron con los tratamientos intranasales de IgG baja y alta. El área cubierta por placas se redujo en el 22% para la dosis baja y el 20% para la dosis alta. El número de placas se redujo en el 17% para la dosis baja y el 19% para la dosis alta. La intensidad de la suma de estas placas disminuyó 16% en el grupo de dosis baja y el 24% en el grupo de dosis alta.

Tabla 77. Cambio en porcentaje entre grupos y valores de p de prueba de la t asociados.

Área de amiloide total (de placa y vasculares)		N.º de depósitos de amiloide (de placa y vasculares)		Intensidad total de todos los depósitos de amiloide (intensidad de suma)				
	% de cambio	Pubadblat(p=)		% de cambio	Pubadblat(p=)			
WT-saline frente a TG-saline	2517%	0.000109	WT-saline frente a TG-saline	1533%	0.000010	WT-saline frente a TG-saline	3854%	0.000132
TG-saline frente a TG-low	-14%	0.520	TG-saline frente a TG-low	-8%	0.381	TG-saline frente a TG-low	-9%	0.713
TG-saline frente a TG-high	-7%	0.809	TG-saline frente a TG-high	-1%	0.667	TG-saline frente a TG-high	-11%	0.715
TG-low frente a TG-high	-7%	0.824	TG-low frente a TG-high	-1%	0.745	TG-low frente a TG-high	-11%	0.958

Área de amiloide de placa		N.º de placas de amiloide		Intensidad total de placas de amiloide (intensidad de suma)				
	% de cambio	Pubadblat(p=)		% de cambio	Pubadblat(p=)			
WT-saline frente a TG-saline	3919%	0.000220	WT-saline frente a TG-saline	6355%	0.000109	WT-saline frente a TG-saline	4520%	0.000171
TG-saline frente a TG-low	-22%	0.345	TG-saline frente a TG-low	-20%	0.381	TG-saline frente a TG-low	-16%	0.531
TG-saline frente a TG-high	-20%	0.478	TG-saline frente a TG-high	-11%	0.667	TG-saline frente a TG-high	-24%	0.591
TG-low frente a TG-high	-20%	0.931	TG-low frente a TG-high	-11%	0.745	TG-low frente a TG-high	-24%	0.801

Área de amiloide vascular		N.º de depósitos vasculares		Intensidad total de depósitos vasculares (intensidad de suma)				
	% de cambio	Pubadblat(p=)		% de cambio	Pubadblat(p=)			
WT-saline frente a TG-saline	1702%	0.000357	WT-saline frente a TG-saline	787%	0.000001	WT-saline frente a TG-saline	3057%	0.000548
TG-saline frente a TG-low	-1%	0.887	TG-saline frente a TG-low	6%	0.710	TG-saline frente a TG-low	3%	0.927
TG-saline frente a TG-high	9%	0.822	TG-saline frente a TG-high	12%	0.598	TG-saline frente a TG-high	11%	0.796
TG-low frente a TG-high	9%	0.750	TG-low frente a TG-high	12%	0.828	TG-low frente a TG-high	11%	0.855

45 La reducción de amiloide estaba ausente en la vasculatura (figuras 10A, 10B y 10C). Para el amiloide vascular, cada uno de los tres parámetros aumentó en el grupo de tratamiento intranasal con IgG alta, mientras que este aumento estuvo ausente o estuvo presente en menor grado en el grupo de dosis baja (figuras 10A, 10B y 10C). La intensidad de suma de estos depósitos de amiloide vascular aumentó el 3% en el grupo de dosis baja y el 11% en el grupo de dosis alta (tabla 77).

Las proporciones relativas de amiloide vascular y de placa como contribuyen al amiloide total se representan en la figura 11A y la figura 11B. Los valores promedio de cada grupo, junto con las desviaciones estándar y el porcentaje de error se proporcionan en

5

Tabla 78. Valores promedio de placas de amiloide por grupo de tratamiento.

Área de amiloide total (de placas y vasculares)				N.º de depósitos de amiloide (de placa y vasculares)				Intensidad total de depósitos de amiloide (intensidad de suma)			
Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.
WT-saline	2329	4235	1223	WT-saline	7	2.09	0.60	WT-saline	891830	2038864	588569
WT-high	5039	4875	1407	WT-high	18	1.51	0.43	WT-high	1426429	1390829	401498
TG-saline	60930	31891	9206	TG-saline	114	34.36	9.92	TG-saline	35260904	19089383	5510630
TG-low	52249	31572	9114	TG-low	104	34.60	9.99	TG-low	31921724	23768445	6861359
TG-high	56385	54901	15849	TG-high	113	46.17	13.33	TG-high	31318149	30948336	8934015

Área de amiloide de placa				N.º de placas de amiloide				Intensidad total de placas de amiloide (intensidad de suma)			
Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.
WT-saline	852	2442	705	WT-saline	1	2.09	0.60	WT-saline	491018	1538511	444130
WT-high	647	687	198	WT-high	2	1.51	0.43	WT-high	207397	217296	62728
TG-saline	34241	19804	5717	TG-saline	65	34.36	9.92	TG-saline	22685550	12752488	3681326
TG-low	25539	18268	5273	TG-low	52	34.60	9.99	TG-low	18985208	15068946	4350050
TG-high	27338	25815	7452	TG-high	57	46.17	13.33	TG-high	17345869	16402272	4734928

Área de amiloide vascular				N.º de depósitos vasculares				Intensidad total de depósitos vasculares (intensidad de suma)			
Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.	Grupo	Prom.	Desv. est.	Err. est.
WT-saline	1477	687	198	WT-saline	6	5.33	1.54	WT-saline	400812	550529	158924
WT-high	4391	19804	5717	WT-high	16	15.02	4.34	WT-high	1219032	1387106	400423
TG-saline	26688	18268	5273	TG-saline	50	15.49	4.47	TG-saline	12575353	8294807	2394505
TG-low	26539	25815	7452	TG-low	53	24.61	7.10	TG-low	12936517	10455665	3018290
TG-high	29047	31592	9120	TG-high	55	34.12	9.85	TG-high	13972280	16240149	4688127

Tabla 79. Datos sin procesar de las áreas e intensidades de suma para cada ratón (identificado por número ID).

Número ID	Grupo	Área total	Área placas	Área vascular	Intensidad de suma total	Intensidad de suma de placas	Intensidad de suma vascular
6	TG-Saline	115.428	49.388	66.039	65.768.632	32.797.559	32.971.072
12	TG-Saline	9.615	3.207	6.408	4.122.348	1.775.361	2.346.986
13	TG-Saline	44.759	32.566	12.193	23.331.489	18.754.125	4.577.364
17	TG-Saline	45.902	20.360	25.542	24.817.330	14.365.335	10.451.995
19	TG-Saline	100.853	61.581	39.272	55.289.299	38.307.916	16.981.383
24	TG-Saline	40.275	16.232	24.043	28.219.039	14.592.692	13.626.348
26	TG-Saline	72.873	40.008	32.864	50.896.735	32.669.266	18.227.469
40	TG-Saline	72.892	51.395	21.497	42.116.237	31.329.942	10.786.294
46	TG-Saline	83.078	55.167	27.911	49.487.815	37.301.209	12.186.606
58	TG-Saline	59.409	38.548	20.862	31.689.695	22.410.388	9.279.308
59	TG-Saline	25.142	8.199	16.943	12.131.324	5.237.262	6.894.062
2	TG-Low	37.468	20.017	17.451	20.321.550	13.258.997	7.062.553
7	TG-Low	61.365	34.477	26.888	49.667.940	34.128.193	15.539.747
10	TG-Low	52.240	33.836	18.404	28.447.707	21.346.439	7.101.268
25	TG-Low	68.827	43.997	24.831	37.245.908	25.626.879	11.619.029
27	TG-Low	132.727	61.346	71.380	95.657.774	52.780.178	42.877.596
32	TG-Low	32.299	9.761	22.538	19.011.353	6.252.635	12.758.717
35	TG-Low	10.110	1.270	8.840	4.705.869	625.181	4.080.687
39	TG-Low	14.232	3.239	10.993	6.755.635	2.258.758	4.496.877
42	TG-Low	50.544	38.522	12.022	29.879.434	24.362.743	5.516.691
49	TG-Low	68.719	39.481	29.238	38.885.021	27.024.755	11.860.266

ES 2 759 226 T3

51	TG-Low	49.382	18.550	30.832	27.695.601	12.602.421	15.093.180
52	TG-Low	49.071	13.978	35.093	24.786.898	7.555.312	17.231.586
1	TG-High	2.813	641	2.172	1.048.809	237.175	811.634
15	TG-High	103.101	57.180	45.921	61.230.873	37.704.161	23.526.712
16	TG-High	53.649	34.611	19.039	31.405.116	23.587.366	7.817.749
20	TG-High	195.070	86.114	108.956	110.420.271	54.319.412	56.100.859
23	TG-High	69.989	41.806	28.184	37.222.228	26.023.396	11.198.831
34	TG-High	7.887	1.975	5.912	3.920.088	1.385.403	2.534.685
37	TG-High	57.257	37.868	19.388	31.515.587	23.230.486	8.285.101
41	TG-High	94.661	27.898	66.763	46.735.215	14.998.264	31.736.951
44	TG-High	23.751	4.985	18.766	13.317.820	3.773.642	9.544.178
47	TG-High	38.637	11.895	26.742	21.140.702	7.803.449	13.337.253
53	TG-High	10.580	8.478	2.102	6.247.449	5.468.454	778.995
55	TG-High	19.223	14.606	4.617	11.613.632	9.619.224	1.994.408
4	WT-Saline	775	-	775	175.280	-	175.280
8	WT-Saline	203	-	203	63.844	-	63.844
9	WT-Saline	2.197	-	2.197	549.057	-	549.057
14	WT-Saline	2.274	-	2.274	537.918	-	537.918
18	WT-Saline	279	191	89	99.865	75.732	24.133
21	WT-Saline	-	-	-	-	-	-
29	WT-Saline	15.165	8.503	6.662	7.272.935	5.363.736	1.909.198
30	WT-Saline	-	-	-	-	-	-
33	WT-Saline	2.547	133	2.413	806.288	64.381	741.907
43	WT-Saline	3.836	1.397	2.439	1.030.568	388.371	642.196
57	WT-Saline	667	-	667	166.208	-	166.208
60	WT-Saline	-	-	-	0	-	-
5	WT-High	-	-	-	-	-	-
11	WT-High	946	546	400	262.652	162.969	99.683
22	WT-High	5.233	1.035	4.198	1.418.585	303.890	1.114.696
28	WT-High	2.826	1.988	838	951.551	710.345	241.205
31	WT-High	9.405	362	9.043	2.931.770	228.181	2.703.589
36	WT-High	4.591	171	4.420	1.260.094	90.200	1.169.894
38	WT-High	15.883	-	15.883	4.399.983	-	4.399.983
45	WT-High	-	-	-	-	-	-
48	WT-High	11.393	1.638	9.754	3.248.816	451.611	2.797.205
50	WT-High	1.892	1.067	826	465.341	245.731	219.610
54	WT-High	4.477	959	3.518	1.191.920	295.835	896.086
56	WT-High	3.817	-	3.817	986.431	-	986.431

Las secciones sagitales teñidas con rojo Congo capturadas con microscopía fluorescente confocal se muestran en las figuras 12A-12F. Se usaron cinco imágenes individuales a 10X con una resolución de 512 X 512 para crear una imagen de proyección de intensidad máxima de apilamiento en z (figura 12A). Treinta de estas proyecciones de apilamiento en z, que abarcan la sección de tejido completa, se colocaron en mosaico (6x5, solapamiento del 5%) para crear una única imagen para el análisis (figuras 12B-12F). La excitación con láser a 561 nm excitó el rojo Congo y se capturó el

espectro entre 570-620 nm para la cuantificación. Se realizó la selección de los depósitos de amiloide con la función de valores umbral en el software Elements AR de Nikon. Se representan ejemplos de valores umbral en las figuras 12A y 12C-12F resaltando en color rojo. La figura 12A representa una parte de la corteza y el hipocampo en resolución total, resaltándose tanto las placas de amiloide como el amiloide vascular. La figura 12A es un ejemplo de una sección de un ratón Tg-Low sin resaltar. Se muestran imágenes representativas de los grupos, WT-Saline (figura 12C), TG-Saline (figura 12D), Tg-Low (figura 12E) y Tg-High (figura 12F) con valores umbral.

Análisis: La tinción con rojo de Congo reveló una disminución de la carga de amiloide en los grupos de tratamiento intranasal tanto con IgG baja como con IgG alta (figuras 8A-8C). Esta disminución de amiloide fue el resultado de una disminución de la carga de placas (figuras 9A-9C) ya que se encontró que el componente vascular del amiloide aumentaba ligeramente (figuras 10A-10C). Aunque los resultados del Rojo Congo no alcanzaron significación estadística, la reducción de la carga de placas está respaldada por la reducción estadísticamente significativa de las placas en la corteza de estos ratones según lo determinado mediante la inmunodetección de β -amiloide (estudio mediante IHC). En ese estudio, usando el anticuerpo 4G8 para el direccionamiento al β -amiloide, el porcentaje de área cubierta por placas disminuyó en el 25,7% para el grupo de IgG a dosis baja y el 24,3%, para el grupo de IgG a dosis alta, respectivamente, con valores de p de 0,014 y 0,037. En el estudio actual que usa tinción fluorescente con rojo Congo, el área cubierta por placas se redujo en el 22% para la dosis baja y el 20% para la dosis alta, respectivamente, con valores de p de 0,35 y 0,48. Por tanto, un grado similar de reducción de placas observada en el análisis mediante IHC también se detectó con el análisis con rojo Congo.

Varios parámetros experimentales pueden ser responsables de la diferencia de poder estadístico observada entre el análisis mediante IHC y con rojo Congo. El análisis mediante IHC se limitó a la corteza o al hipocampo del cerebro del ratón y sólo se observó una disminución significativa en la corteza. En el análisis con rojo Congo, se incluyó la sección cerebral completa que está anterior a la protuberancia y al cerebelo, con la excepción del bulbo olfativo. La variabilidad y la dilución de la carga de placas en estas áreas adicionales del cerebro pueden haber contribuido a un valor de p menos significativo. Además, se incluyeron tres secciones de tejido de cada ratón en el análisis mediante IHC, mientras que se analizó una única sección con la tinción de rojo Congo. La diferencia también podría estar relacionada con las propiedades de tinción de cada método. El rojo Congo detecta los agregados de proteínas fibrosas insolubles de las láminas β de amiloide, mientras que la IHC detecta toda la proteína β -amiloide humana Tg.

La tinción de amiloide en la vasculatura se observa, en su mayor parte, sólo en los vasos más grandes del cerebro. Se ha sugerido que esto se debe al menos en parte a la ausencia del transportador de amiloide de flujo de salida, LRP1 en estos vasos. Según este punto, se observó amiloide vascular casi exclusivamente en los vasos más grandes en este estudio y la IgG o bien no afectó a la agregación del amiloide vascular o bien puede haberlo aumentado ligeramente. Aunque el cerebro no tiene un sistema linfático independiente, el espacio perivascular que rodea los vasos cerebrales más grandes proporciona un trayecto por el cual el líquido intersticial y los solutos extracelulares, incluido el β -amiloide, pueden salir del cerebro.

Ejemplo 12- Tinción inmunofluorescente de astrocitos de ratones Tg2576 tratados con IgG intranasal (GFAP) y cuantificación en microglía (CD11b)

Las inmunoglobulinas humanas son reactivas a una amplia gama de proteínas inflamatorias y se ha demostrado que la IgG administrada por vía intravenosa induce propiedades antiinflamatorias en una variedad de estados diferentes (Nimmerjahn F. *et al.*, Annu Rev Immunol, 2008; 26: 513-533). El presente estudio valoró la expresión de dos marcadores inflamatorios en los cerebros de ratones Tg2576 en respuesta a dosis bajas y dosis altas de IgG administrada por vía I.N. de manera prolongada.

Se analizaron los tejidos cerebrales para detectar GFAP y CD11b de los 3 grupos transgénicos de ratones [TG-Saline n = 2, TG-Low (0,4 g/kg/2 semanas) n = 4 y TG-High (0,8 g/kg/2 wk) n = 6] para los que estaban disponibles muestras congeladas. La cuantificación de la tinción tanto de GFAP como de CD11b en los cerebros de los ratones Tg2576 experimentales se analizó usando microscopía fluorescente. En este procedimiento, se tiñeron de manera triple secciones cerebrales congeladas fijadas (1 milímetro desde el plano medio-sagital) usando anticuerpos para amiloide, un marcador para astrocitos activados (GFAP) y un marcador para microglía activada (CD11b). La fluorescencia se capturó con un microscopio confocal espectral Nikon A1. Se usó una sección sagital que abarcaba una parte de la corteza frontal y una parte del hipocampo para cuantificar la intensidad promedio de tinción de GFAP y CD11b. Un ejemplo de las imágenes se muestra en la figura 14.

En resumen, se seccionaron los cerebros en secciones sagitales de 2 mm y se colocaron en sacarosa al 20%. Las secciones se almacenaron a 4°C hasta que se recogieron todos los animales del estudio. Una vez que se recogieron todas las muestras, se preparó el tejido en OCT (congelado rápidamente con hielo seco) y se seccionó en el criostato CM3050 de Leica a 20 μ m. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche y se almacenaron en el congelador a -20°C. Las secciones preparadas se tiñeron según los protocolos de tinción para IHC convencionales.

Se obtuvieron imágenes de la fluorescencia de las secciones teñidas usando tres canales correspondientes a

AlexaFluor405, AlexaFluor488 y AlexaFluor 568 con un microscopio confocal espectral Nikon A1. El sistema se montó en un microscopio de fluorescencia invertido ,de campo amplio Nikon Ti2000E. Se usó el software de obtención de imágenes NIS Elements para controlar la adquisición y el análisis. Se usó un objetivo con un aumento de 20X para capturar imágenes. Se capturaron imágenes individuales de 512x512 que incluían una parte de la corteza frontal y el hipocampo para el análisis cuantitativo. Se realizó la cuantificación de imagen con el software Elements AR de Nikon y se determinaron los valores de intensidad total y promedio (correspondientes a GFAP y CD11b) para cada imagen.

Los resultados muestran que el grupo Tg-PBS no fue estadísticamente significativo de los grupos Tg-Low o Tg-High para las comparaciones de GFAP o CD11b (tabla 80). La intensidad promedio de la tinción de GFAP fue casi idéntica en los tres grupos, y difirió sólo en unos pocos puntos porcentuales (tabla 80, figura 13A). La intensidad promedio de la tinción de CD11b disminuyó en el 17% con la dosis baja de IgG I.N. ($p = 0,741$) y la magnitud de esta disminución fue mayor, al 47%, con la dosis alta de IgG I.N. ($p = 0,379$) (tabla 80, figura 13B).

Tabla 80. Resultados de la tinción de GFAP y CD11b.

	GFAP		CD11b	
	Razón	Prueba de la t	Razón	Prueba de la t
TG-Low frente a TG-Saline	0,993	0,963	0,828	0,741
TG-High frente a TG-Saline	0,987	0,946	0,565	0,379
TG-Low frente a TG-High	1,006	0,965	1,467	0,416

La tinción inmunofluorescente de los cerebros de ratón Tg2576 para los marcadores de inflamación, GFAP y CD11b, no reveló una diferencia significativa entre los grupos tratados con solución salina e IgG baja o alta. El poder estadístico de este análisis estuvo limitado por el bajo número de ratones Tg tratados con solución salina disponibles. Los valores obtenidos para la tinción de astrocitos usando el anticuerpo para GFAP no revelaron prácticamente ningún cambio en la cuantificación con el tratamiento con IgG baja o alta en I.N. (tabla 80). Aunque no se alcanzó significación, hubo una reducción aparente de la tinción de microglía usando un anticuerpo contra CD11b. La intensidad promedio del marcador CD11b disminuyó en el 17% con la dosis baja de IgG I.N. y disminuyó en el 47% con la dosis alta de IgG I.N. (tabla 80).

En este estudio, GFAP, un marcador de la activación de astrocitos, no se alteró con ninguna de las dos concentraciones de tratamiento de IgG. Este resultado concuerda con el trabajo previo que muestra que el tratamiento con IGIV de ratones APP/PS1dE9 no afectó significativamente a la expresión de GFAP (Puli L. *et al.*, Journal of neuroinflammation, 2012; 9: 105.). En el estudio actual, CD11b, un marcador de la activación de la microglía, mostró una disminución dependiente de la dosis de la expresión de proteínas. Sin embargo, ni los valores de dosis baja ni los de dosis alta alcanzaron significación estadística. En el estudio con APP/PS1dE9 mencionado anteriormente, Puli *et al.* (Íd.) encontraron una reducción significativa del marcador de la microglía CD45 y una elevación del marcador de la microglía Iba1 con el tratamiento con IgG I.V. Magga, *et al.* (Journal of neuroinflammation, 2010; 7: 90) también encontraron que IGIV funcionaba en un modelo de ratón APP/PS1 a través de un mecanismo que involucra la microglía, pero no a través de un mecanismo que involucra astrocitos. Aunque los efectos identificados en el presente estudio no alcanzaron significación estadística, los resultados sí respaldan un mecanismo mediante el cual la IgG influye en el estado inflamatorio del SNC a través de la modulación de la microglía.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende inmunoglobulina G (IgG) humana agrupada para su uso en un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, en la que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición al cerebro del sujeto; en la que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición directamente a un epitelio nasal del sujeto, y en la que al menos el 40% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que al menos el 50% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
3. Composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que al menos el 60% de la IgG humana agrupada administrada al sujeto entra en contacto con el epitelio nasal del sujeto.
- 15 4. Composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el epitelio nasal es el epitelio olfativo del sujeto.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el epitelio nasal es un epitelio nasal del sujeto asociado con terminaciones del nervio trigémino.
6. Composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que administrar la composición al cerebro comprende administrar por vía intranasal la composición al tercio superior de la cavidad nasal del sujeto.
- 25 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno del SNC es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central.
- 30 8. Composición según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 7, en la que el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Alzheimer.
9. Composición según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 7, en la que el trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central es enfermedad de Parkinson.
- 35 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno del SNC es un trastorno desmielinizante del sistema nervioso central.
- 40 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la administración intranasal de la composición comprende la administración dirigida de un aerosol de la composición al epitelio nasal.
- 45 12. Composición según la reivindicación 11 para el uso según la reivindicación 11, en la que el aerosol de la composición es un aerosol de líquido.
13. Composición según la reivindicación 11 para el uso según la reivindicación 11, en la que el aerosol de la composición es un aerosol de polvo.
- 50 14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la IgG humana agrupada es una composición acuosa que comprende:
 - (a) IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y
 - 55 (b) glicina desde 50 mM hasta 500 mM.
15. Composición según la reivindicación 13 para el uso según la reivindicación 13, en la que la composición de polvo seco de IgG agrupada se prepara a partir de una disolución acuosa que comprende:
 - 60 (a) IgG humana agrupada desde 10 mg/ml hasta 250 mg/ml; y
 - (b) glicina desde 50 mM hasta 500 mM.
- 65 16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,08 mg hasta 100 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).

- 5
17. Composición según la reivindicación 15 para el uso según la reivindicación 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis de desde 0,2 mg hasta 40 mg de IgG humana agrupada por kg de peso corporal del sujeto (mg de IgG/kg).
- 10
18. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el método comprende administrar por vía intranasal al sujeto una dosis fija de desde 50 mg hasta 10 g de IgG humana agrupada.
- 15
19. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende además administrar una segunda terapia para el trastorno del SNC al sujeto que lo necesita.
20. Composición según la reivindicación 19 para el uso según la reivindicación 19, en la que la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor de la colinesterasa.
21. Composición según la reivindicación 19 para el uso según la reivindicación 19, en la que la segunda terapia para el trastorno del SNC es un inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA.

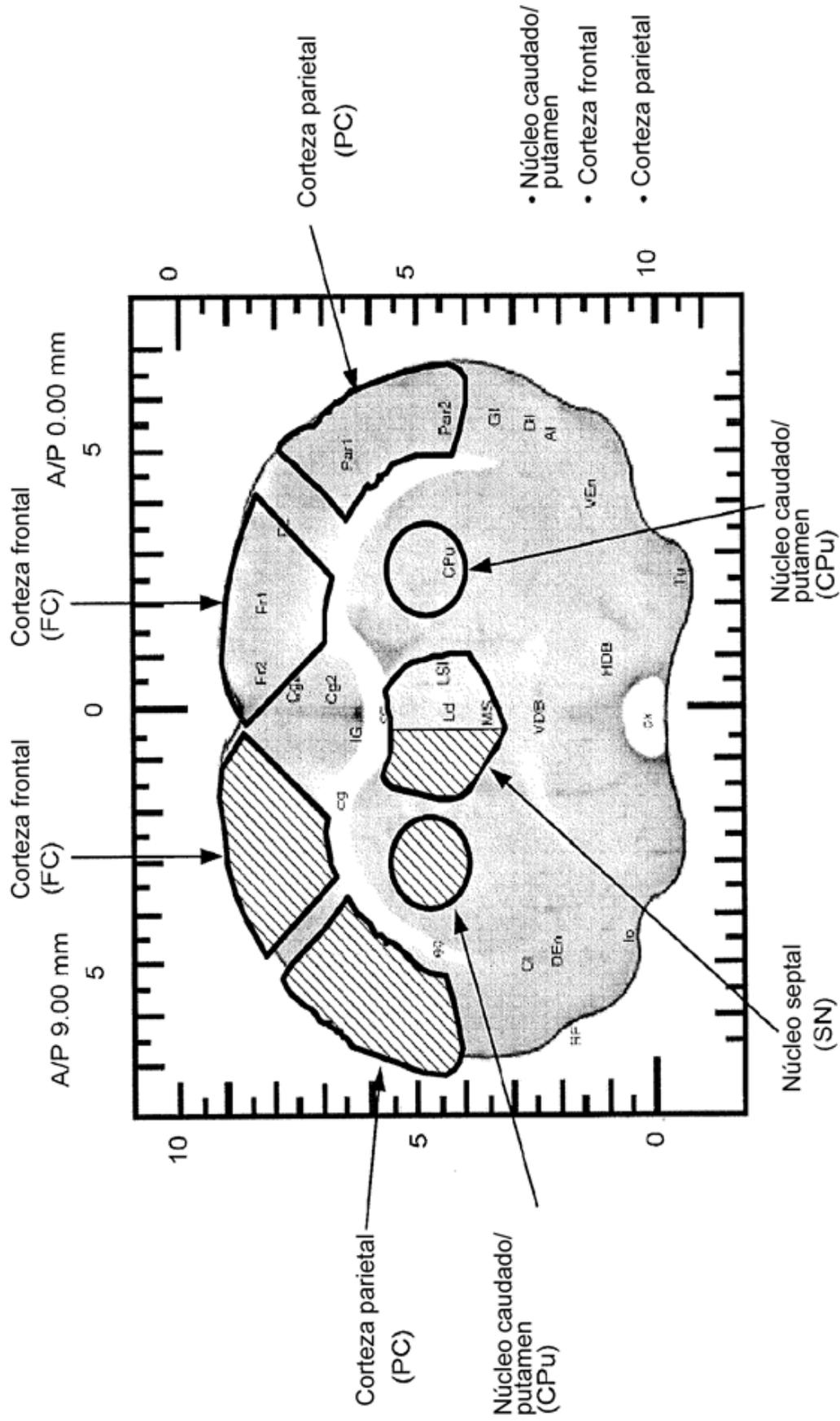


Figura 1C

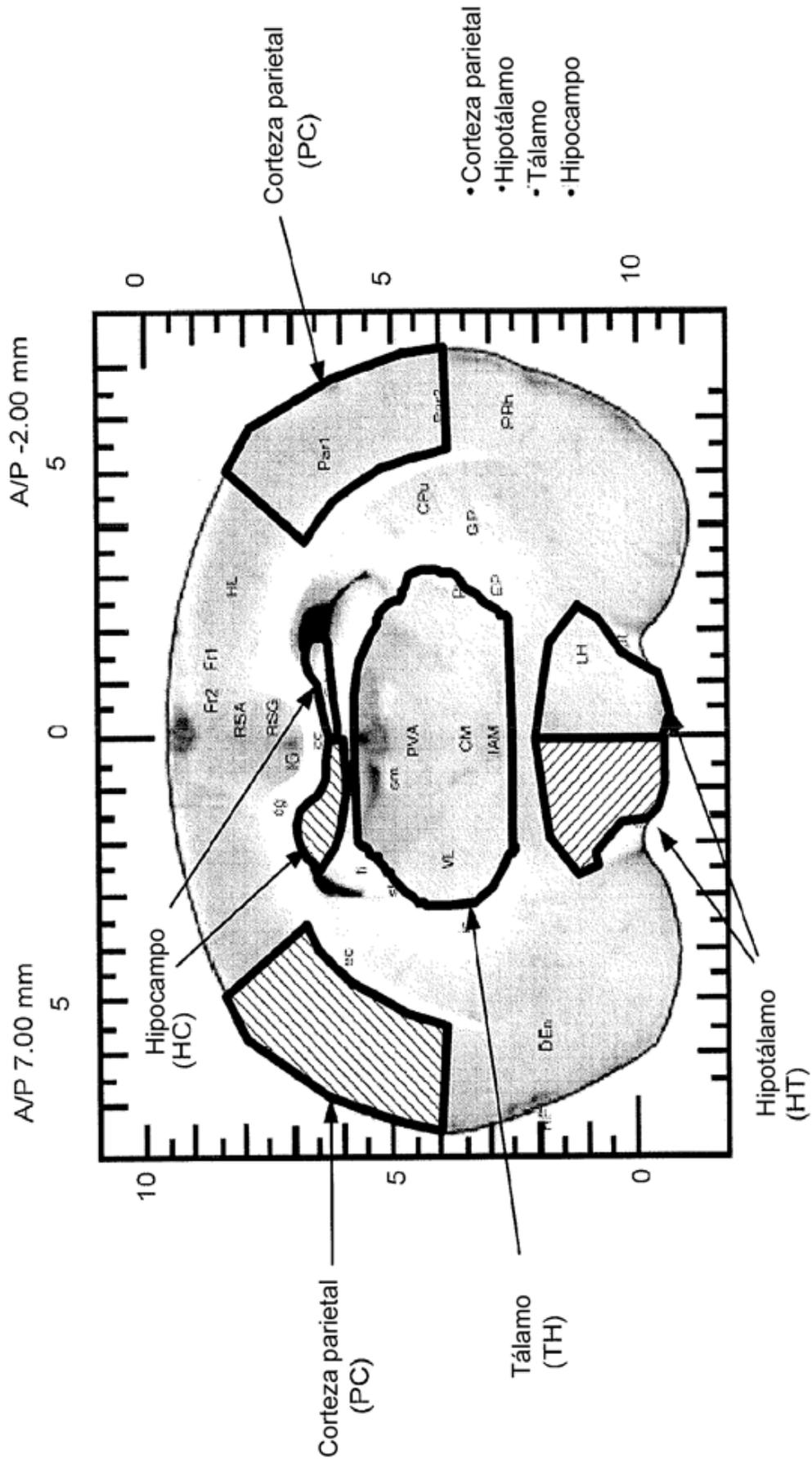


Figura 1E

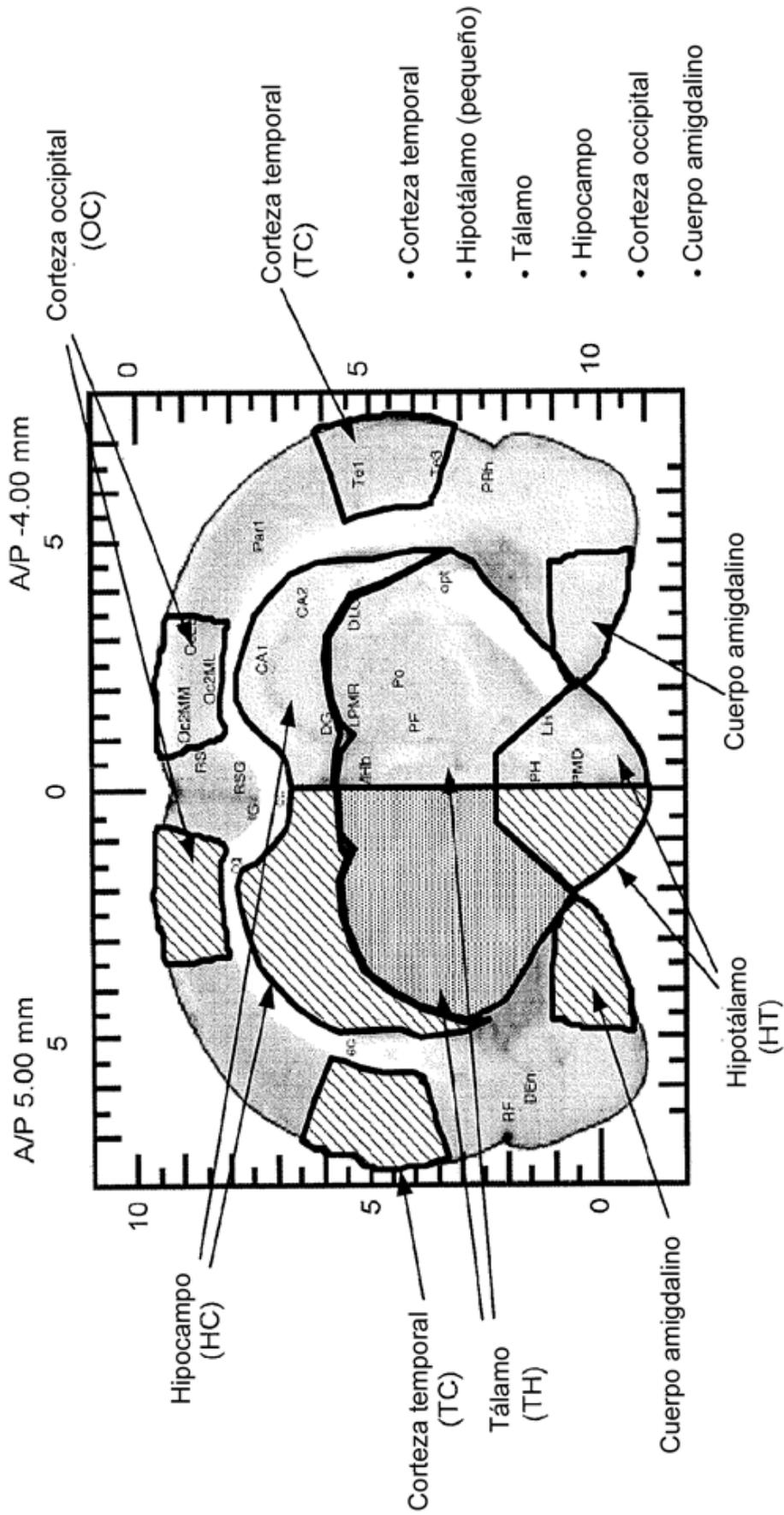


Figura 1F

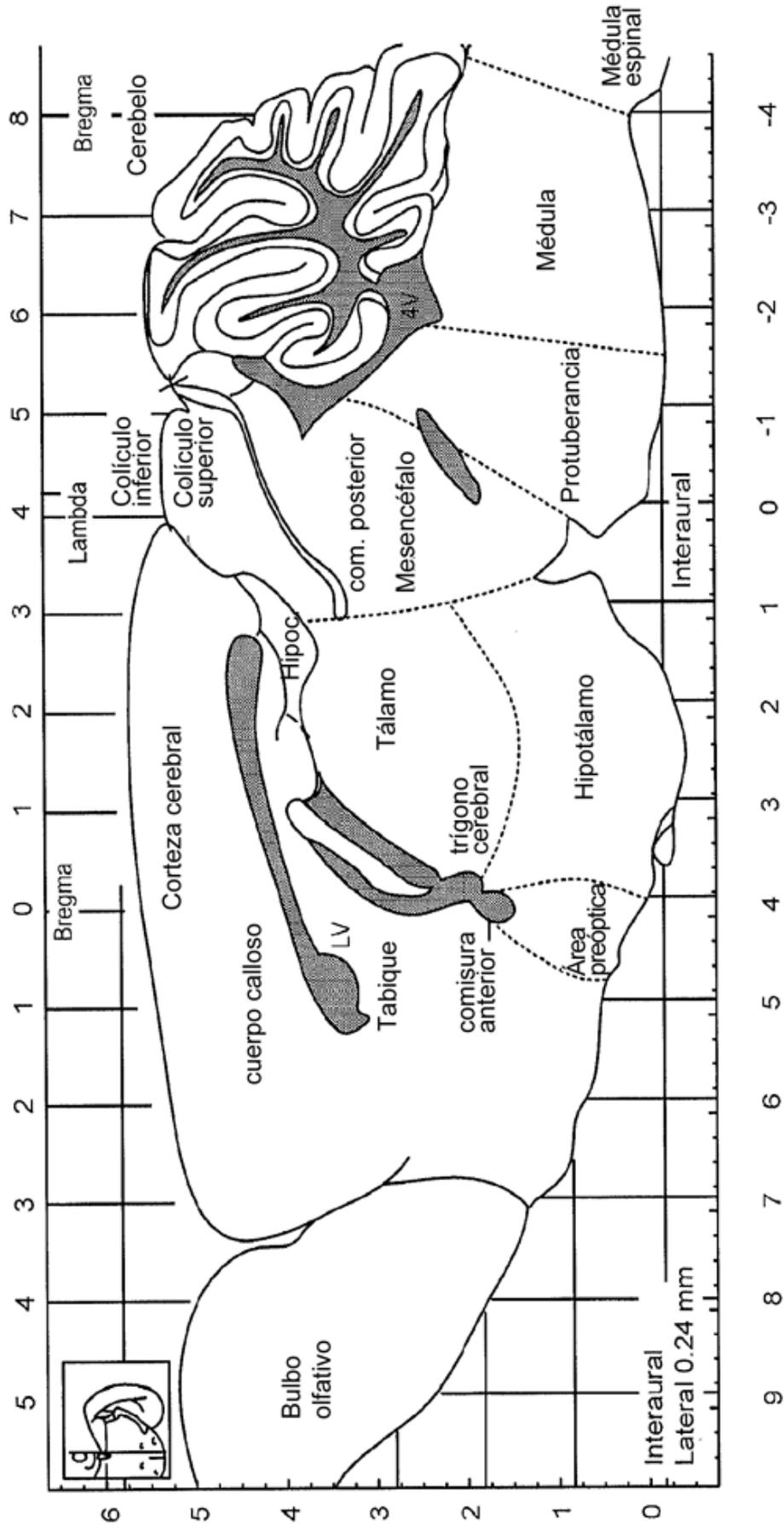


Figura 1G

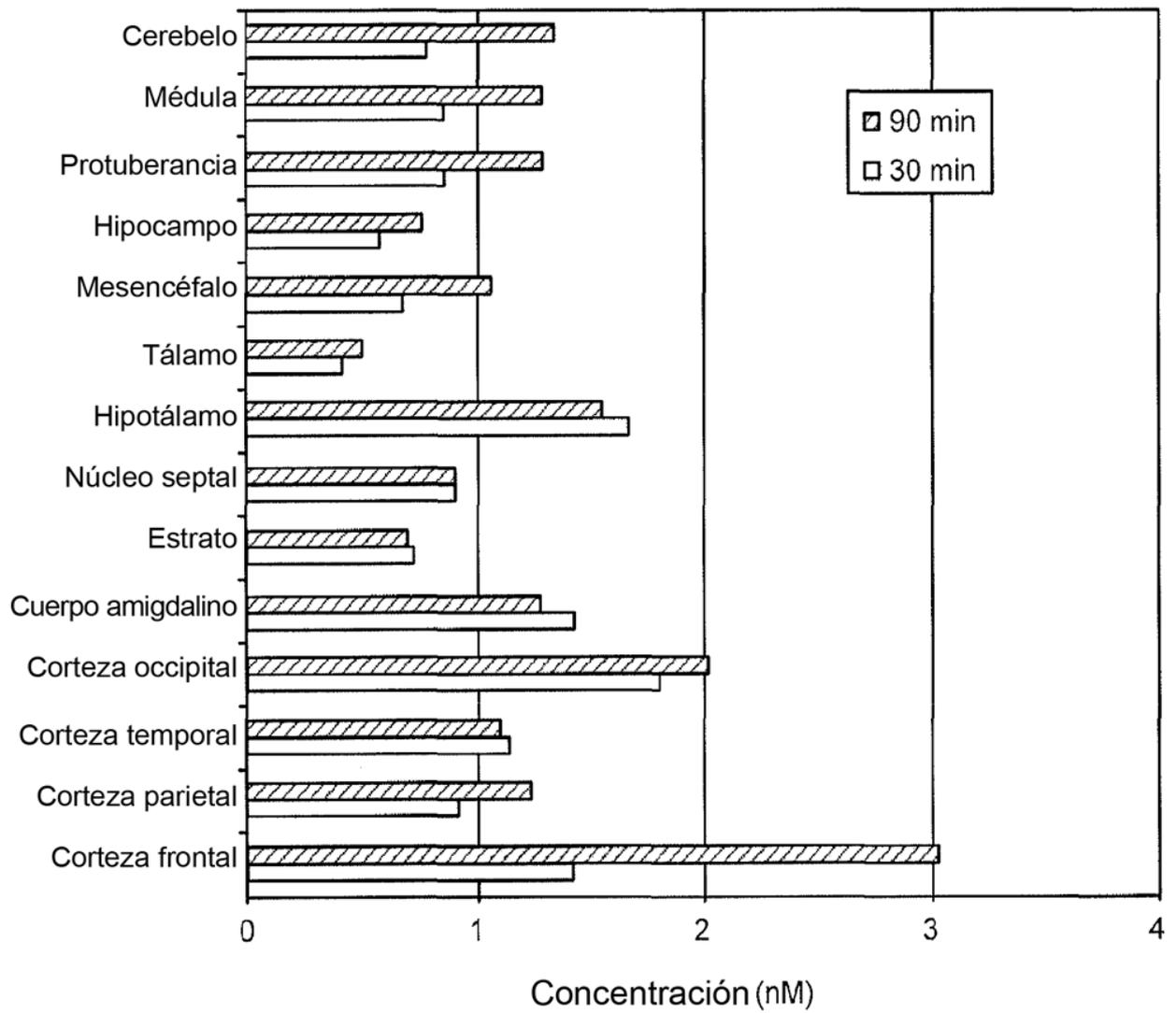


Figura 2A

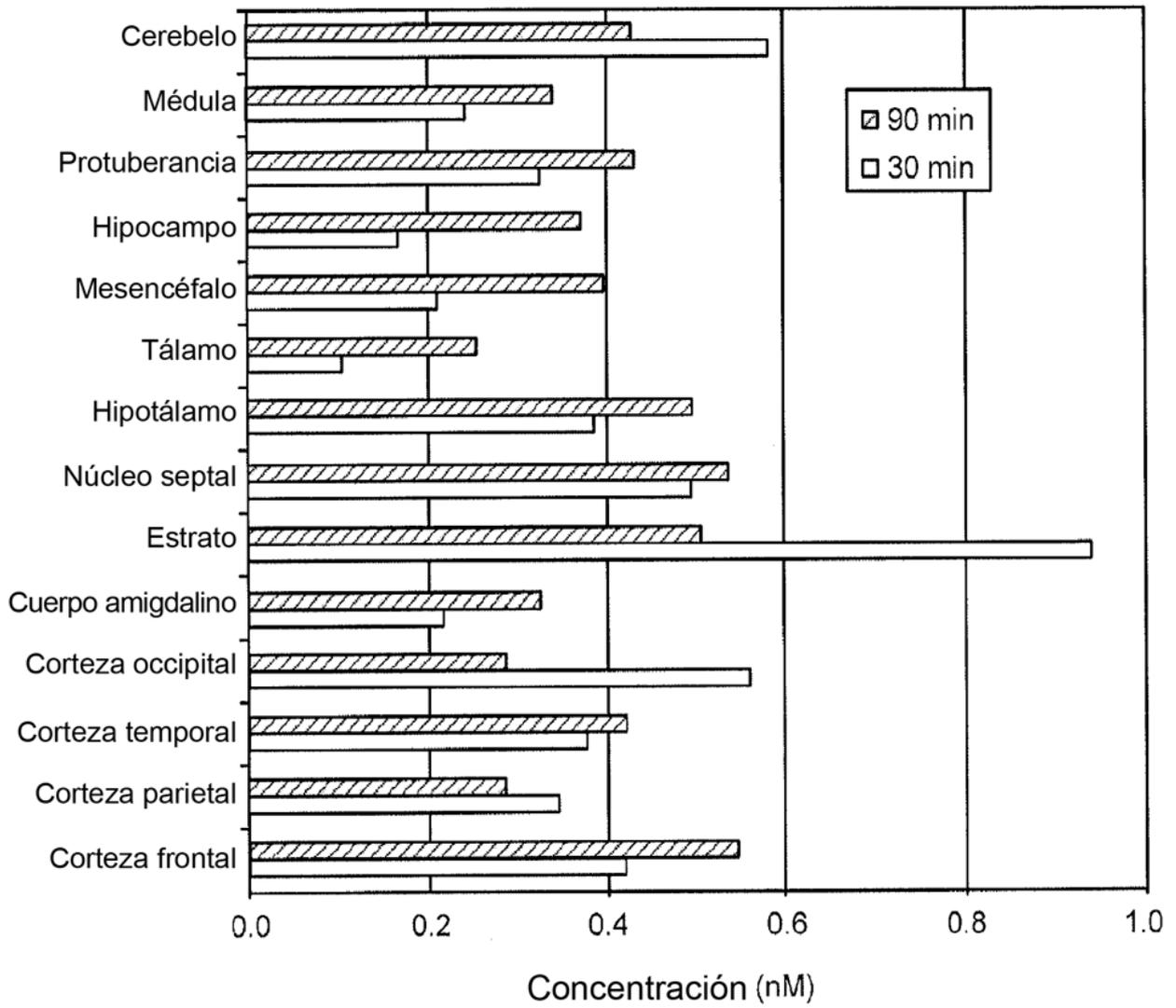


Figura 2B

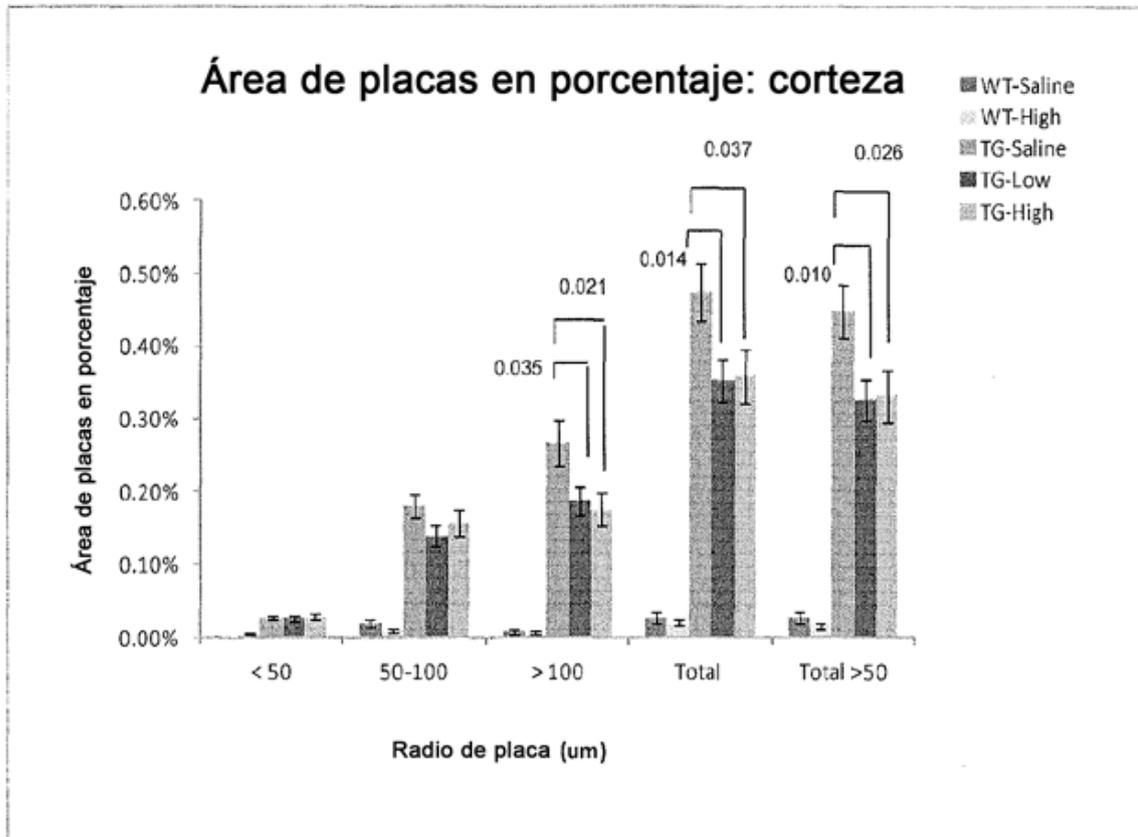


Figura 3A

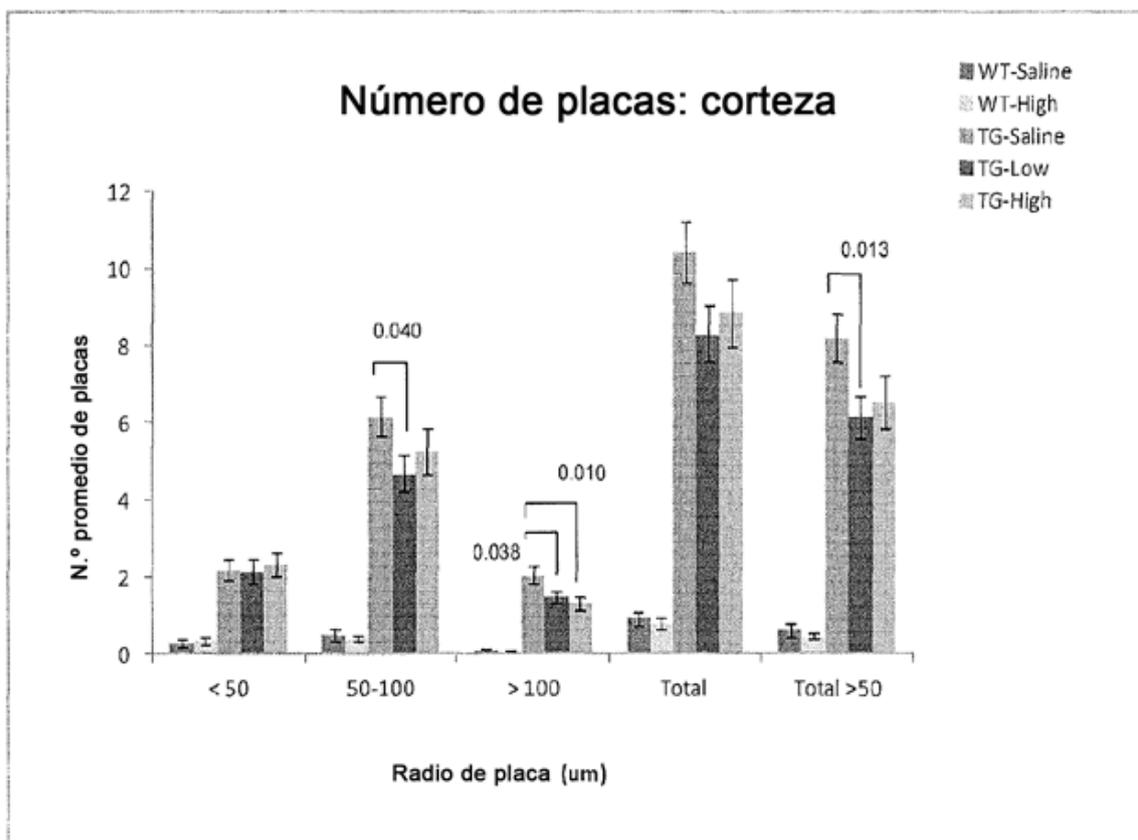


Figura 3B

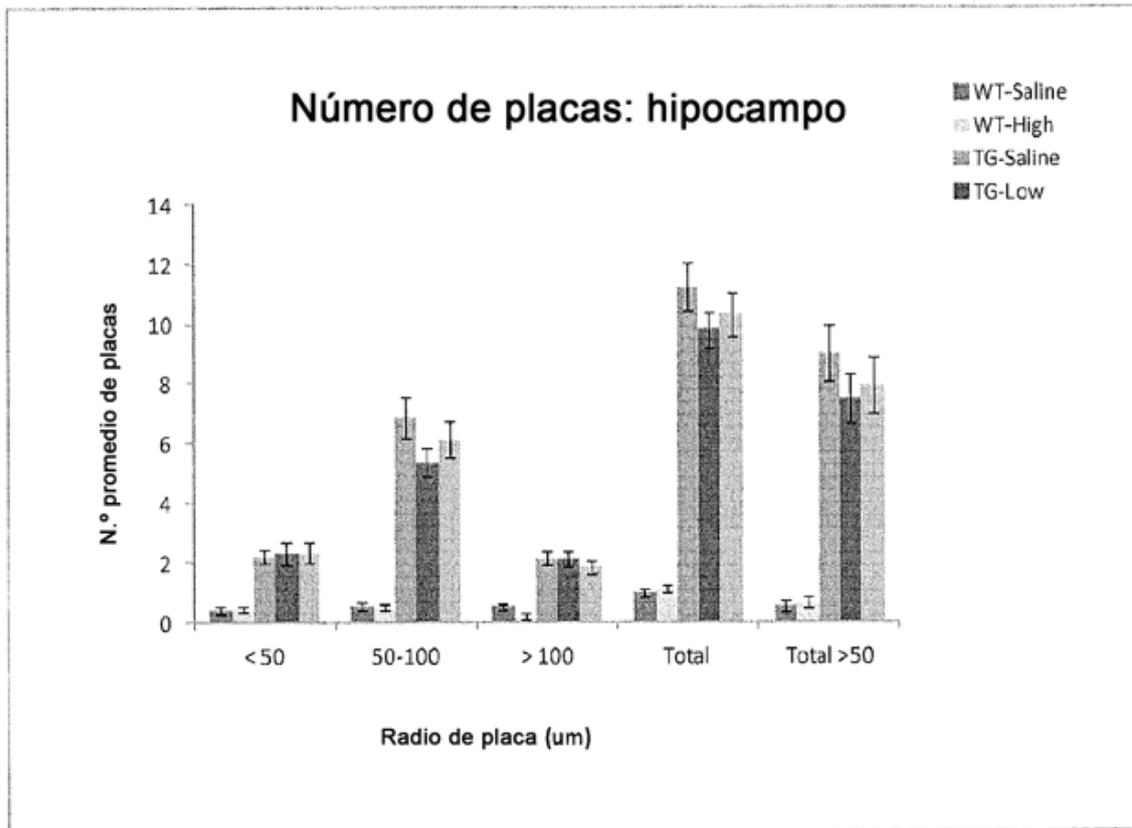


Figura 3C

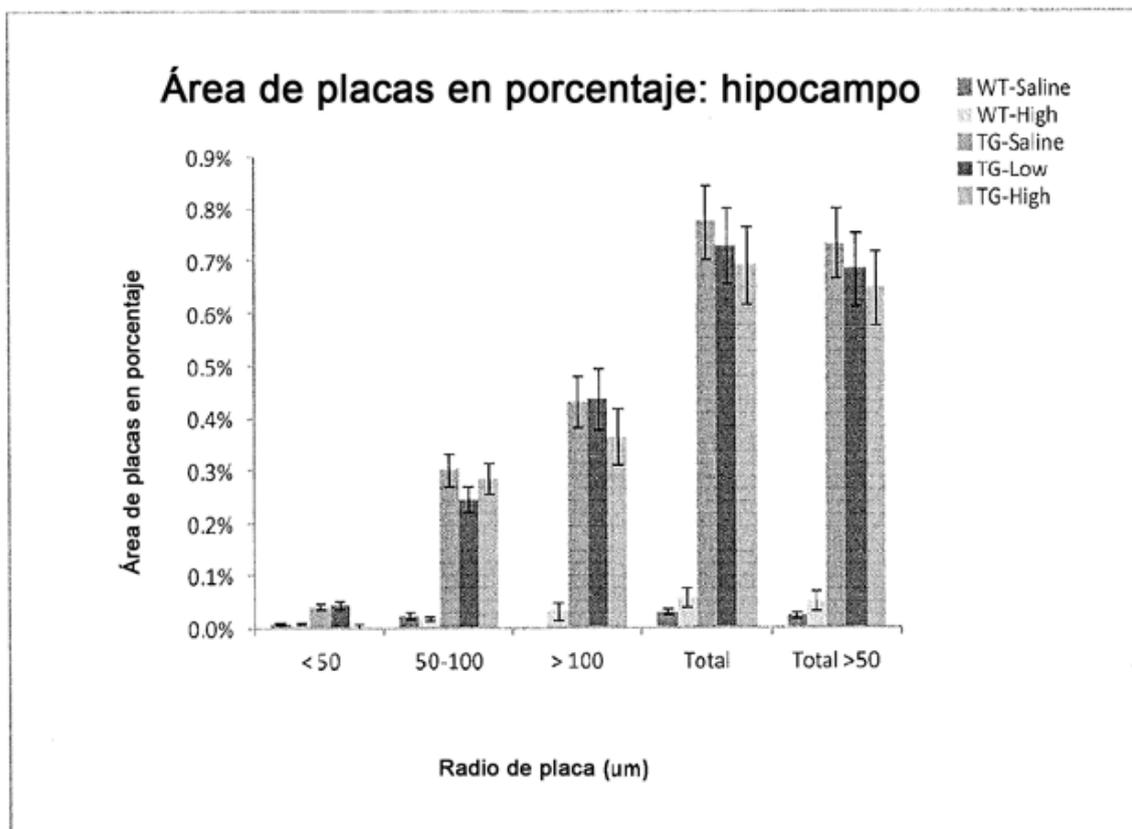


Figura 3D

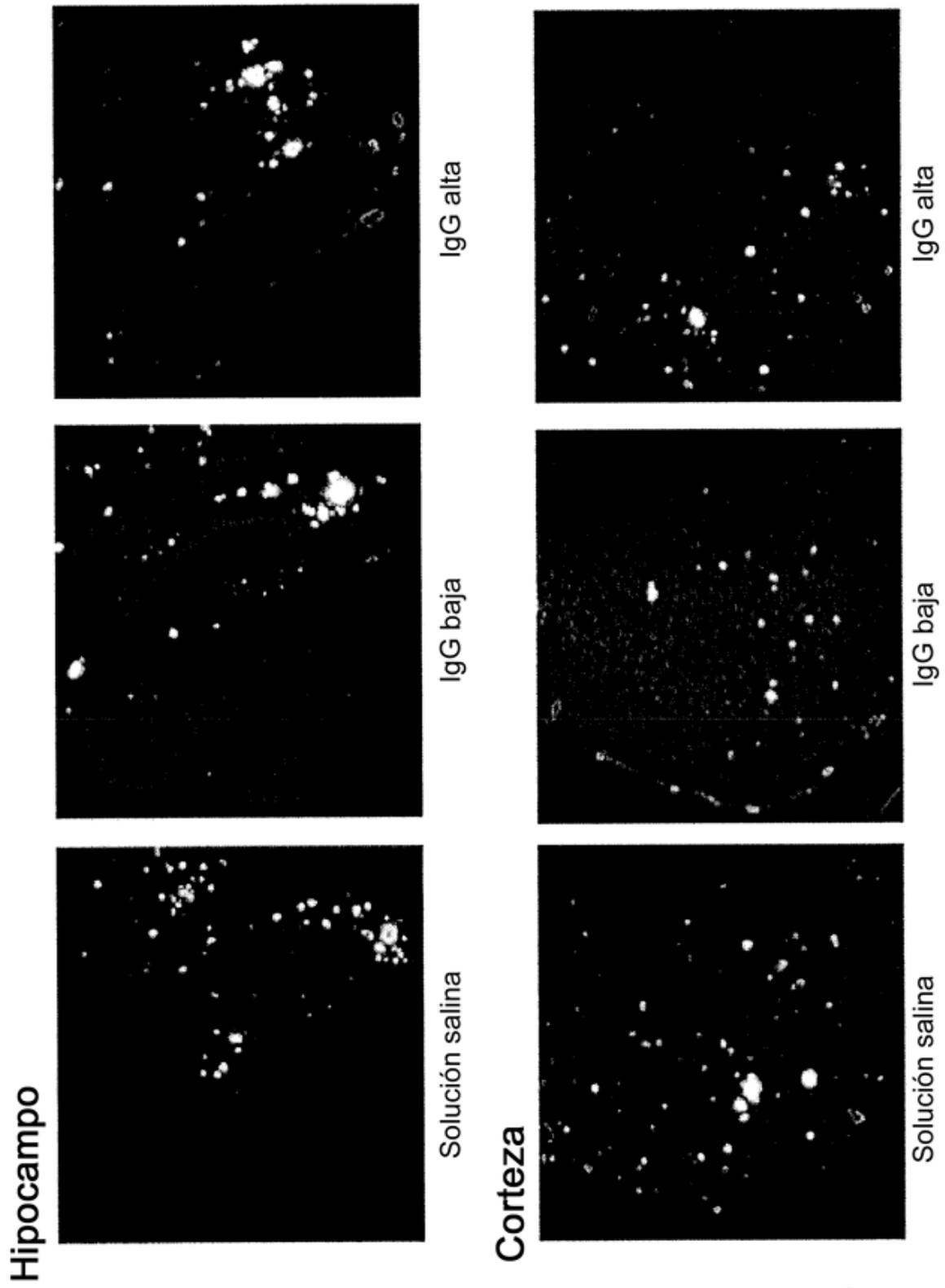


Figura 3E

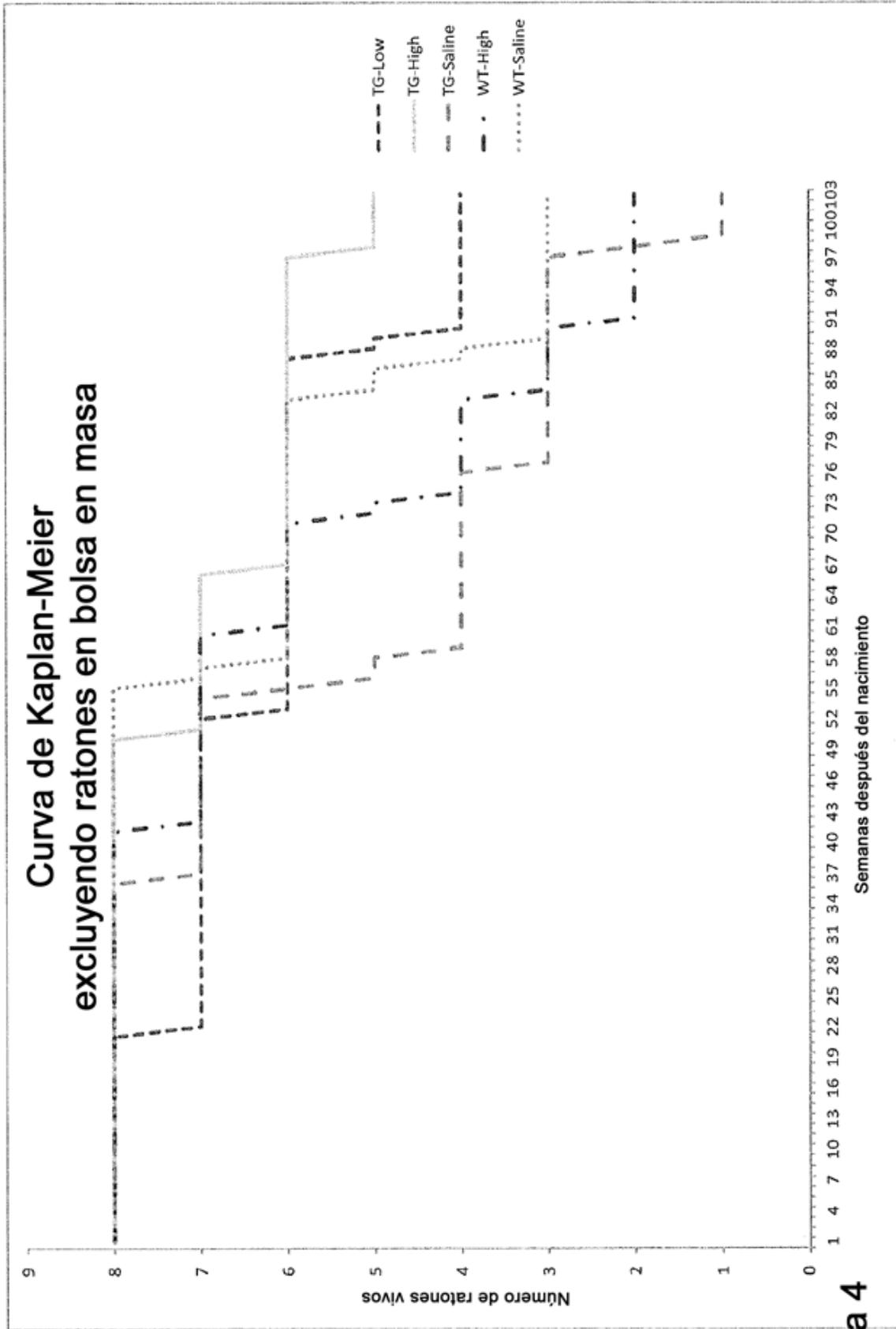


Figura 4

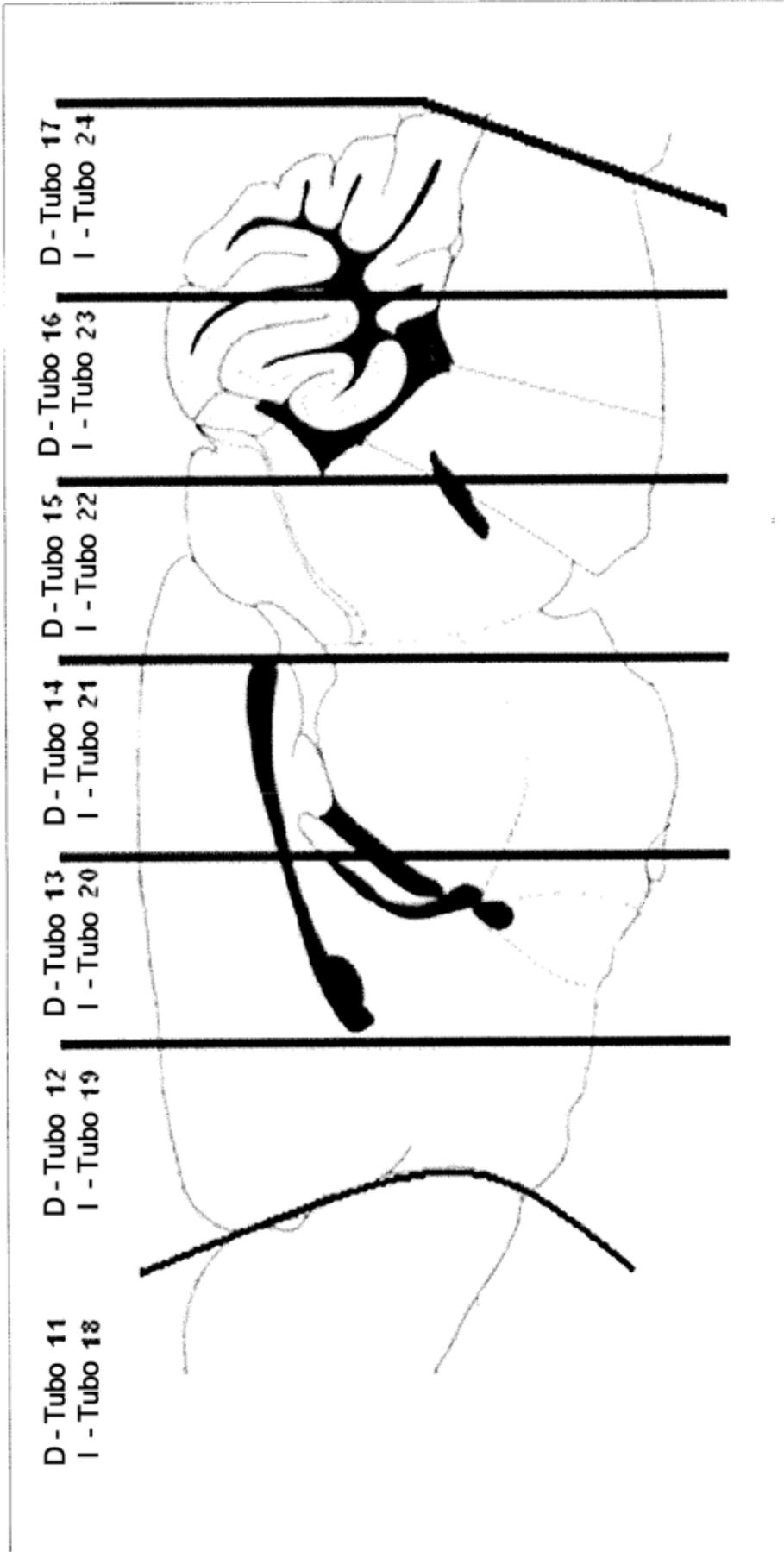


Figura 5

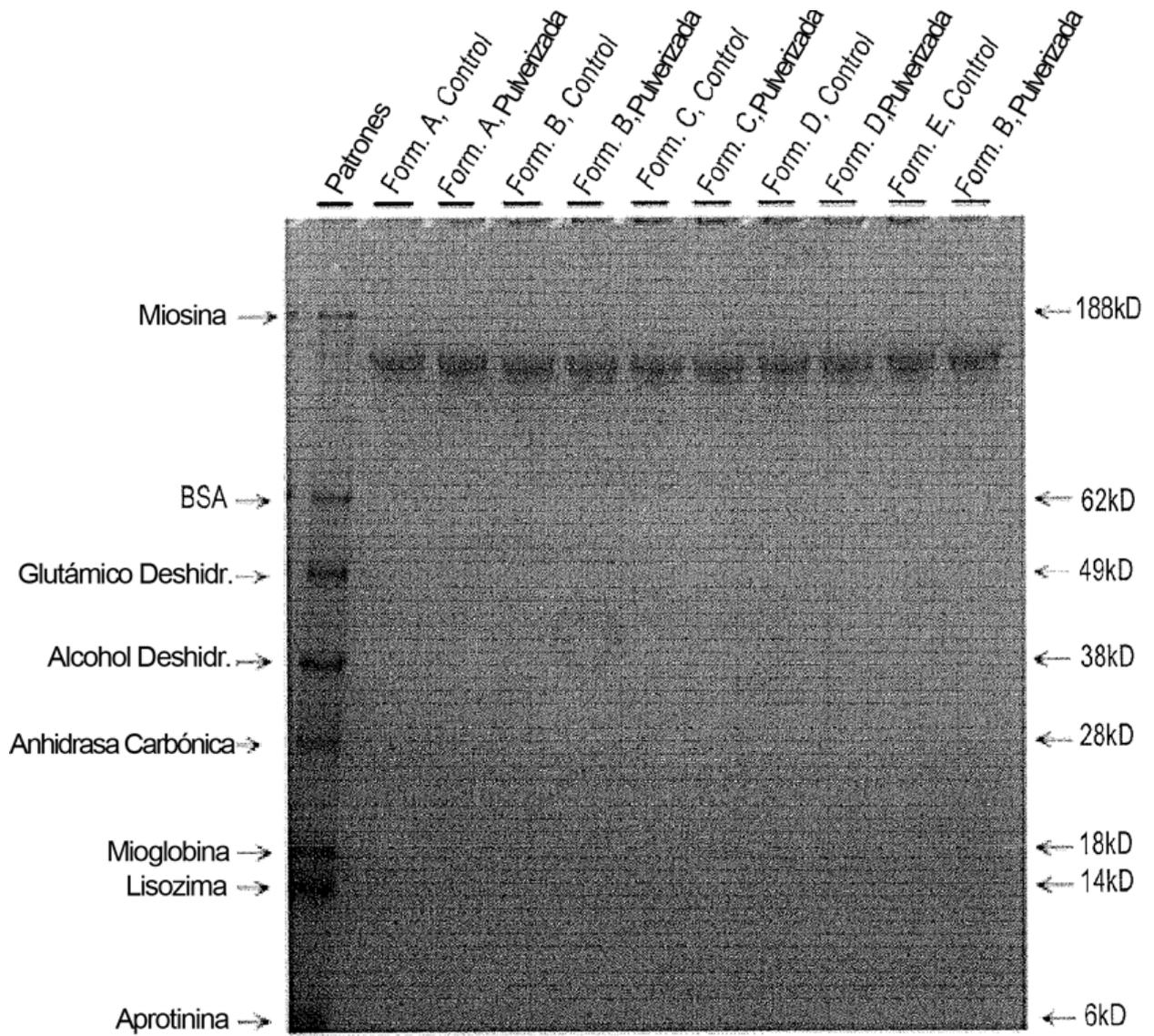


Figura 6A

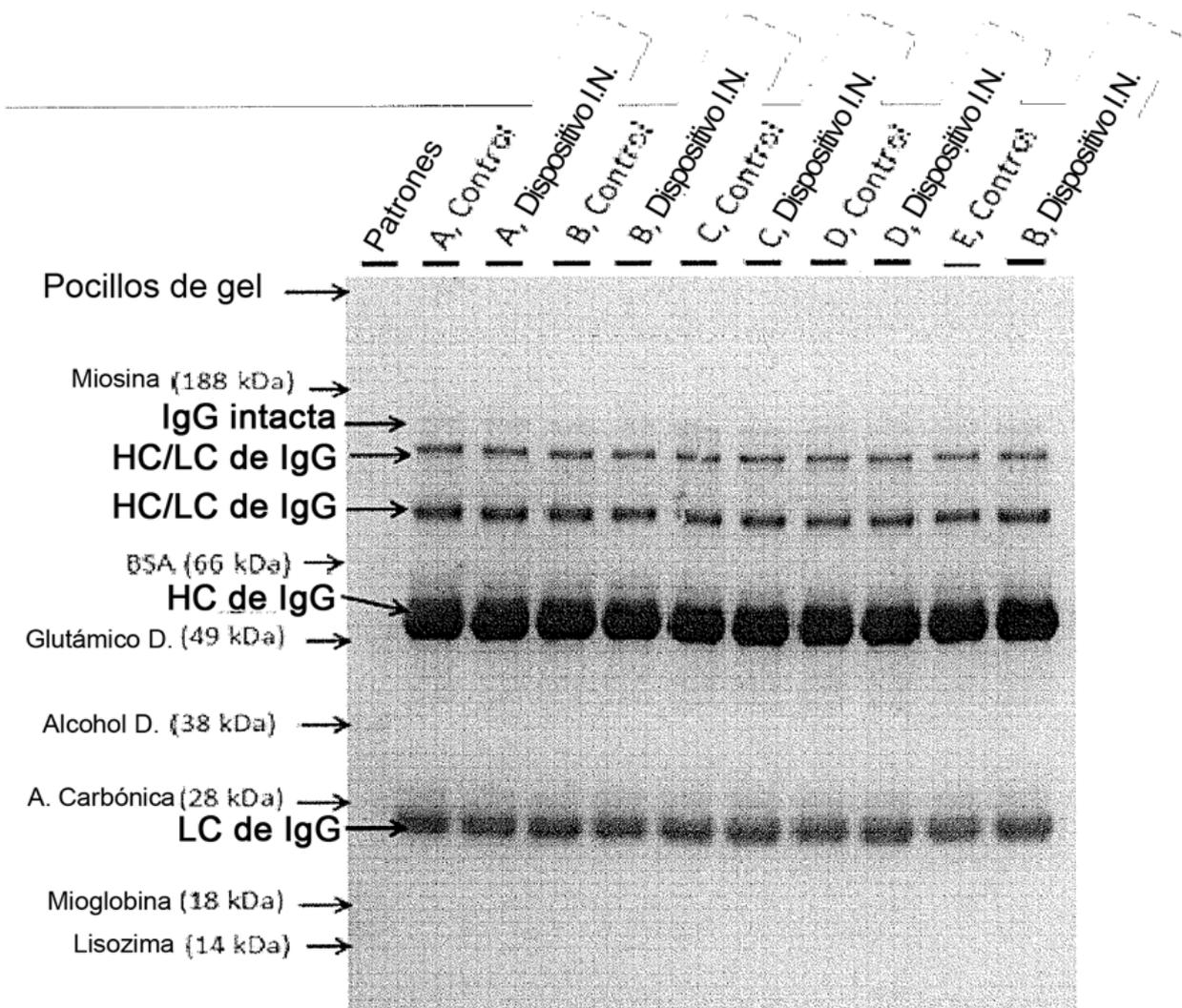


Figura 6B

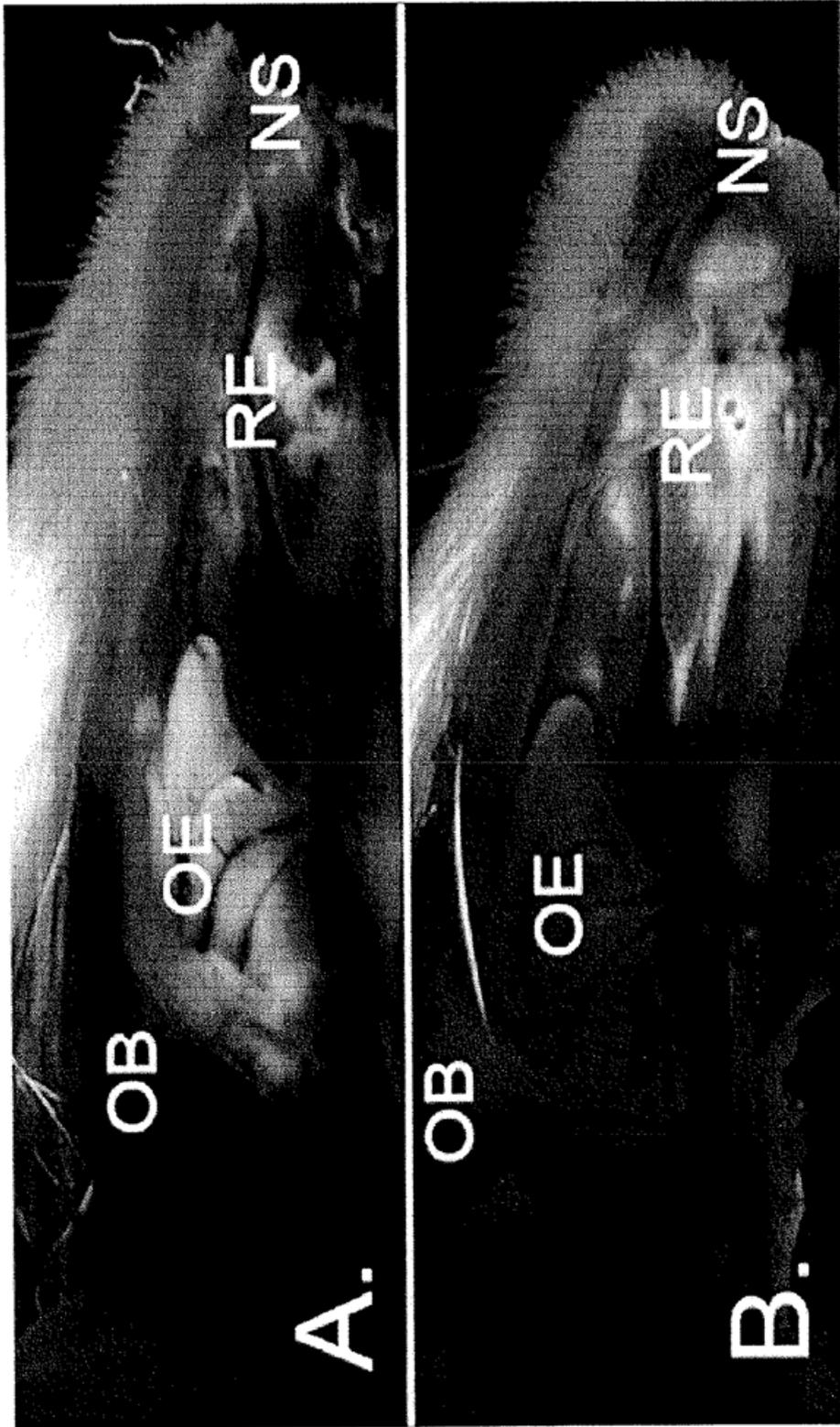


Figura 7

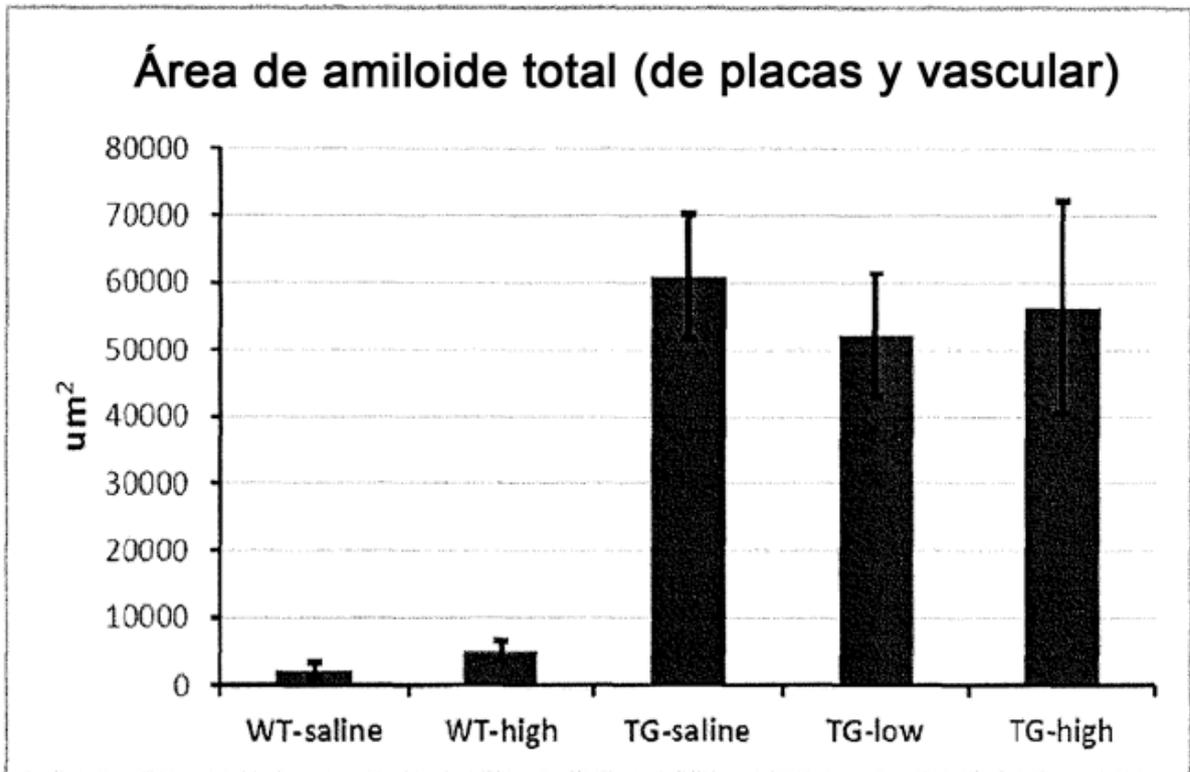


Figura 8A

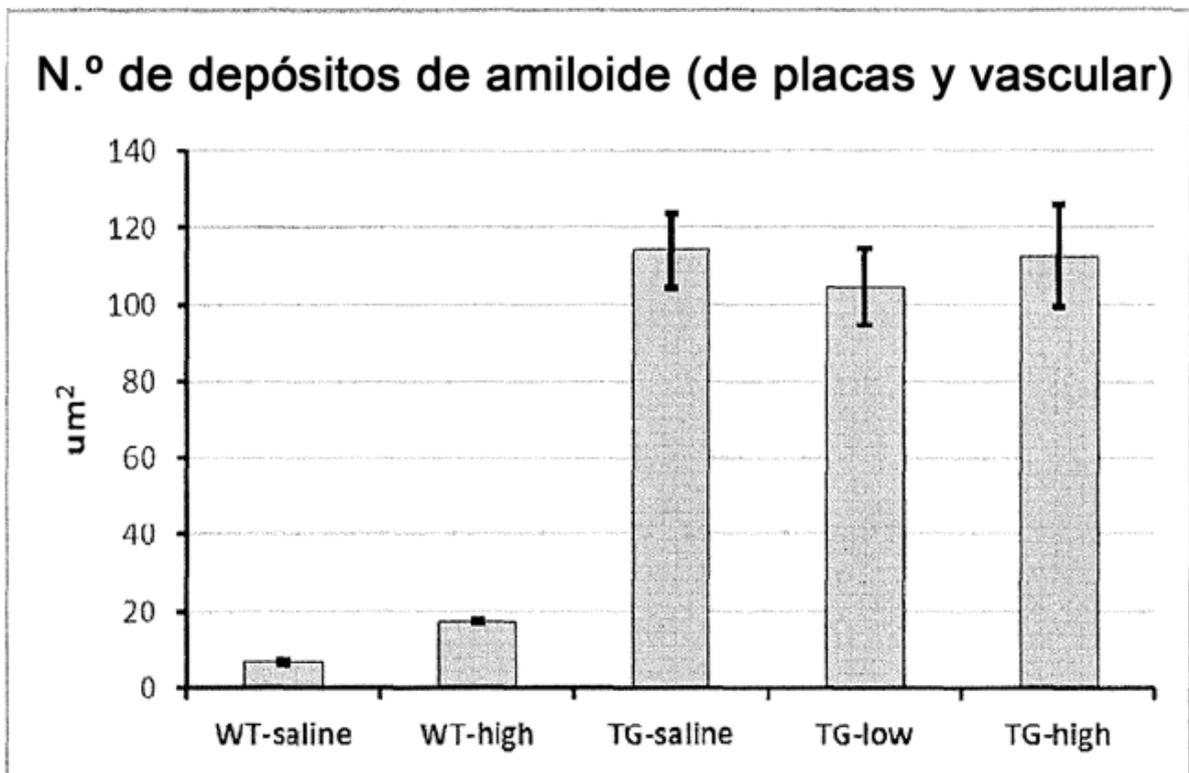


Figura 8B

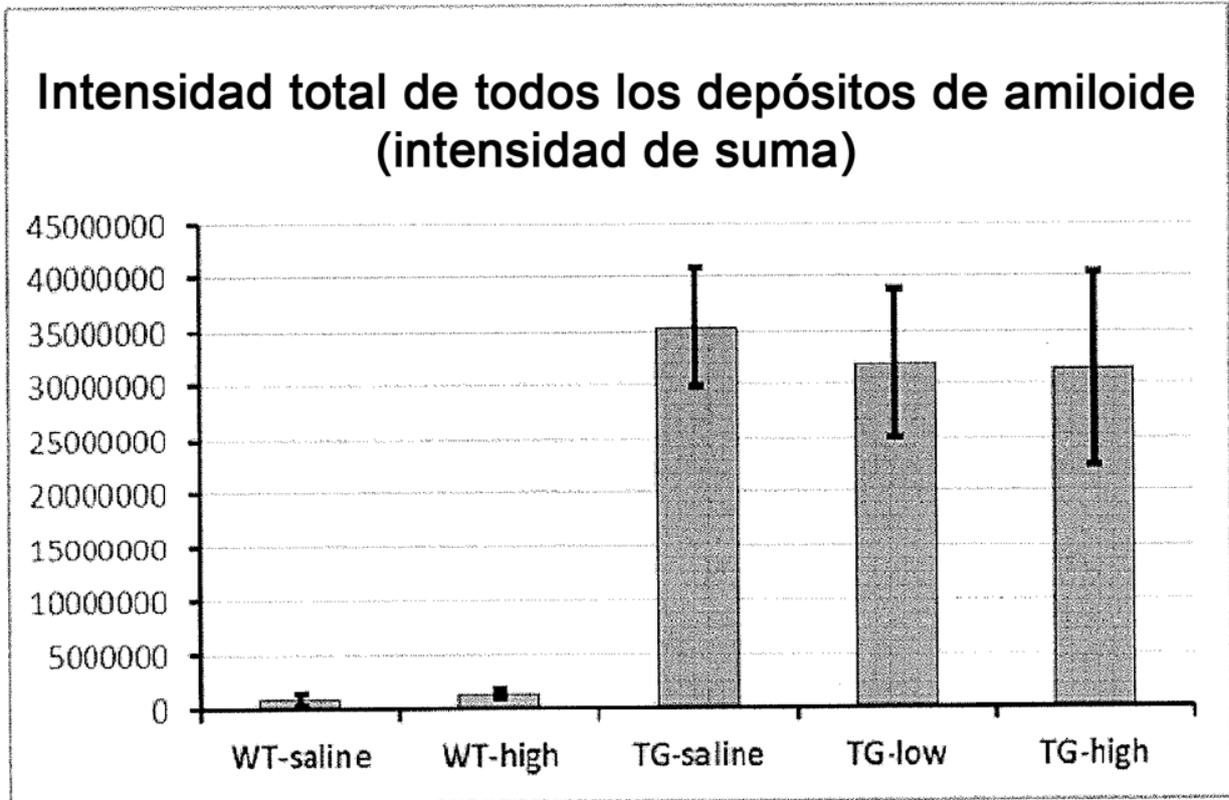


Figura 8C

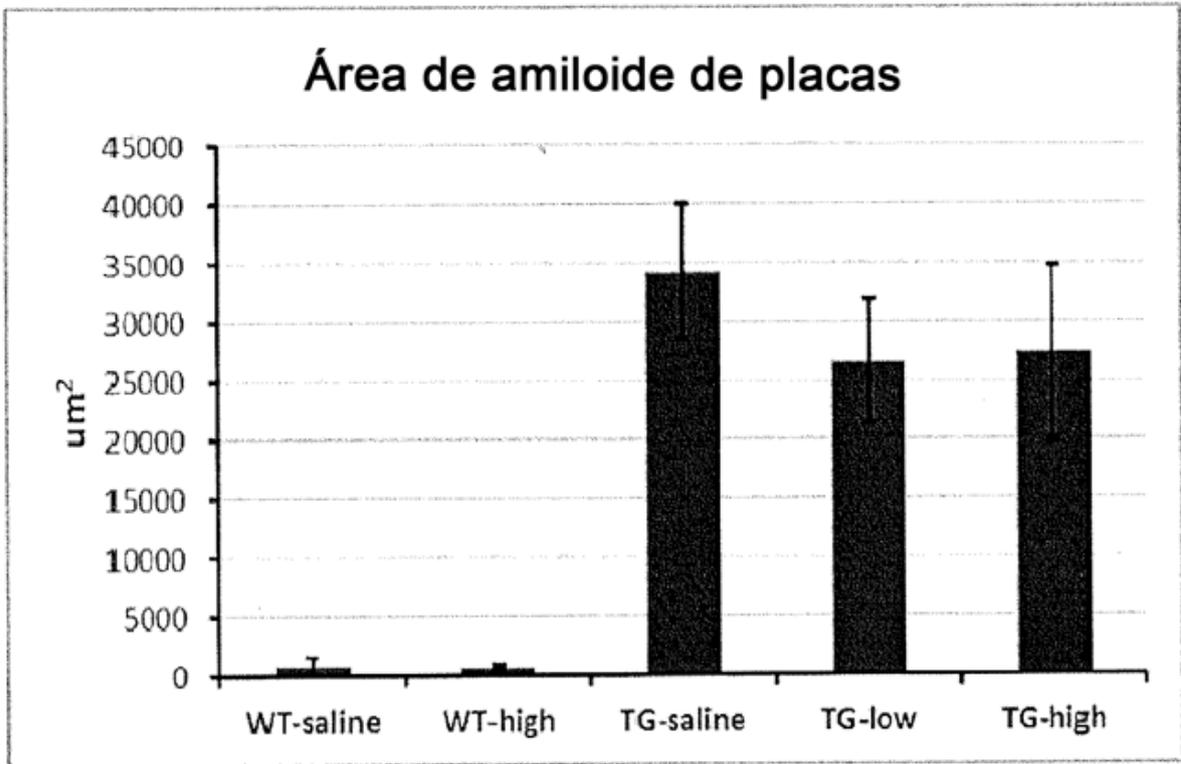


Figura 9A

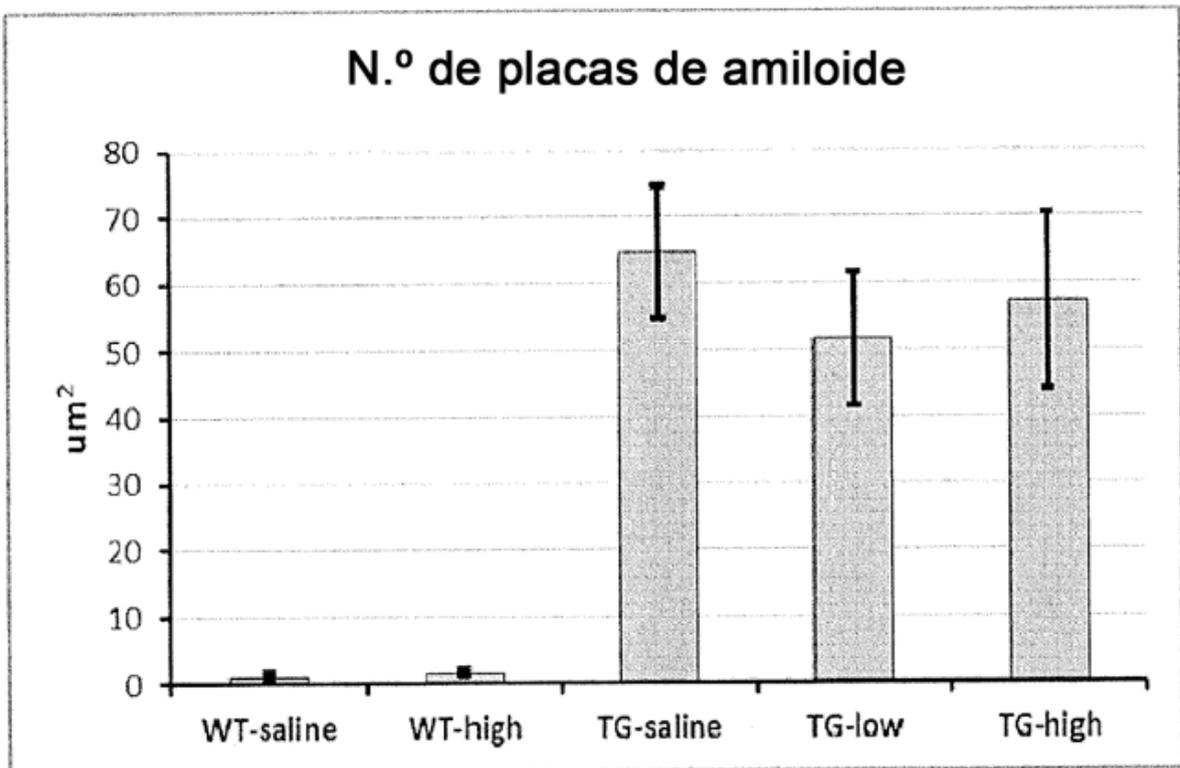


Figura 9B

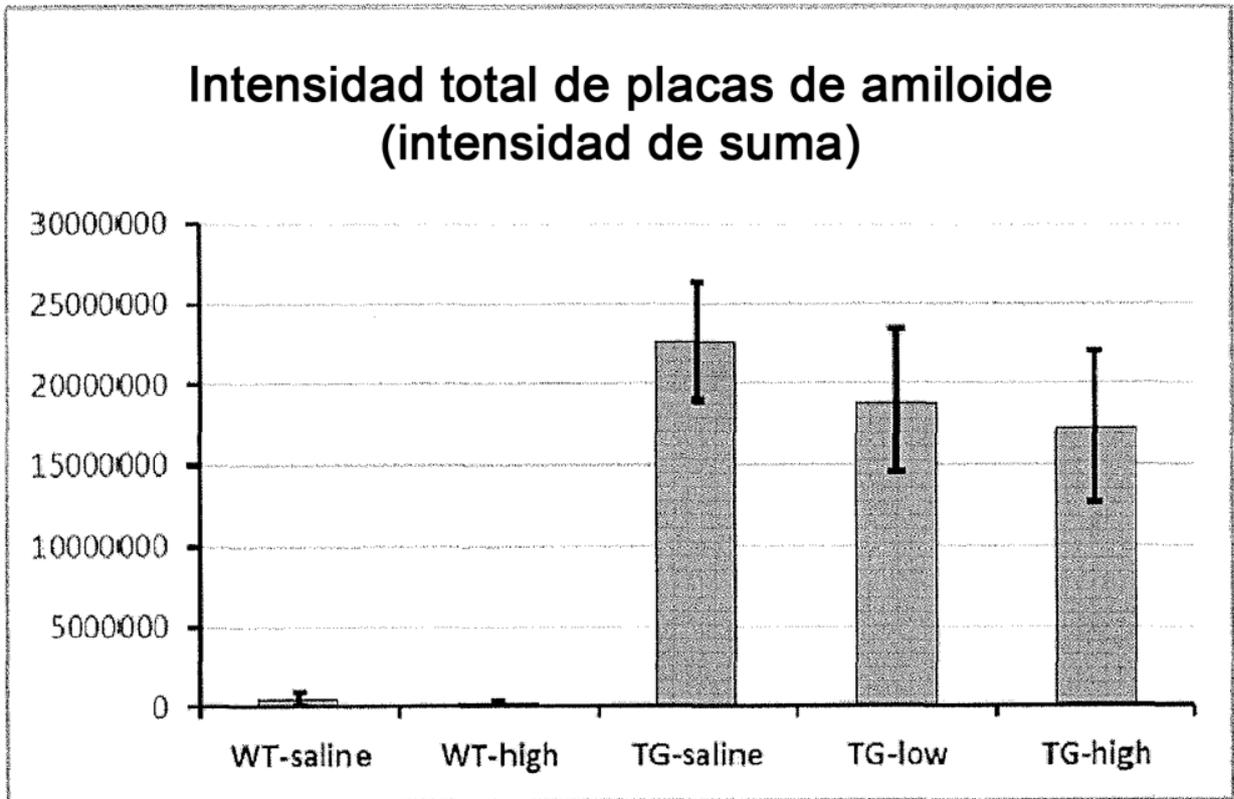


Figura 9C

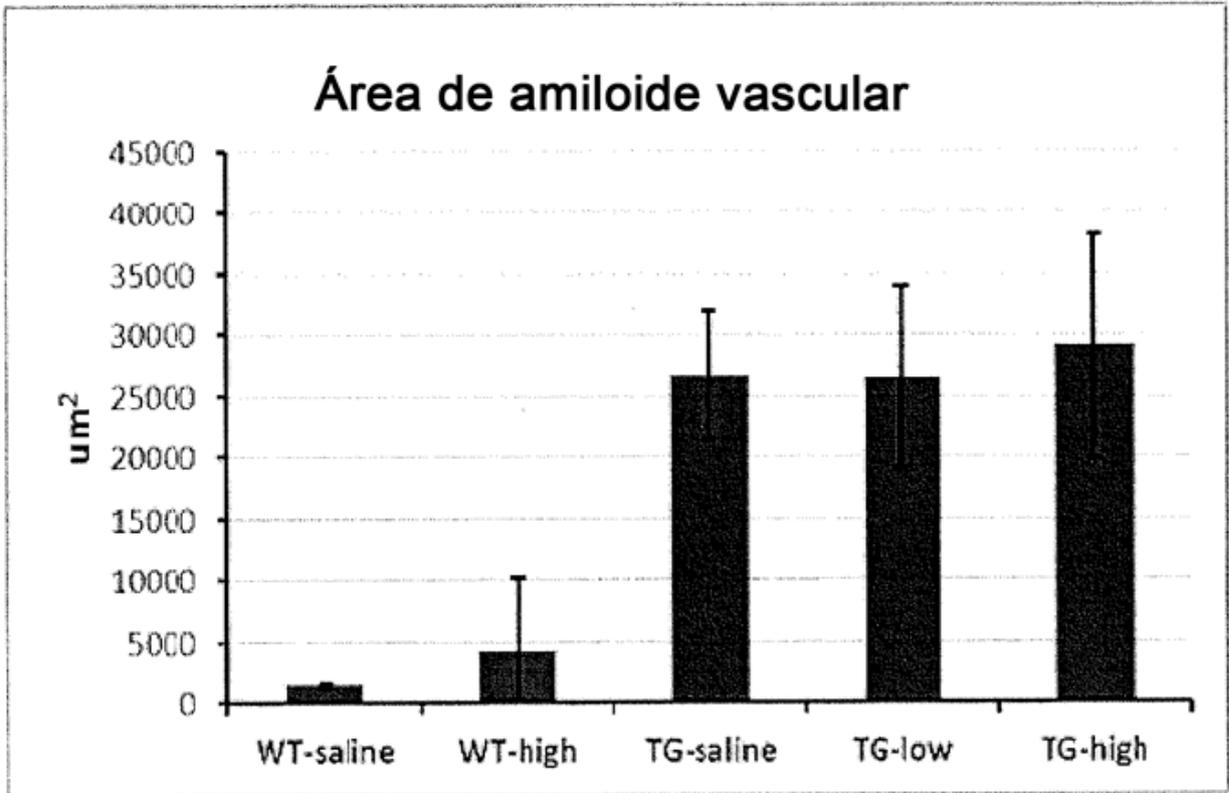


Figura 10A

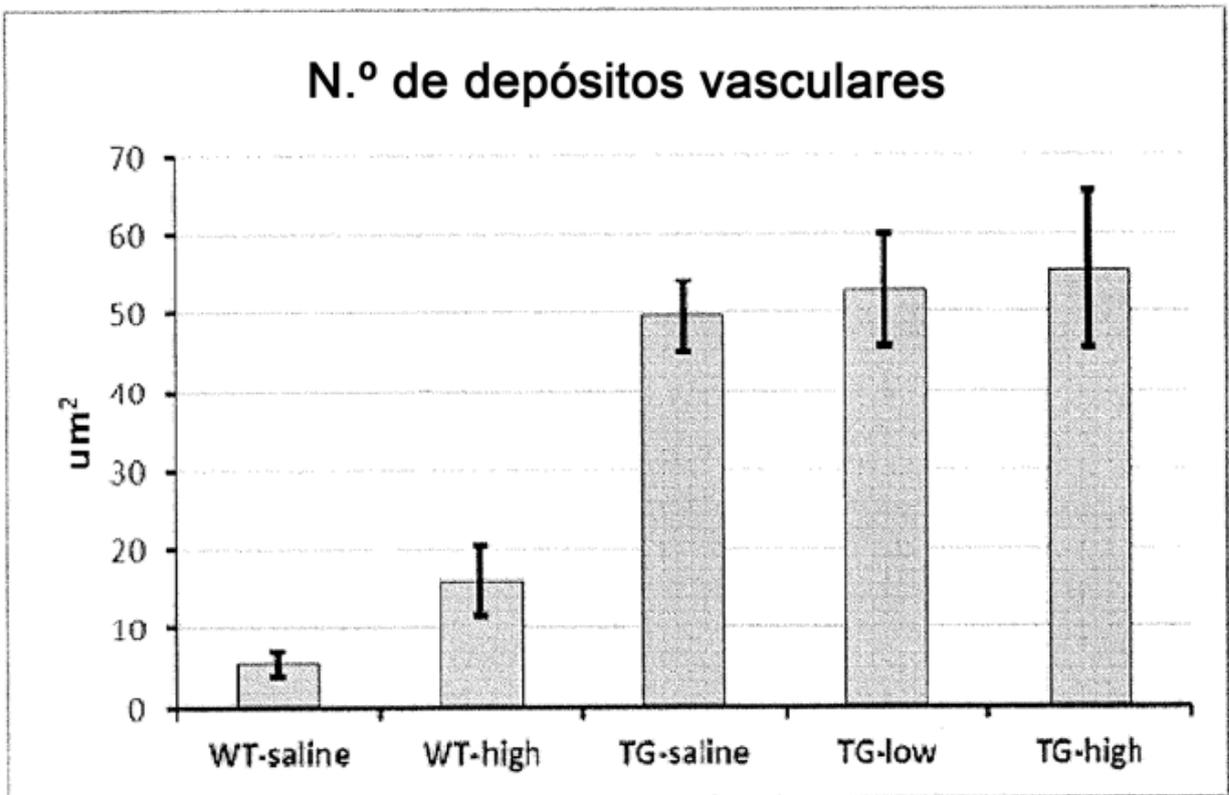


Figura 10B

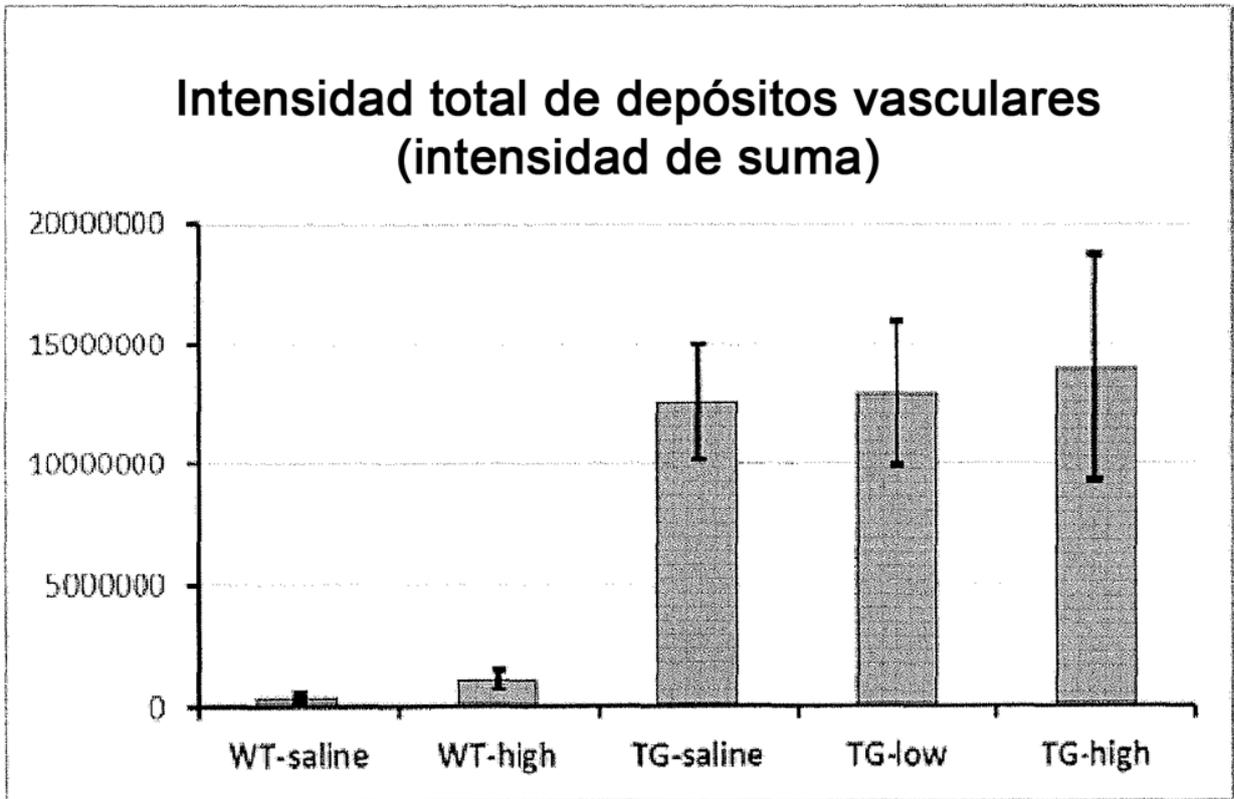


Figura 10C

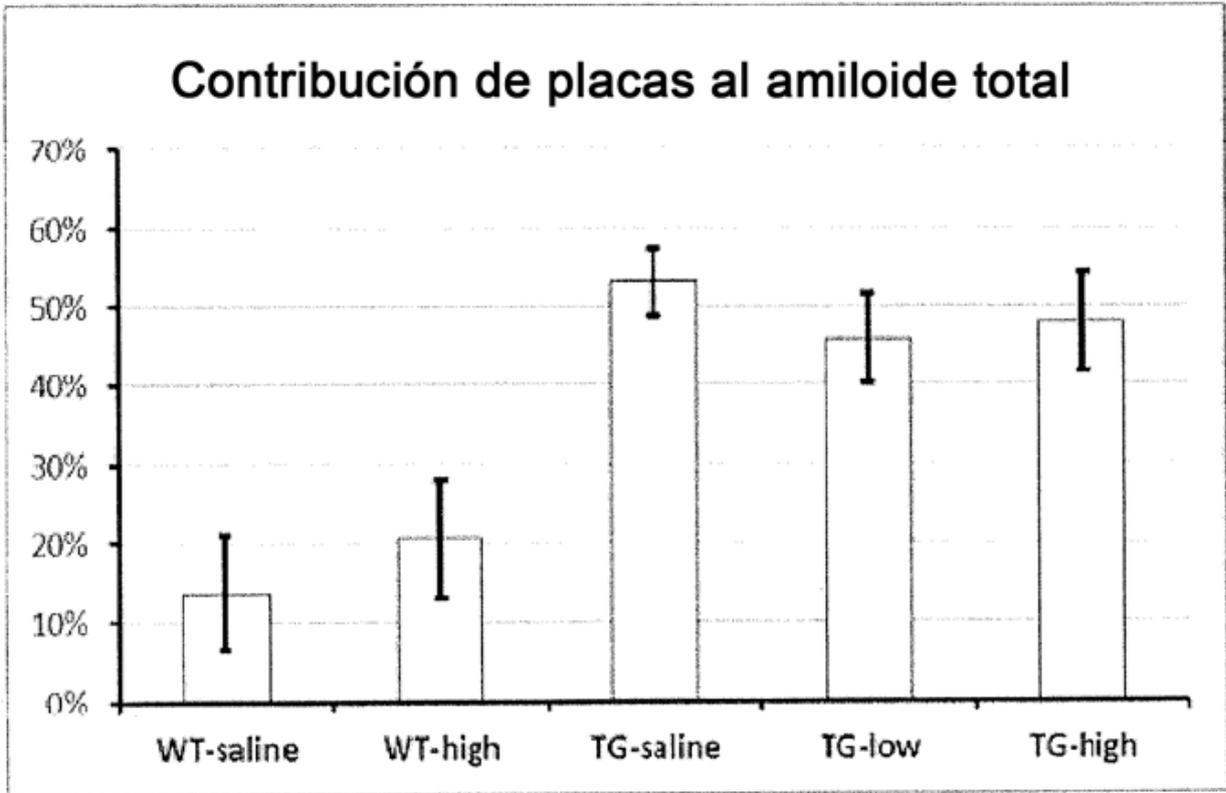


Figura 11A

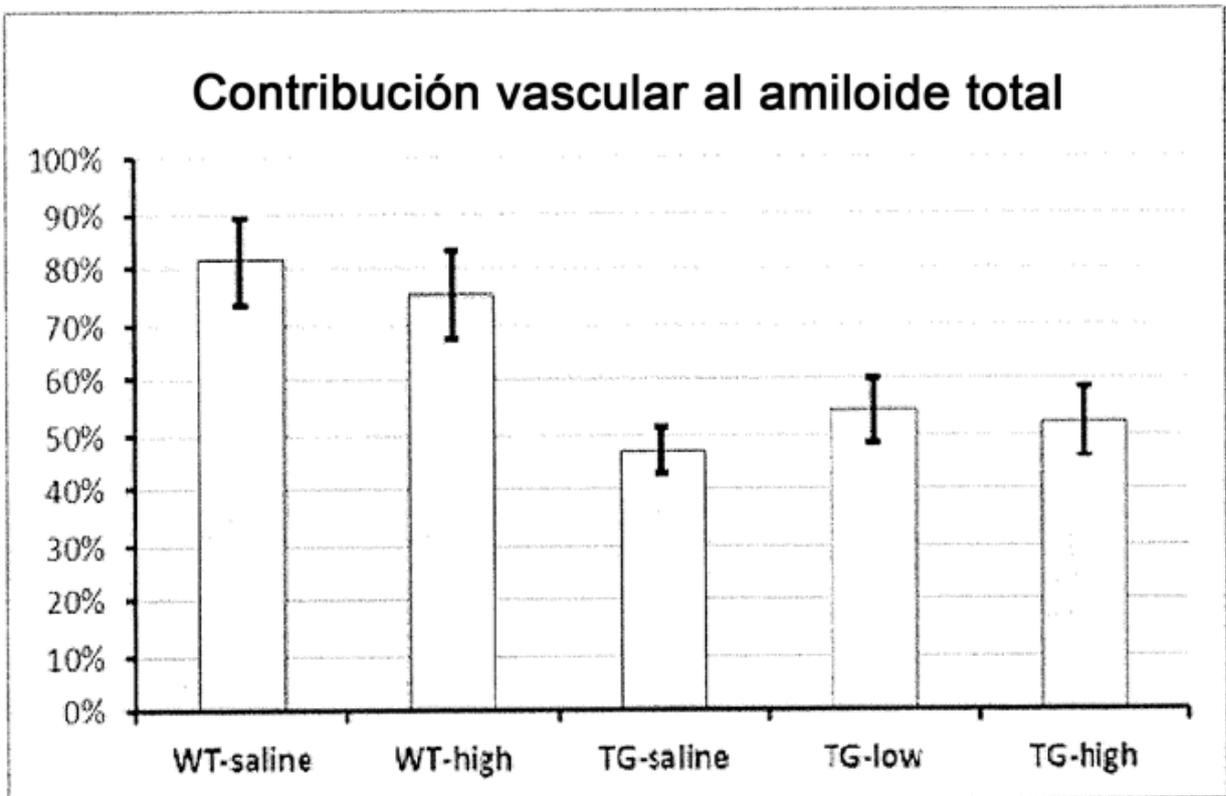


Figura 11B

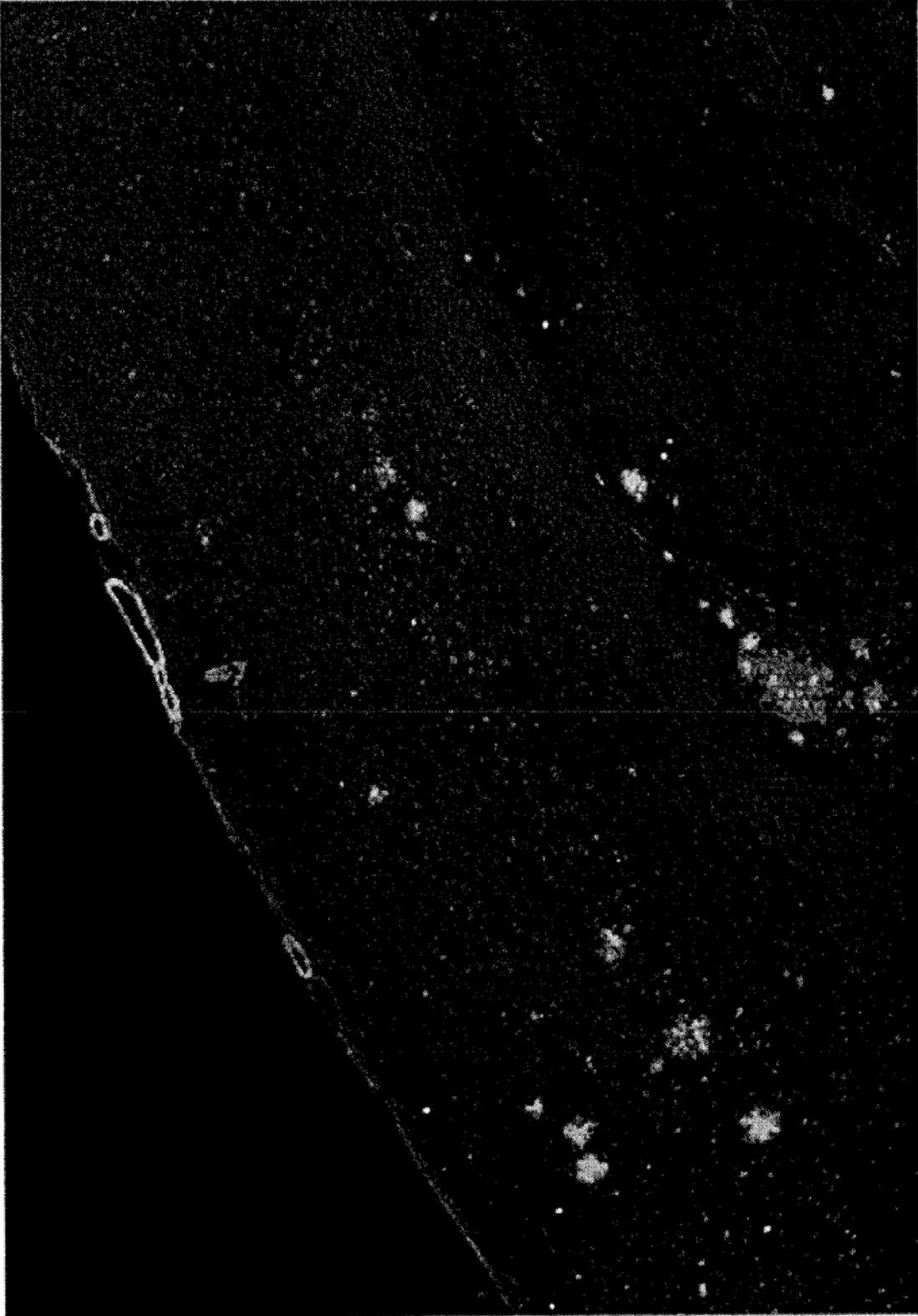


Figura 12A



Figura 12B

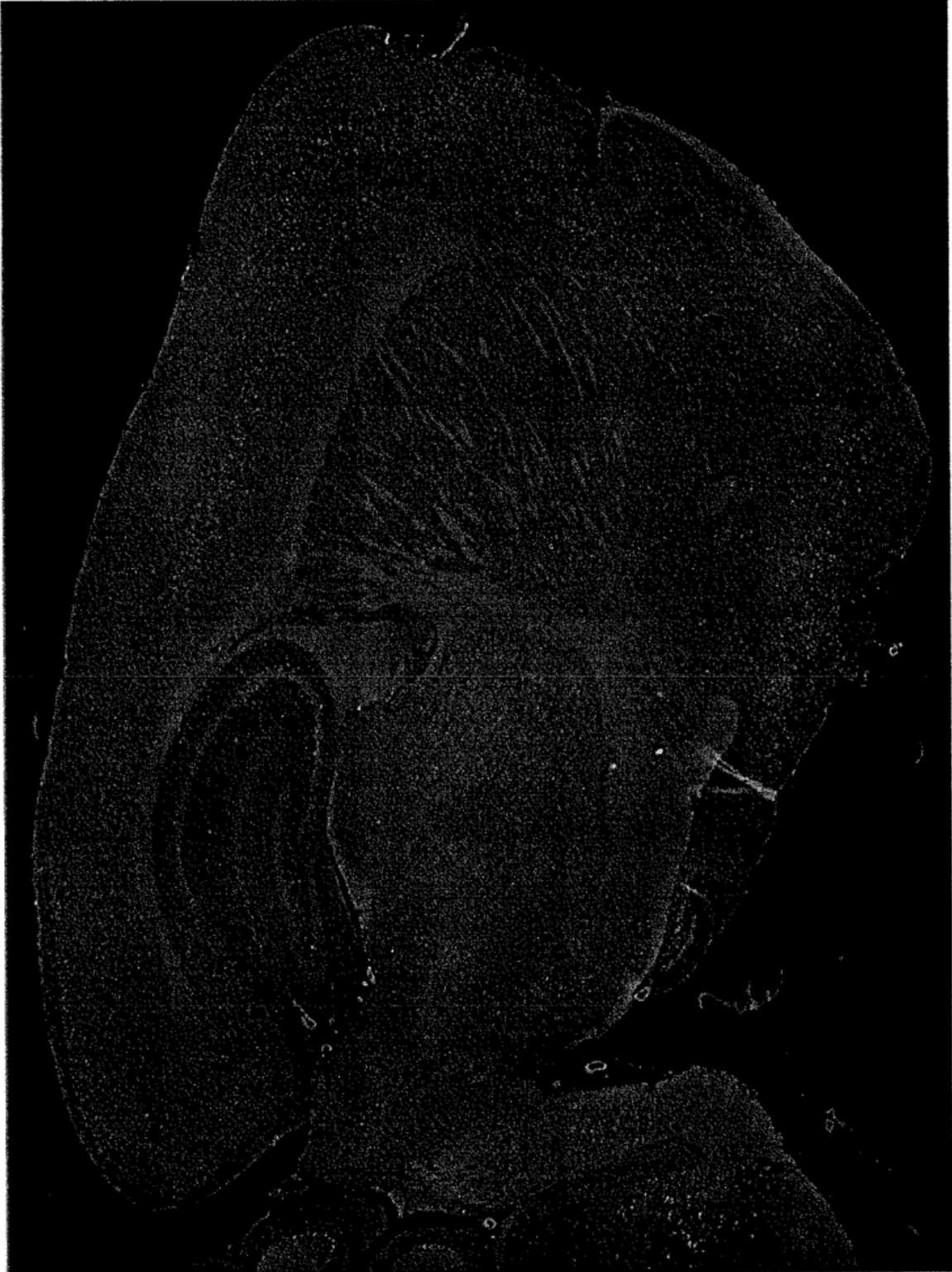


Figura 12C



Figura 12D



Figura 12E

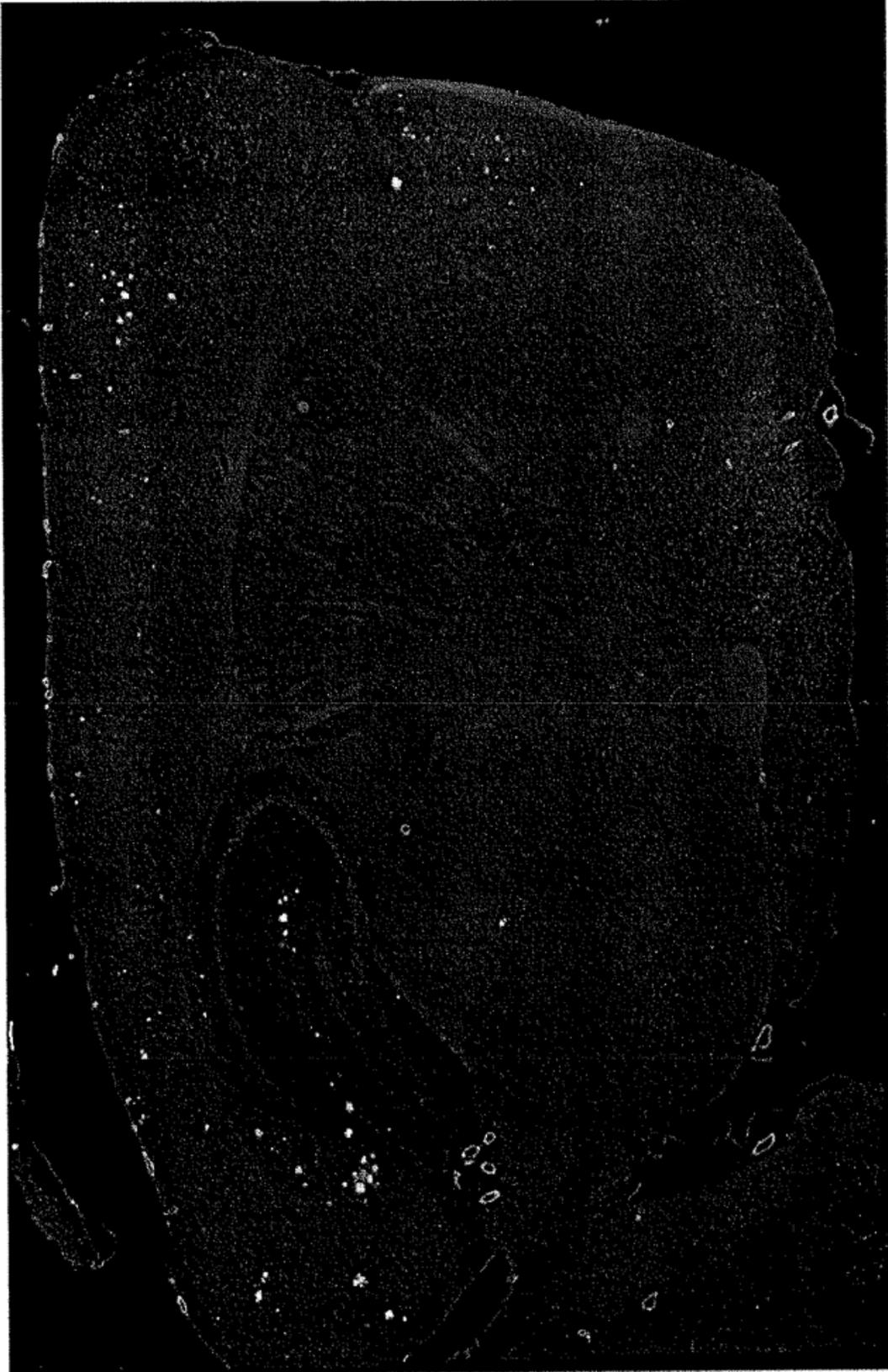


Figura 12F

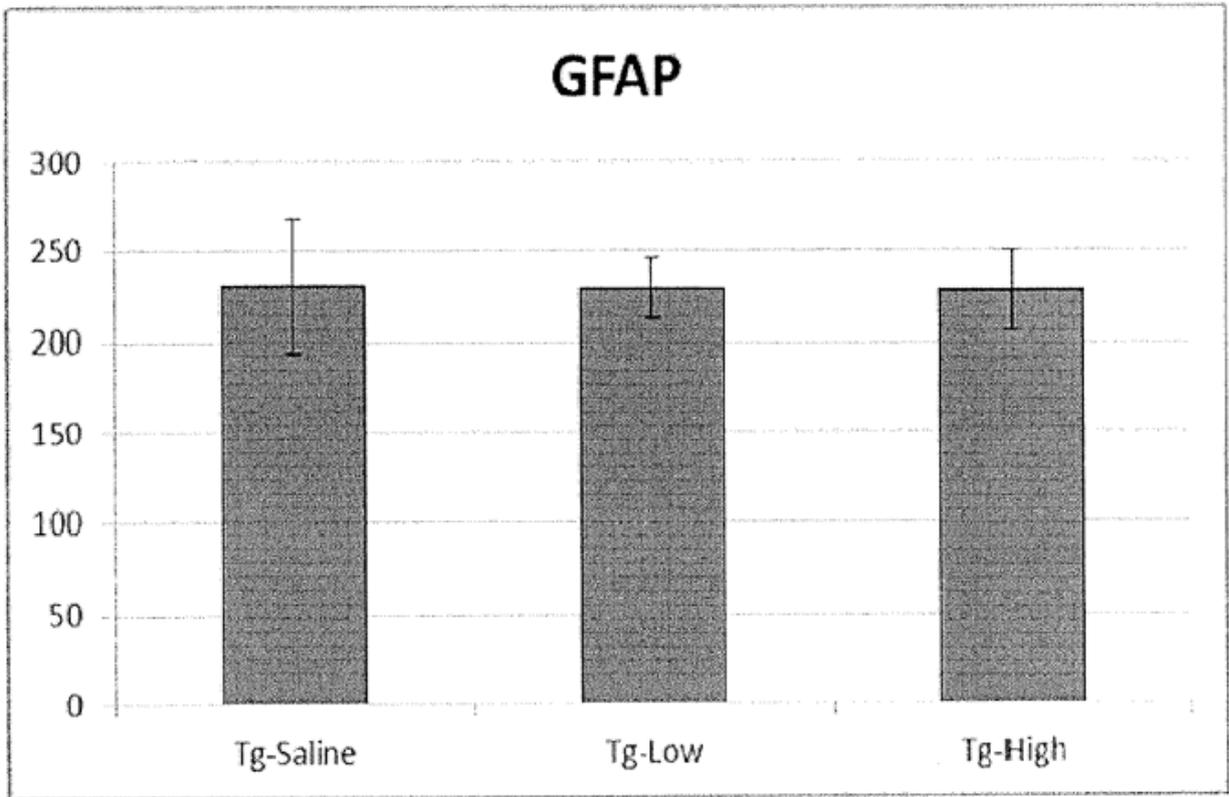


Figura 13A

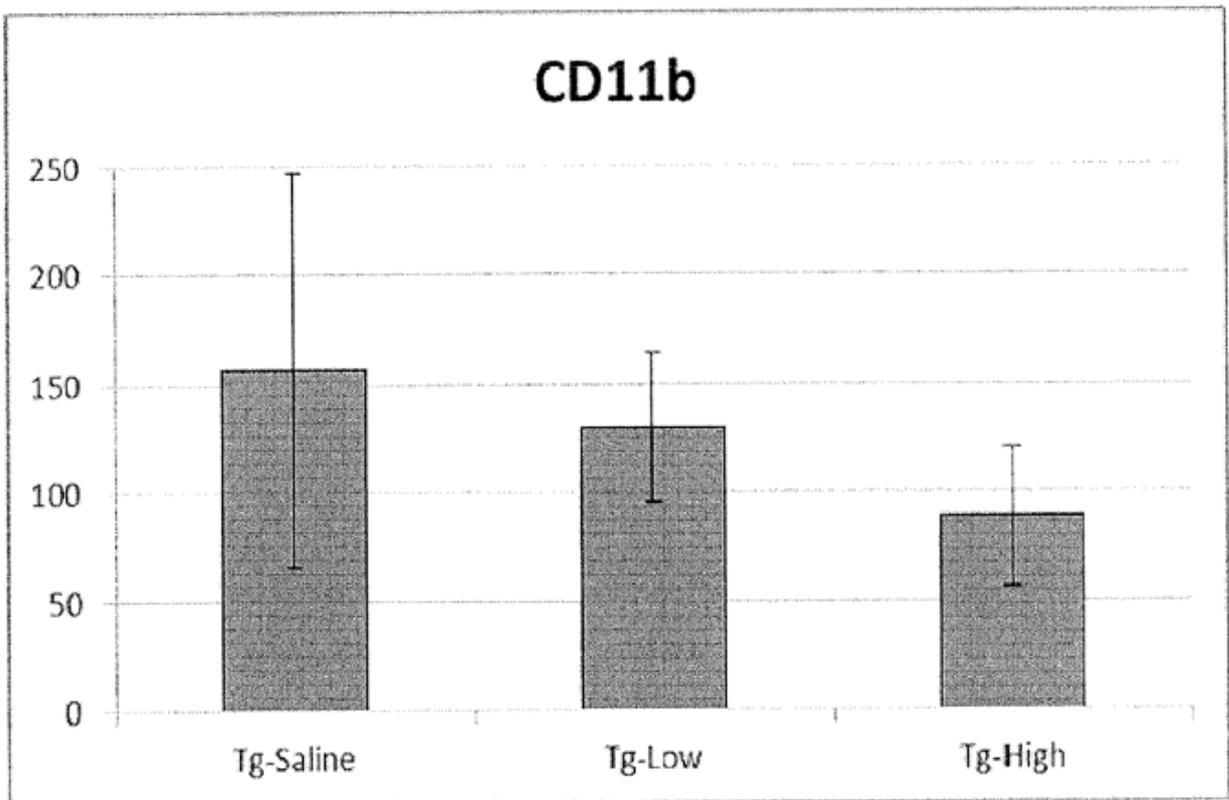


Figura 13B

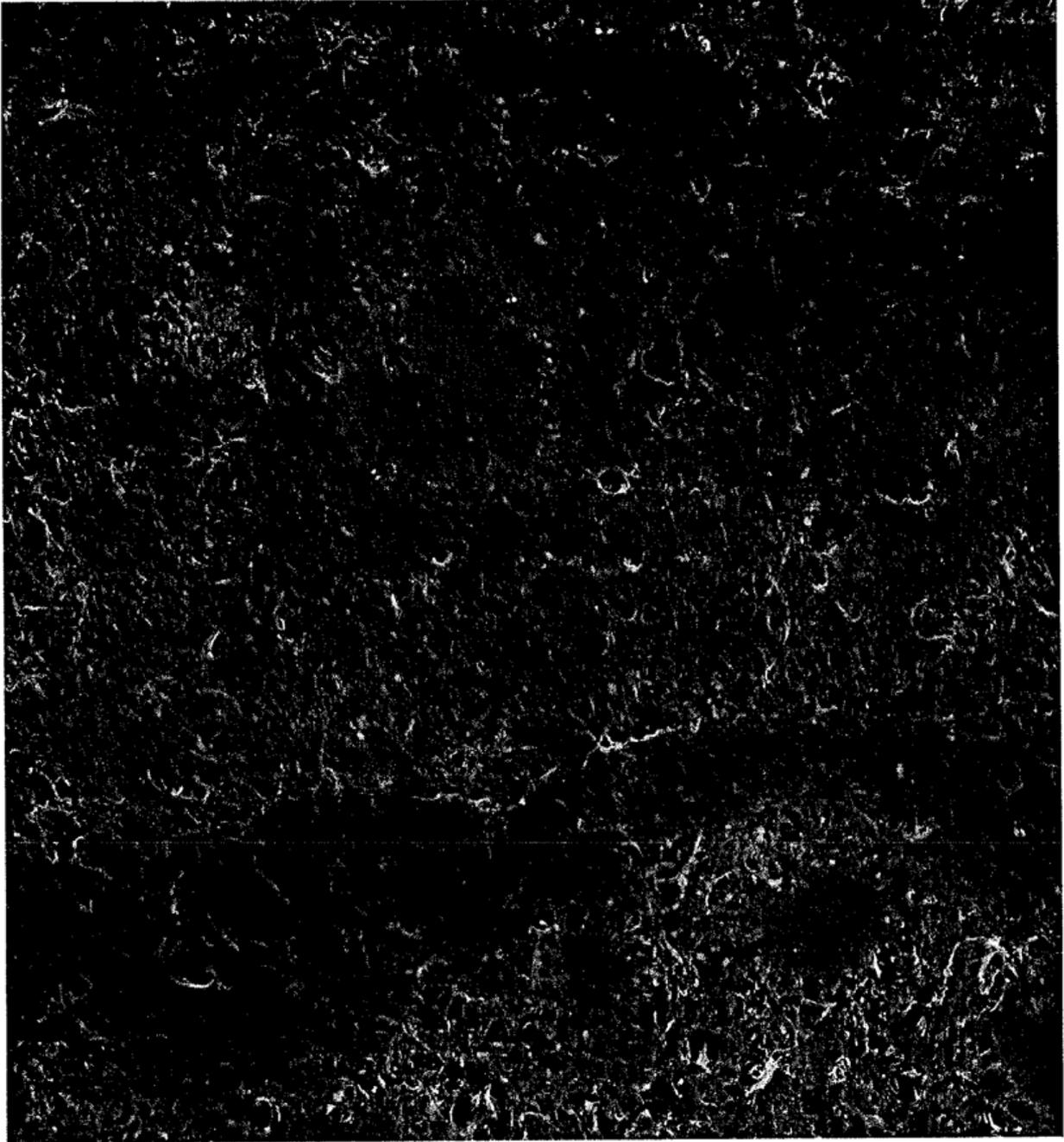


Figura 14