

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 950**

21 Número de solicitud: 201031645

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

A61K 103/34 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

08.11.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.06.2012

Fecha de la concesión:

01.03.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.03.2013

73 Titular/es:

**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS) (33.3%)
EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE SAN LÁZARO
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA (A Coruña)
ES;
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN,
DESARROLLO E INNOVACIÓN DEL COMPLEJO
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
(IDICHUS) (33.3%) y
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CASTILLO SÁNCHEZ, José;
RAMOS CABRER, Pedro;
SOBRINO MOREIRAS, Tomás;
AGULLA FREIRE, Jesús y
BREA LÓPEZ, David**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

54 Título: **LIPOSOMAS CON ANTICUERPOS CONTRA MARCADORES DE LA ZONA PERI-INFARTO CEREBRAL.**

57 Resumen:

Liposomas con anticuerpos contra marcadores de la zona peri-infarto cerebral. La invención se refiere a liposomas, marcados con una sustancia fluorófora como la rodamina o con un agente de resonancia magnética como el gadolinio, que incorporan en su superficie un anticuerpo dirigido contra la proteína de choque térmico HSP70, unido al liposoma por un resto maleimida, y que incorporan también en su composición PEG para aumentar su estabilidad y evitar respuestas inmunes. Dichos liposomas que acumulan en las células que sobreexpresan la proteína HSP70, por lo que pueden utilizarse para identificar dichas células, incluidas las que forman parte de la región peri-infarto cerebral, en la que se sobreexpresa dicha proteína. Los liposomas con gadolinio pueden también utilizarse en un procedimiento para obtener imágenes del cerebro por resonancia magnética a partir de las cuales se puede determinar la región peri-infarto, que será aquella en la que se acumulará más gadolinio (mayor contraste).

ES 2 381 950 B2

DESCRIPCIÓN

Liposomas con anticuerpos contra marcadores de la zona peri-infarto cerebral.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La invención se refiere al campo de la Biotecnología, particularmente dirigida a la identificación y aplicación de marcadores de tejidos. Más concretamente, la invención se refiere a liposomas que presentan en su superficie anticuerpos dirigidos contra proteínas que se expresan en la zona peri-infarto y a la utilización de los mismos para la identificación de dicha región, tanto a partir de imágenes tomadas de pacientes como en muestras de tejido cerebral procesadas *in vitro*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Se denomina ictus a la pérdida de las funciones cerebrales como resultado de la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro. Según su etiología, los ictus tienen dos variantes: isquémicos y hemorrágicos.

El ictus isquémico, también llamado infarto cerebral o isquemia cerebral, se debe a la oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa encefálica, bien sea por arteroesclerosis o bien por la presencia de un émbolo (embolia cerebral) que procede de otra localización.

- 15 El ictus hemorrágico (también conocido como hemorragia cerebral o apoplejía), se debe a la ruptura de un vaso sanguíneo encefálico, ruptura que tiene como causas más frecuentes una elevación de la presión sanguínea o un aneurisma congénito. La hemorragia, además de privar de riego al área cerebral dependiente del vaso sanguíneo afectado, provoca también que la sangre extravasada comprima las estructuras cerebrales, afectando con ello a su funcionalidad e, incluso, a su viabilidad.

- 20 El ictus se están convirtiendo en una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países desarrollados. Debido al progresivo envejecimiento de la población y los hábitos de vida, su incidencia está incrementándose en dichos países. Los avances sobre su tratamiento, en cambio, no van parejos.

- 25 Hasta ahora, el único tratamiento que ha demostrado ser eficaz contra la isquemia cerebral es la trombólisis pero, desgraciadamente, los tratamientos trombolíticos presentan un riesgo importante de empeorar el estado del paciente e, incluso, de provocarle la muerte, por lo que su uso se limita en la actualidad a una fracción reducida de pacientes (menor del 3%) (Kleindorfer *et al.*, 2009). Ante esta circunstancia, los neurólogos se ven obligados a tomar la decisión de aplicar o no el tratamiento trombolítico en función de la relación riesgo/beneficio que ello supondría.

- 30 Uno de los criterios más utilizados para evaluar esa relación riesgo/beneficio es la determinación del tamaño de la llamada "zona peri-infarto". Se llama así a la zona de tejido que está adyacente al núcleo de la lesión y que se considera tejido que, aunque está en riesgo, es potencialmente recuperable, siendo posible inducir en el mismo procesos de neuroprotección y neurorreparación, en contraposición a lo que sucede con el tejido isquémico adyacente (núcleo isquémico), que es tejido ya muerto, básicamente irreparable. Si la zona de tejido "salvable" (la zona peri-infarto) es muy pequeña, lo normal es no aplicar el tratamiento trombolítico, porque los riesgos superan el beneficio. Cuando las dimensiones de la zona peri-infarto van siendo mayores, se considera que merece la pena correr los riesgos asociados a los tratamientos trombolíticos.

- 40 Así, la correcta identificación de la zona peri-infarto y la determinación de su tamaño resulta ser muy importante para tomar una decisión adecuada sobre la aplicación de tratamientos trombolíticos.

- 45 En la actualidad, sin embargo, las decisiones respecto al tratamiento se están tomando a partir de la aplicación de técnicas de neuroimagen en las que no se determina la zona peri-infarto, sino la llamada "zona de penumbra", zona que en ocasiones se asocia con la zona peri-infarto pero que no es exactamente lo mismo y que, en muchas ocasiones, no indica la extensión real del tejido potencialmente recuperable. El concepto de penumbra responde a una zona que tiene una rápida caducidad en el tiempo, apareciendo al tiempo que el tejido isquémico y desapareciendo a las pocas horas, bien porque pase a formar parte de la lesión total final o porque se haya recuperado, convirtiéndose en tejido viable. El concepto, efectivamente, responde a la práctica de efectuar estudios radiológicos a pacientes ingresados en urgencias durante las primeras horas (1 a 6 horas, por ejemplo) posteriores al infarto cerebral. En primer lugar, se recurre a técnicas de tomografía computerizada (TC) cerebral, para confirmar que se trata de un ictus; posteriormente, durante la exploración que sigue, se decide si procede o no hacer una resonancia. Si se considera conveniente, se aplican entonces técnicas de resonancia magnética (RM) craneal en las que se comparan las imágenes obtenidas mediante RM de perfusión (PWI) y RM de difusión (DWI).

La RM de difusión proporciona imágenes basadas en la valoración de la difusión protónica en el agua del cerebro y, en general, se considera que permite detectar la zona de tejido denominada núcleo del infarto, con lesiones irreversibles. La RM de perfusión, por su parte, se basa en el efecto que produce la administración por vía intravenosa de contraste paramagnético durante su primer paso por la red capilar parenquimatosa cerebral, que es proporcional al volumen sanguíneo cerebral y que permite crear distintos mapas de perfusión, siendo los más utilizados los de tiempo de tránsito medio (MTT) o de tiempo hasta pico (TTP), por su gran sensibilidad para detectar regiones cerebrales hipoperfundidas tras una oclusión vascular. Pero la principal aplicación clínica de la RM de perfusión se basa en su capacidad para identificar tejido isquémico potencialmente viable cuando se combina con RM de difusión pues dentro de las primeras horas de evolución del ictus, una gran proporción de pacientes con una oclusión arterial aguda presenta un volumen de tejido hipoperfundido, detectable por RM de perfusión, mayor que el volumen de la lesión detectada mediante RM de difusión (Schellinger *et al.*, 2001). Esta diferencia o desacoplamiento entre ambos volúmenes se conoce con el término de *desacoplamiento (mismatch) DWI-PWI*, y representa una región con hipoperfusión crítica (alteración de los resultados de RM de perfusión), pero sin edema citotóxico (RM de difusión normal). El *mismatch DWI-PWI* es lo que se asocia con la penumbra isquémica, es decir, tejido en riesgo pero potencialmente recuperable mediante tratamientos de reperfusión.

Dicha zona de penumbra se asocia a menudo con la zona peri-infarto, pero no es exactamente lo mismo, entre otras razones, porque la zona de penumbra muchas veces no indica la extensión real del tejido conocido como "salvable". Además, el concepto de penumbra, como se ha apuntado previamente, responde a una zona que tiene una rápida caducidad en el tiempo, apareciendo al tiempo que el tejido isquémico y desapareciendo a las pocas horas, recuperándose para convertirse en tejido viable o pasando a formar parte de la lesión total final, mientras que la zona peri-infarto existiría en un paciente que hubiera padecido un infarto cerebral horas, e incluso días después de haber desaparecido la zona de penumbra.

Por todo ello, se ha pensado que sería más adecuado definir la zona peri-infarto mediante marcadores moleculares. Sin embargo, los estudios encaminados a conocer las particularidades de la zona peri-infarto y a la determinación de marcadores moleculares característicos presentes en ella está tropezando también con dificultades metodológicas. Las metodologías actuales de identificación histológica de la zona peri-infarto en muestras de tejido cerebral implica un procesamiento de las muestras que podría afectar a la integridad del tejido para posteriores técnicas de procesamiento. Esto es especialmente importante en los estudios de proteómica, en los que el tratamiento del tejido podría afectar a las proteínas presentes en el mismo, dificultando su extracción y análisis posterior, razón por la cual en los estudios proteómicos realizados, por ejemplo, en muestras de tejido cerebral extraídas de modelos animales, la zona peri-infarto se define previamente como el tejido que rodea la zona de infarto a una cierta distancia arbitraria del mismo (los 2 mm adyacentes al tejido, por ejemplo). Esa estrategia deja un margen de incertidumbre importante respecto a que el tejido analizado corresponda totalmente a la zona peri-infarto o si realmente dicha región se extiende más allá o es más reducida.

Las técnicas inmunohistoquímicas actuales, por su parte, son lentas y requieren varios pasos: incubación con un anticuerpo durante un mínimo de una o dos horas (o, incluso, durante toda la noche), luego con un anticuerpo secundario marcado con biotina (1 hora), posteriormente con complejos avidina-biotina (1 h), y, por último, revelando el color con un kit de tinción (Kato *et al.*, 1995). Así, la aplicación de las mismas es lenta y engorrosa. Aun así, los estudios inmunohistoquímicos de Kato *et al.* sirvieron para detectar una expresión predominante de una proteína del choque térmico, la proteína HSP70, en neuronas del área peri-infarto.

Así, sería conveniente desarrollar una herramienta que facilitara tanto la obtención de neuroimágenes para determinar la zona peri-infarto de pacientes que han sufrido un infarto cerebral como la identificación de dicha zona en muestras de cerebro *in vitro*, mediante una metodología que no afectara al posterior procesamiento de dicha zona para estudios proteómicos y que, preferiblemente, fuera sencilla y rápida. Todo ello redundaría en un mayor conocimiento de la región peri-infarto, de sus características, sus marcadores específicos, las proteínas que presentan expresión diferencial en la misma y la posible relación entre dicha zona peri-infarto y la conveniencia o no de administrar tratamientos trombolíticos (o de cualquier otro tipo) según las dimensiones de la misma. Con ello, se tendría mayor información para decidir el tratamiento más adecuado para cada paciente según sus características específicas. Además, se facilitaría la obtención de información sobre la expresión diferencial de proteínas en dicha zona y las posibles dianas terapéuticas que se expresen en la misma, posibilitando el diseño de tratamientos complementarios a la trombolisis, específicamente dirigidos a la zona peri-infarto.

En la línea de la utilización de marcadores moleculares para el estudio de pacientes que han padecido un infarto cerebral, y de muestras extraídas de dichos pacientes, la solicitud WO 2006/020269 se refiere al diagnóstico y pronóstico de enfermedades neurodegenerativas mediante el uso de biomarcadores, citándose el infarto cerebral y la isquemia como ejemplos de enfermedades

neurodegenerativas agudas: Los ejemplos de la solicitud, sin embargo, se refieren a la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, que se consideran enfermedades crónicas. En ningún momento se hace ninguna indicación de que las enseñanzas específicas de la solicitud WO 2006/020269 puedan extrapolarse a lo que en ella se consideran enfermedades neurodegenerativas agudas, como el infarto cerebral y la isquemia, por lo que dicha solicitud no aporta marcadores con los que diagnosticar estar enfermedades y, menos aún, para la identificación específica de la zona peri-infarto *in vivo* o en muestras tomadas de cerebro.

La solicitud WO 2008/008846 sí describe un método para el diagnóstico del infarto cerebral mediante obtención de imágenes administrando al enfermo anticuerpos marcados dirigidos contra proteínas específicas. La solicitud, sin embargo, se refiere principalmente al infarto hemorrágico, no al ictus isquémico (de hecho, la definición de la expresión “evaluar un infarto” con que comienza la pág. 20 de dicha solicitud internacional cita sólo los infartos hemorrágicos), con particularmente preferencia por los infartos hemorrágicos intracerebrales. Tal como se repite en distintos puntos de la descripción (véase por ejemplo la pág. 39, líneas 32 a 34), para determinar que un individuo ha sufrido un ictus isquémico, la solicitud WO 2008/008846 indica que es necesario que el individuo presente alteración en la expresión de al menos cuatro genes (presentes en las Tablas 15 ó 17-18 de dicha solicitud WO 2008/008846). En cuanto a las muestras a partir de las cuales podría llevarse a cabo del diagnóstico, sólo se aportan ejemplos referidos al uso de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), aunque se apunta que se podría usar muestras de cerebro. Por tanto, la identificación de la zona peri-infarto no se contempla en la solicitud WO 2008/008846, ni en muestras de cerebro, ni mucho menos a partir de neuroimágenes obtenidas *in vivo*; tampoco se establece relación alguna entre dicha zona y el diagnóstico del ictus isquémico o, más bien, la evaluación de su situación y de la terapia más recomendable en función de la misma.

La solicitud WO 2009/075863 se refiere también al diagnóstico del infarto cerebral mediante la determinación de la presencia de un marcador en una muestra. Aunque no hay una definición específica de “infarto cerebral”, la manera de referirse al mismo a lo largo de la descripción deja claro que se está haciendo referencia al tipo isquémico. Pero la determinación de marcadores se hace siempre en muestras extraídas de individuos, no pareciendo considerar su posible determinación *in vivo* en un estadio temprano. Además, es la ausencia o relativa abundancia de uno o más de esos marcadores en la muestra lo que determina la probabilidad de que no haya existido o se haya producido, respectivamente, un infarto cerebral en un individuo. Entre los posibles marcadores a analizar no se considera la proteína HSP70. En ningún momento se considera tampoco la posibilidad de que alguno de los marcadores citados pueda servir para discriminar, dentro de una muestra tomada de un posible paciente, la presencia y extensión de la zona peri-infarto, ni tampoco se plantea que dichos marcadores puedan servir para hacer ningún tipo de determinación en pacientes vivos, en particular, la localización y extensión de la zona peri-infarto.

En cuanto al diseño de herramientas para ser dirigidas al Sistema Nervioso Central, ya sea con fines analíticos, diagnósticos o terapéuticos, el uso de liposomas se presenta como una opción interesante. Es bien conocido que los liposomas atraviesan la barrera hematoencefálica, incluso conjugados a otros compuestos como, por ejemplo, con maleimida y polietilenglicol (Huwylar *et al.*, 1996; Lu, *et al.*, 2007). Por ello, se ha propuesto su utilización tanto como vehículo de fármacos útiles para el tratamiento de alteraciones o trastornos del Sistema Nervioso Central como para el diagnóstico de los mismos.

Así, por ejemplo, el documento WO 2009/022756, se refiere a una composición tanto para el tratamiento o la prevención de un daño isquémico en el Sistema Nervioso Central (SNC) como para el diagnóstico del mismo. La composición contiene un liposoma y sialil-Lewis X (SLX) o un grupo SLX. En el caso de utilizarse para diagnóstico, incluye además una sustancia marcadora. Se menciona además que la invención proporciona un medio para distribuir una sustancia diana al interior de las células. No se menciona, sin embargo, que los liposomas presenten ningún resto que facilite su acumulación en alguna región específica del cerebro.

Una de las sustancias marcadoras que se han utilizado para detectar la presencia de los liposomas en el SNC es el gadolinio, que ha demostrado ser útil para la obtención de imágenes de resonancia magnética del Sistema Nervioso Central (Saito *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2005).

El documento US 2007/0254842, por su parte, describe, en general, un sistema para la administración de agentes neuroterapéuticos al Sistema Nervioso Central de mamíferos para tratar trastornos asociados con la muerte y/o la disfunción neuronal, comentando la posibilidad de que la población de células a tratar esté afectada por un infarto cerebral. En una realización preferida, el vehículo del agente neuroterapéutico es un liposoma, y la composición farmacéutica contiene un agente trazable, que puede ser un agente de contraste para resonancia magnética, citándose como realización especialmente preferida aquella en la que la composición farmacéutica contiene un liposoma que contiene un quelato de gadolinio. En la solicitud se afirma que los agentes trazables basados en liposomas son

indicadores directos muy precisos de la distribución de los neuroterapéuticos de alto peso molecular basados en liposomas. Como en el caso anterior, en el documento no se propone que los liposomas presenten ninguna molécula que los dirija preferencialmente a una ninguna zona específica del cerebro.

- 5 Ninguno de los documentos discutidos menciona marcadores específicos que permitan la identificación específica de la zona peri-infarto *in vivo*. Tampoco se mencionan moléculas cuya expresión diferencial ayudara a que los liposomas suministrados a un individuo se localizaran preferentemente en la zona peri-infarto, facilitando la determinación de dicha zona. Por otra parte, las desventajas de los actuales métodos de identificación de dicha zona *ex vivo*, en muestras de cerebro previamente extraídas de individuos, no quedan solventadas a partir de las enseñanzas de los documentos discutidos. Así, como se mencionó previamente, sería interesante desarrollar una herramienta, que facilitara tanto la obtención de neuroimágenes para determinar la zona peri-infarto de pacientes que han sufrido un infarto cerebral como la identificación de dicha zona en muestras de cerebro *ex vivo* mediante una metodología que no afectara al posterior procesamiento de dicha zona para estudios proteómicos y que, preferiblemente, fuera sencilla y rápida.
- 10
- 15 La invención proporciona una solución a estos problemas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se basa en el hecho, reflejado en el Ejemplo 1 de la presente invención, de que la zona peri-infarto presenta sobreexpresión de la proteína de choque térmico HSP70 con respecto a la expresión detectada en la zona contralateral de muestras de cerebro tomadas de los mismos individuos (modelos animales de infarto cerebral). De esta manera, si a un individuo se le suministran liposomas con una estructura que les permita atravesar la barrera hematoencefálica y que, además, presenten en su superficie anticuerpos anti-HSP70, dichos liposomas se acumularán preferentemente en la región del cerebro donde la proteína HSP70 esté sobreexpresada, es decir, la región peri-infarto. El marcaje de dichos liposomas con un marcador que permita detectar fácilmente la presencia de los liposomas, tal como complejos de gadolinio que permitan su detección por resonancia magnética, permitiría la fácil obtención de neuroimágenes en las que determinar la localización y extensión de la zona peri-infarto como aquella zona en la que se presente mayor señal asociada a los complejos de gadolinio, es decir, menor tiempo de relajación.
- 20
- 25

- Dichos liposomas, además, podrían servir para la identificación *in vitro* de cualquier tipo de célula presente en una muestra que sobreexpresara dicha proteína, lo cual podría ser indicativo, por ejemplo, de haber sido sometidas a un choque térmico (como sucede con los astrocitos que se utilizan más adelante en el Ejemplo 3 de la presente invención) o, igualmente, la identificación podría servir para distinguir distintos tipos de células presentes en una muestra. De esta manera, las células podrían formar parte de un cultivo *in vitro* o, igualmente, podrían estar en una muestra de tejido. Dicho tejido podría ser, por ejemplo tejido cerebral, de manera que los liposomas podrían servir igualmente para determinar la zona correspondiente a la región peri-infarto en una muestra de tejido cerebral. De esta manera, al contrario de lo que está sucediendo con los estudios proteómicos actuales, el análisis de las proteínas con expresión diferencial en la zona peri-infarto podría hacerse directamente sobre la zona identificada, con una mayor seguridad de que la zona analizada es realmente la región peri-infarto de esa muestra, teniendo los resultados obtenidos una mayor fiabilidad. Además, la sencillez del tratamiento con liposomas y la rapidez del procedimiento necesario para el análisis de las muestras tratadas con liposomas supone una gran ventaja respecto a los tratamientos inmunohistoquímicos actuales, que necesitan varias etapas y requieren muchas horas para llegar al resultado final.
- 30
- 35
- 40

- El uso de liposomas con un doble marcaje (con complejos de gadolinio y con un fluoróforo, como la rodamina) supondría una ventaja adicional, pues la utilización de dichos liposomas permitiría el análisis de muestras *in vitro* mediante dos técnicas diferentes, según se tenga preferencia en cada momento: por análisis de la señal de fluorescencia emitida por las muestras o por estudios de resonancia magnética.
- 45

- Por todo ello, la invención se refiere a liposomas que presentan en su superficie un anticuerpo contra la proteína de choque térmico HSP70 unida al liposoma por un grupo maleimida y que, además, están marcados con un fluoróforo (preferiblemente rodamina) y/o con un complejo de gadolinio, así como al uso de los mismos tanto para la identificación *in vitro* de células que sobreexpresan la proteína HSP70 (incluidas las células que forman parte de la región peri-infarto de una muestra de tejido cerebral, opción que permite la determinación de la misma) y a un procedimiento para la determinación de la zona peri-infarto en un individuo mediante estudios de resonancia magnética en los que se tomen neuroimágenes y se identifique la zona en la que la hay mayor acumulación de liposomas (mayor acumulación de gadolinio).
- 50
- 55

Ninguna de las anterioridades mencionadas en el apartado de "Antecedentes de la invención" hacía referencia a liposomas que presentaran anticuerpos anti-HSP70 en su superficie, particularmente si

se consideran los liposomas que presenten en su composición PEG, DTPA y gadolinio, por lo que los liposomas de la presente invención suponen una ventaja para el estudio del infarto cerebral que no se había contemplado hasta ahora. Además, ninguna de dichos documentos hacía referencia a la posibilidad de utilizar la proteína HSP70 como un marcador de la región peri-infarto. Sólo el grupo de Kato et al. (Kato el al, 1995), había apuntado a la sobreexpresión de dicha proteína en la zona peri-infarto, pero no se había propuesto su uso como marcador de dicha región, ni se había sugerido que pudiera ser de utilidad utilizar anticuerpos dirigidos contra la proteína HSP70 para la determinación de dicha zona.

Debe mencionarse, además, que el estudio en el que se basa la presente invención es el primer estudio que establece diferencias entre dos partes diferentes de un mismo cerebro en animales isquémicos, analizando la zona ipsilesional (la correspondiente al hemisferio en el que se encuentra la región peri-infarto, que es la zona en riesgo, en la que conviene inducir procesos de neuroreparación) y la zona contralateral (que corresponde a tejido sano, que se encuentra en el otro hemisferio) y que este tiene gran interés desde el punto de vista diagnóstico y de diseño de terapias. Los estudios previos realizados pretendían diagnosticar la producción y el tipo de ictus que ha tenido lugar a partir de muestras de tejidos o en sangre, mientras que en la presente invención no se pretende detectar la presencia de un ictus, que se asume como ya diagnosticado, sino identificar la zona peri-infarto, objetivo no planteado previamente. La identificación de esta zona a partir de neuroimágenes tomadas de pacientes permitirá hacer una elección más adecuada de las terapias administrar a cada paciente y, especialmente, determinar con mayor certeza cuándo puede ser conveniente administrarle una terapia trombolítica y cuándo el pequeño tamaño de dicha zona hace desaconsejable dichas terapias, por no verse compensado su posible beneficio por el riesgo asociado.

Los únicos estudios que tienen cierta relación con este análisis comparativo realizado por los autores de la presente invención son los referidos a la llamada zona de penumbra. Pero la zona de penumbra, como se ha discutido previamente, tiene menos relación con la situación real de un paciente en el que se hubiera producido un infarto cerebral, pues el concepto de penumbra responde a una zona que tiene una rápida caducidad en el tiempo. Así, el hecho de que los autores hayan realizado su estudio a las 48 horas de la lesión supone una diferencia significativa con respecto a los estudios previos, con respecto a los que supone una gran ventaja, pues posibilita la realización de estudios y la extracción de conclusiones sobre las terapias a aplicar con posterioridad a como se venía haciendo hasta ahora, que era a las pocas horas del infarto cerebral. Por tanto, tanto los liposomas de la presente invención como los usos propuestos para los mismos (identificación de células *in vitro* que sobreexpresan HSP70 y obtención de neuroimágenes a partir de las cuales determinar la región peri-infarto, suponen un avance interesante, no sugerido por otros autores.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un liposoma basado en 1,2-Diestearoil-sn-Glicerol-3-fosfolina (DSPC), colesterol, 1,2-Diestearoil-sn-Glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[Metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE) y maleimida-PEG2000-DSPE, caracterizado porque el liposoma presenta anticuerpos dirigidos contra la proteína de choque térmico de 70 kDa (anti-HSP70) unidos al liposoma por el grupo maleimida.

Son realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que las proporciones molares entre DSPC y colesterol en los liposomas varían entre 2,5:1 y 1,5:1, así como aquellas en las que la proporción molar del total de fosfolípidos con PEG2000-DSPE en su composición varía entre 0,05:1 y 0,25:1. Se prefieren especialmente los liposomas en los que la proporción DSPC:colesterol:PEG2000-DSPE es 0,62:0,33:0,05, por haber comprobado los presentes inventores su utilidad para proporcionar neuroimágenes del cerebro en los Ejemplos que se muestran más adelante en la presente invención. En cuanto a la maleimida, se prefiere que la maleimida-PEG2000-DSPE esté en una proporción 2,5% molar respecto al total de fosfolípidos con PEG2000-DSPE.

En cuanto al tamaño, el tamaño más preferido es el tamaño medio de 100 nm, pudiendo estar el diámetro comprendido en el intervalo de 45 a 450 nm, aunque con mayor preferencia en el intervalo de 90 a 140 nm.

Respecto a la posible molécula marcadora, una posibilidad es que el liposoma comprenda fosfolípidos que llevan unido un compuesto fluoróforo, con preferencia por la rodamina. Dicha rodamina puede formar parte del liposoma, por ejemplo, como 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicerol-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina Rodamina B Sulfonilo) (rodamina-PE), como sucede en liposomas utilizados en el Ejemplo 3 de la presente invención.

Los liposomas pueden igualmente comprender como parte de su estructura fosfolípidos que comprenden una sal de gadolinio. Dicha sal de gadolinio puede ser, por ejemplo, la sal del ácido dietilenetriaminopentaacético α,ω -bis(8-estearoilamido-3,6-dioxaoctilamida)gadolinio (Gd-DTPA-SADA) o bien, la sal de gadolinio del ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-dietilenetriaminopentaacético (PE-DTPA-Gd), teniéndose preferencia por esta última. Esto permitirá utilizar

los liposomas para estudios de resonancia magnética de las muestras de células que entren en contacto con ellos. Puede darse el caso de que los liposomas posean un doble marcaje, al comprender en su estructura tanto un fluoróforo como una sal de gadolinio. Estos liposomas presentarán la ventaja de ser más versátiles, pues pueden utilizarse tanto en estudios de fluorescencia como de resonancia magnética.

5 La presencia de las moléculas marcadoras citadas (bien sea un fluoróforo, una sal de gadolinio o ambas), como se ha comentado, permite una identificación muy sencilla de las células que sobreexpresen HSP70, que serán aquellas a las que se unirá el liposoma, que penetrará en las mismas, dando lugar a un aumento de la concentración de la molécula marcadora en la célula: el fluoróforo o la sal de gadolinio. La
10 detección de la señal correspondiente permitirá identificar las células que sobreexpresen HSP70 como aquellas en las que la señal obtenida corresponda a una mayor concentración en la célula de la molécula marcadora. Es por eso que la invención, en un segundo aspecto, se refiere también al uso de los liposomas de la invención para la identificación *in vitro* de células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada.

15 En el caso concreto de que los liposomas utilizados presenten un compuesto fluoróforo en su estructura, la detección de la señal de fluorescencia en el uso de la presente invención permitirá identificar las células que sobreexpresen HSP70 como aquellas en las que la señal de fluorescencia sea mayor. En el caso de que las células se pongan en contacto con los liposomas *in vitro*, tras una simple incubación de las células (de 10' a 1 hora) con los liposomas, basta con observar las muestras al microscopio de
20 fluorescencia y la simple detección de dicha señal de fluorescencia, utilizando la longitud de onda adecuada según el fluoróforo utilizado, permite identificar fácilmente las células que sobreexpresan HSP70, como las células en las que la señal de fluorescencia del fluoróforo comprendido en los liposomas es superior a la señal del resto de las células presentes en la muestra

Además de la sencillez, hay que tener en cuenta que los liposomas, tras anclarse a la superficie celular son incorporados en su mayoría en el interior del citoplasma celular por mecanismos tipo
25 endocitosis y/o fusión de membrana del liposoma con membrana celular; tras la transfección de las células con los liposomas, las partículas fluorescentes quedarían en el interior de la célula, junto con los liposomas; por tanto, puede esperarse que la sensibilidad de detección sea mayor que con las técnicas inmunohistoquímicas actuales. Es más, la inyección de liposomas en un animal vivo permitiría el marcaje del tejido *in vivo*, tejido que posteriormente podría extraerse y procesarse *ex vivo*, al contrario de lo que se
30 hace en histología convencional, donde todo el proceso es *ex vivo*. Es por ello, que tal como se utiliza en la presente solicitud, la expresión "poner en contacto las células con los liposomas" debe entenderse que abarca tanto los casos en que las células son incubadas con los liposomas *in vitro* como aquellos casos en los que el contacto se produce *in vivo*, porque los liposomas llegan a las células correspondientes mientras aún forman parte de un animal vivo al que se le han inyectado los liposomas. En este segundo
35 caso, la muestra de tejido que contenga las células a analizar, se tomará del animal una vez que hayan entrado ya en contacto con los liposomas y hayan podido incorporarlos.

Cuando los liposomas comprenden fosfolípidos que comprenden una sal de gadolinio, las células en las que HSP70 está sobreexpresado se identifican con las células que presentan los menores tiempos de relajación T1 al hacer un estudio de resonancia magnética de la muestra. Esto es así porque dichas
40 células serán las que presenten una mayor concentración de gadolinio acumulado en su interior. Como cualquiera de las dos sales de gadolinio que se proponen para los liposomas de la invención dan lugar a una disminución del tiempo de relajación de resonancia magnética, la disminución será proporcional a la concentración de gadolinio presente en las células, por lo que las células con más gadolinio serán las que presenten mayor disminución del tiempo de relajación T1: cuanto más gadolinio haya en las células,
45 mayor contraste.

Este uso de los liposomas de la invención puede realizarse tanto para cultivos de células o como para muestras de tejido, como pueda ser el tejido cerebral, donde la zona de células que sobreexpresan HSP70 se identificarían como las células que conformarían la región peri-infarto. Así, el uso de los
50 liposomas de la invención permite identificar la región peri-infarto en muestras de tejido cerebral. Dado que el tratamiento necesario para la aplicación de las muestras no afecta a futuros estudios proteómicos y a la mayor seguridad en la identificación de la zona peri-infarto, suponen una gran ventaja respecto a las metodologías actuales.

Los liposomas de la presente invención, además, tal como se muestra en el Ejemplo 2, son útiles para obtener imágenes de resonancia magnética del cerebro de animales, cuando dichos liposomas se
55 administran directamente al cerebro, permitiendo la identificación de zonas en los mismos. En el caso de los liposomas de la invención, además, el hecho de que presente anticuerpos anti-HSP70 en su superficie, como demuestran los estudios *in vitro*, da lugar a una mayor acumulación de los mismos en las zonas en las que sobreexpresa la proteína HSP70. Por tanto, dichos liposomas deberían acumularse en mayor medida en la zona peri-infarto. Así, el uso de los liposomas de la invención que contienen sales de
60 gadolinio en su composición debería posibilitar la obtención de neuroimágenes en las que pudiera

identificarse la región peri-infarto, por darse en la misma mayor acumulación de proteína HSP70. Esa determinación de la zona peri-infarto podría ser de utilidad para decidir los tratamientos más adecuados para suministrar a un individuo que ha sufrido un infarto cerebral, facilitando la decisión de si conviene o no administrarle un tratamiento trombolítico. Como, además, es conocido que los liposomas con estructuras similares a los liposomas de la presente invención son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, incluso cuando llevan acoplados anticuerpos, los liposomas de la invención no deberían necesitar la administración directa al Sistema Nervioso Central para poder obtener imágenes de los mismos, sino que deben poder atravesar la barrera hematoencefálica cuando se administran por una vía más sencilla de utilizar y menos traumática para el paciente, como es la vía sistémica (por vía intravenosa, por ejemplo). Por todo ello, los liposomas de la invención son especialmente interesantes para la determinación de la zona peri-infarto presente en un individuo a partir de neuroimágenes de resonancia magnética tomadas del mismo. A partir de dichas neuroimágenes podría determinarse la extensión de la zona peri-infarto. Esta determinación, una vez hecha, podría servir para decidir la administración o no tratamientos trombolíticos según la extensión de la misma.

Así, un aspecto más de la invención sería un método para la determinación de la región peri-infarto de un individuo a partir de neuroimágenes de resonancia magnética tomadas del mismo que comprende las siguientes etapas:

- a) suministrar al individuo una composición que comprende liposomas de la invención marcados con una sal de gadolinio;
- b) obtener imágenes de resonancia magnética del cerebro del individuo;
- c) identificar como región peri-infarto la región de las neuroimágenes que corresponda a los tiempos de relajación más bajos.

En una realización preferida de la invención, la composición de los liposomas se administraría por vía sistémica.

La invención se explicará ahora con mayor detalle por medio de las Figuras y los Ejemplos que se presentan a continuación

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: Esquema representativo de las regiones de cerebro seleccionadas para el análisis proteómico: región peri-infarto y región contralateral.

Fig. 2: Fragmentos de gel de electroforesis en dos dimensiones de las proteínas de la fracción insoluble de las muestras de cerebro del modelo de infarto cerebral, correspondientes a las regiones peri-infarto (columna izquierda) y contralateral (columna derecha).

Fig. 3: Representación gráfica de la expresión proteica entre las regiones contralateral (0) y peri-infarto (1) del spot diferencial S3716.

Fig. 4: Espectro de masas del spot S3716

Fig. 5: Imagen de microscopio electrónico de transmisión (imagen crio-TEM) de liposomas base para los liposomas de la invención

Fig. 6: Distribución de tamaños de los liposomas determinada por técnicas de dispersión de luz láser dinámicas (DLS).

Fig. 7: Resultados observados en los ensayos realizados con liposomas con gadolinio. Panel A: Variación de la relatividad de las disoluciones de liposomas de diferente composición (diferente cantidad de lípidos de Gd incorporados en las membranas), en función de la concentración total de gadolinio. Panel B: mapas T1 y R1 de un cerebro de rata (*in vivo*) obtenidas a partir de imágenes de diferentes pesos T1. Las letras indican el sitio de inyección de las cuatro formulaciones preparadas.

Fig. 8: Representación esquemática de la actuación de liposomas vectorizados. A, Liposomas vectorizados frente a células que no sobreexpresan la proteína diana. B, cuando los liposoma expresan la proteína diana, los liposomas se anclan y son incorporados en la célula. C, liposomas sin vectorizar, frente a células que sobreexpresan la diana. D, células sin liposomas en el medio.

Fig. 9: Imágenes obtenidas en un microscopio de fluorescencia en las que se muestra la señal obtenida a los 30 minutos (columna de la izquierda) o tras 1 hora (columna de la derecha) de incubación de astrocitos con liposomas, en distintas condiciones, en las que HSP70(+) indica inducción previa de la expresión de la proteína HSP70 y HSP70 (-) indica ausencia de dicha inducción. Panel A: astrocitos

HSP70(+) transfectados con liposomas con anticuerpos anti-HSP70. Panel B: astrocitos HSP70(+) transfectados con liposomas sin anticuerpo anti-HSP70. Panel C: astrocitos HSP70(-) transfectados con liposomas con anticuerpo anti-HSP70. Panel D: astrocitos HSP70(-) transfectados con liposomas sin anticuerpo anti-HSP70.

5 Fig. 10: Resultados de los estudios de resonancia magnética llevados a cabo con los astrocitos de la Fig. 9, se muestra también un grupo control.. Panel A: imágenes de resonancia magnética obtenida con cada uno de los cultivos. Panel B: valores del tiempo de relajación T1, expresados en segundos, observados en cada grupo de células.

10 Fig. 11: Resultados de los estudios de resonancia magnética llevados a cabo con células endoteliales en las que se indujo (HSP70(+)) o no (HSP70(-)) la expresión de la proteína de choque térmico HSP70, mientras que "anti-HSP70" indica que los liposomas utilizados llevaban acoplado un anticuerpo dirigido contra la proteína HSP70. Panel A: imágenes de resonancia magnética obtenida con cada uno de los cultivos. Panel B: valores del tiempo de relajación T1, expresados en segundos, observados en cada grupo de células

15 EJEMPLOS

- Ejemplo 1: Identificación de marcadores proteicos de la región peri-infarto

20 El proyecto de síntesis de nanopartículas vectorizadas hacia la región peri-infarto partió de la identificación de un marcador de dicha región en un modelo de isquemia cerebral en rata. El modelo de infarto cerebral (isquemia cerebral) utilizado fue el llamado pMCAO: oclusión permanente de la arteria cerebral media en rata.

1.1. Generación del modelo de infarto

25 En el presente proyecto se incluyeron 6 ratas Sprague-Dawley de aproximadamente 250 gramos de peso. Los animales sometieron a la oclusión permanente de la arteria cerebral media. Brevemente, a los animales se les indujo anestesia mediante isoflurano al 5% y fueron operados manteniendo la anestesia al 2% en O₂:N₂O/30:70. En primer lugar se realizó una incisión ventralmente en el cuello, de unos 3cm de longitud, por encima del esternón. Tras retirar el músculo omioide se disecó la arteria carótida común izquierda para, a continuación, ligarla mediante una doble sutura de 4/0.

30 Tras cerrar la incisión se colocó al animal sobre su costado derecho para realizar un corte desde el extremo de la oreja izquierda hasta la comisura del ojo, dejando expuesto el músculo temporal que se retrajo para exponer el hueso. Tras realizar un trépano en el mismo mediante un torno de microcirugía se retiraron las meninges y se aisló la arteria cerebral media (MCA). Con un gancho situado en un micromanipulador se levantó ligeramente la arteria separándola del parénquima cerebral. Se rellenó la incisión con suero salino hasta cubrir el gancho, y mediante un electrocoagulador bipolar, se coaguló la MCA siempre en el mismo punto.

35 Terminado el proceso se suturó la incisión y se aplicó Betadine y lidocaína como analgésico tópico. Transcurridas 48 horas de la oclusión, los animales fueron sacrificados introduciéndolos en una cabina de anestesia con isoflurano al 5%, y se les extrajo el cerebro. Al cerebro se le aplicó un tampón fosfato frío para limpiarlo y enfriarlo y se cortó en láminas de 2 mm de grosor.

1.2. Tinción de las muestras de cerebro y selección de la zona peri-infarto

40 La visualización del infarto se hizo por tinción con sales de tetrazolio (TTC: cloruro de tetrazolio). Para ello, las láminas de cerebro se introdujeron en pocillos de una placa de cultivo que contenía TTC y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. El TTC es una sal que se intercala en la cadena de transporte electrónico en las mitocondrias de las células vivas, donde queda fijado, tomando un color rojo; la zona de infarto, compuesta principalmente por células muertas, no se tiñe y adquiere un color blanco.

45 Las láminas teñidas se observaron al microscopio colocando una regla cerca de las mismas, realizando fotos de cada corte. A cada lámina se le dio la vuelta con ayuda de dos espátulas y se fotografiaron de nuevo los cortes.

50 La medición del volumen de infarto se realizó mediante el software Image J, dibujando en cada imagen, mediante la herramienta StraightLine, una línea que abarcaba 5 mm. Mediante la herramienta Polygon se dibujó el contorno del infarto, midiendo luego su área mediante la función Measure. Una vez realizado el proceso en todos los cortes, se copiaron los datos en una hoja de Excel y se sumaron las áreas para obtener el volumen de infarto.

La selección de la región de peri-infarto se realizó sobre las muestras teñidas con TTC asumiendo que dicha región comprende una línea de 2 mm de tejido sano adyacente al tejido infartado. Por su parte, la región contralateral se seleccionó considerando que incluye una línea de 2 mm de tejido sano contralateral exactamente simétrico a la región periinfarto. En la Fig. 1 puede verse un esquema de las regiones seleccionadas.

Para recoger las muestras seleccionadas, se extrajo la zona de infarto y se recortó una franja de 2 mm de grosor alrededor del infarto (peri-infarto). A continuación se retiró de lado contrario del cerebro, el lado contralateral, un fragmento simétrico al del infarto, que se desechó, y un fragmento simétrico al peri-infarto, que se conservó como tejido contralateral.

1.3. Subfraccionamiento de la muestra

El objetivo fundamental buscado en los ensayos descritos en este Ejemplo 1 era la identificación de un marcador de la zona peri-infarto, pero se consideró que sería de gran utilidad que el marcador fuese una proteína de membrana, por lo que se llevó a cabo una estrategia de subfraccionamiento consistente en separar las proteínas en tres fracciones: fracción de membrana, fracción soluble y fracción insoluble. De estas, la que mejores resultado dio fue el de la fracción insoluble (liposoluble).

Para realizar el subfraccionamiento, se prepararon tubos eppendorf con 2 ml de tampón de extracción I del kit comercial ProteoExtract Native Membrane protein extraction kit (Calbiochem) frío (4°C) y 10 µl de inhibidores de proteasas a temperatura ambiente y se inició el subfraccionamiento. Se homogenizó el tejido con nitrógeno líquido y mortero, evitando que el tejido se descongelara. Se cogió el homogenizado con una espátula previamente enfriada y se echó en el tubo con tampón de extracción I. Se incubó en agitación a 4°C durante 10 minutos. Transcurridos éstos, se centrifugó a 16000 xg durante 15' a 4°C. Se separó el sobrenadante a un tubo con el rótulo: "soluble" que se congeló, y se redisolvió el pellet con 1 ml de tampón de extracción II frío del mismo kit comercial de extracción de proteínas (4°C) y 5 µl de inhibidores de proteasas. Se incubó durante 30' en agitación a 4°C. Se centrifugó a 16000 xg durante 15' a 4°C. Se separó el sobrenadante a un tubo con el rótulo: "membrana". Se congeló el sobrenadante y el pellet (que constituyó la fracción insoluble).

Se descongelaron las muestras de membrana y solubles y se concentraron en tubos centricon (millipore) mediante centrifugación de 45' a 14000 xg, hasta que el volumen de cada tubo fue de 500 µl o inferior. A continuación se añadieron 1,5 ml de acetona fría, se incubó 2 horas a -20°C y se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 45'. Se desechó el sobrenadante (acetona) y se redisolvió el pellet en 100 µl de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, 4% CHAPS, 3% DTT) agitando durante 1 hora a 29°C. A continuación se calculó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford modificado (10 µl de cada patrón o muestra desconocida, con 10 µl de HCl 0,1 N y 200 µl de reactivo de Bradford).

En el caso de la fracción insoluble, una vez descongelada se añadió 1 ml de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, 4% CHAPS, 3% DTT) y se redisolvió el pellet agitando durante 3 horas a 29°C. A continuación se centrifugó 30' a 14.000 rpm y se extrajo el sobrenadante (al desechando el pellet se desechan restos celulares). Se realizó la concentración en tubos centricon (millipore) mediante centrifugación de 45' a 14000 xg, hasta que el volumen de cada tubo fue de 500 µl o inferior. A continuación se añadieron 1,5 ml de acetona fría, se incubó 2 horas a -20°C y se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 45'. Se desechó el sobrenadante (acetona) y se redisolvió el pellet en 100 µl de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, 4% CHAPS, 3% DTT) agitando durante 1 hora a 29°C. A continuación se calculó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford modificado (10 µl de cada patrón o muestra desconocida, con 10 µl de HCl 0,1 N y 200 µl de reactivo de Bradford).

1.4. Electroforesis bidimensional

A continuación se describe el proceso de electroforesis bidimensional llevado a cabo tanto con la fracción insoluble como con la fracción soluble.

Para cada rata se realizaron 2 geles de la región contralateral y 2 geles de la región peri-infarto.

- Primera dimensión: En cada gel se cargaron 40 µg de proteína en tampón de lisis (tras calcular el volumen a cargar a partir de los resultados obtenidos del método de Bradford) y se le añade el tampón de rehidratación (7M de urea, 2M de tiourea, 4% CHAPS, 0,3% DTT, 0,5% biolitos) hasta 330 µl. En cada una de las calles del soporte de la primera dimensión se cargaron 300 µl. A continuación se sacaron dos tiras IPG (de pH 3-10 y 17 cm) (Bio-Rad) del congelador de -20°C, se les extrajo el plástico protector y se colocaron con el gel hacia abajo, sobre el tampón de rehidratación. Posteriormente se añadieron 2 ml de aceite mineral encima de cada tira, para evitar la desecación. La placa se colocó en la PROTEAN IEF CELL (Bio Rad), se seleccionó PRESET METHOD, haciendo una rehidratación activa a 50 V durante 12 horas, y aplicando a continuación un voltaje de 500 V durante 15' para después aplicar un

voltaje de 10.000 V hasta alcanzar 30.000 Vh. El último paso fue de 10.000 V hasta alcanzar un voltaje de 27.000 V. De esta forma el voltaje acumulado fue de 57.000 Vh.

5 - Equilibrado: Una vez finalizada la primera dimensión las tiras pueden congelarse a -20°C o bien equilibrarse. El equilibrado es un proceso por el que las proteínas se cargan negativamente. De esta forma se garantiza que la separación en la segunda dimensión se llevará a cabo por peso molecular y no por carga. Para realizar el equilibrado se colocan las tiras de IPG con el gel hacia arriba en las bandejas de equilibrado y se le añaden 7 ml de solución de equilibrado con DTT (Tris 50 mM, 6M de urea, 30% glicerol, 2%SDS, 10 mg/ml DTT), incubando a temperatura ambiente durante 15'. A continuación se dejan escurrir un poco las tiras y se añade solución de equilibrado con yodoacetamida (Tris 50 mM, 6M de urea, 30% glicerol, 2% SDS, 25 mg/ml yodoacetamida), incubando otros 15' a temperatura ambiente.

15 - Segunda dimensión: Una vez equilibradas las tiras se puede cargar la segunda dimensión o bien se pueden congelar las tiras a -20°C. Para llevar a cabo la segunda dimensión, el día anterior se deben dejar los geles de 2ªDimensión hechos Dependiendo del número de geles que se quiso correr se utilizó la Protean XII de Bio Rad (2 geles) o la ETTAN-SIX de GE (6 geles). Los geles se prepararon siguiendo las siguientes recetas:

	Protean XII	ETTAN-6
Acrilamida	50 ml	250 ml
Tris Stock (1,5 M)	30 ml	150 ml
SDS (20%)	600 µl	3 ml
20 H ₂ O destilada	38,7 ml	193,5 ml
APS (10%)	600 µl	3 ml
TEMED	40 µl	200 µl

25 Para cargar la segunda dimensión, se colocó la tira de IPG pegada al cristal grande, sobre el gel de acrilamida al 12,5 %, se selló la tira con solución de sellado (0,5% de agarosa en electrolito 1X con trazas de bromofenol), a continuación se colocaron los cristales en la carcasa de la segunda dimensión, se añadió el electrolito 1X (50mM Tris, 384 mM glicina, 0,2% SDS) en el reservorio inferior hasta la marca y a continuación se añadieron (al mismo tiempo) electrolito 1X en el reservorio inferior y electrolito 2X al reservorio superior hasta que los dos niveles quedaron a la misma altura y entre los niveles máximo y mínimo. Se conectó entonces la fuente de refrigeración a 25 °C y se conectó la fuente de alimentación. Se aplicó un programa para mantener el trabajo constante 5 W/gel durante 15' y a continuación a 15 W/gel el tiempo necesario para que el frente de bromofenol alcanzara el final del gel. Cuando el frente llegó al final del gel, se paró la electroforesis y se tiñó el gel.

35 - Tinción: Los geles se tiñeron con FLAMINGO FLUORESENT STAIN (Bio Rad), con excepción de los geles preparativos que se tiñeron con azul de Coomassie. La tinción con FLAMINGO se inició con un paso de fijación de 2 horas en una solución 40% etanol, 10% acético, a continuación se añadieron 500 ml de FLAMINGO por cada gel y se dejó durante 3 horas en agitación. Finalmente se hizo un paso de lavado con agua y se escaneó en un escaner FX (BioRad) a través del programa PDQuest. La tinción con azul de Coomassie se llevó a cabo en los geles preparativos y se hizo mediante inmersión de los geles durante 3 horas en una solución (0,1% CBB, 40% etanol, 10% acético). De esta forma el gel quedó completamente azul y, a continuación, se destiñó haciendo múltiples pases con solución de destinción (etanol 30%, acético 10%), hasta que el gel quedó totalmente transparente.

40 - Conservación de los geles: Los geles se conservaron envasados al vacío a 4°C y en oscuridad, especialmente los teñidos con fluorescencia.

45 - Análisis de los geles 2-D de la fracción insoluble: El análisis de los geles, tanto de los correspondientes a la fracción insoluble, como los correspondientes a la fracción soluble, se llevó a cabo a través del programa PDQuest. En los geles de la fracción insoluble se encontró una media de 1632 "spots" (manchas), mientras que en los de la fracción soluble se encontró una media de 814 spots. Cada spot corresponde a una proteína o fracción de proteína.

1.5. Comparación cuantitativa y espectrometría de masas

50 La comparación cualitativa de los geles correspondientes a la región contralateral y a la zona peri-infarto no reveló la presencia de ninguna diferencia en la expresión de proteínas insolubles. Sin embargo, el análisis cuantitativo/estadístico demostró la existencia de 9 spots cuya expresión era

significativamente diferente en las regiones periinfarto y contralateral (Fig. 2) siendo, como poco al menos 3 veces mayor en la región de periinfarto. La Tabla 1 muestra las diferencias de 4 de esos 9 spots.

Tabla 1.- Diferencias en los spots de las regiones contralateral y peri-infarto

SPOT	CONTRALATERAL	PERI-INFARTO
S2516	77,7±46,2	341,8±98,7
S3703	325,6±301,6	1334,3±604,2
S3708	106,1±67,7	572,7±379,1
S3716	95,1±27,3	369,8±232,1

5 La Fig. 3 muestra la diferencia de expresión del spot S3716.

Para terminar el análisis proteómico se llevó a cabo la identificación de los spots diferenciales mediante espectrometría de masas. La Fig. 4 muestra el espectro de masas del spot S3716 y la correspondiente identificación, que en este caso correspondió a una proteína de choque térmico, la "*heat shock protein*" de 70 kDa 1A/1B (HSP70).

10 Dada la importancia de las proteínas de choque térmico en la respuesta a la agresión celular, se decidió continuar el estudio con esta proteína.

- Ejemplo 2: Síntesis de liposomas

15 Los liposomas utilizados en la presente invención tienen como base el fosfolípido 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfolcolina (DSPC) y colesterol, en proporciones que varían de 2,5:1 a 1,5:1. A éstos se les añade una proporción de 0,05:1 a 0,25:1 de 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfetranolamina-N-[Metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE) con la finalidad de que las cadenas de PEG enmascaren los liposomas a la respuesta inmune de los organismos *in vivo* y así facilitar largos tiempos de permanencia en el torrente sanguíneo *in vivo*.

2.1. Preparación de los liposomas base

20 Para preparar los liposomas se usó el método de rehidratación de película en la que los componentes se mezclan en estado sólido en las proporciones adecuadas y acto seguido se disuelven en una mezcla cloroformo/metanol de 1:1 a 1,5:1 (v:v). La disolución se evaporó hasta sequedad en un rotavapor a 313 K. Una vez que los disolventes orgánicos se han evaporado y se ha formado una película en el fondo del balón del rotavapor, se redisolvió la mezcla en HBS (HEPES Buffer Solution 20 mM, NaCl 135 mM, pH 7.4, Sigma-Aldrich). Para definir el tamaño de los liposomas (~100 nm de forma habitual), la suspensión resultante se pasó de 4 a 6 veces por un extrusor con filtros de membrana de policarbonato de 200 nm de poro y después se pasó de 8 a 14 veces por filtros de 100 nm de poro de membrana. Todo el proceso de extrusión se llevó a cabo a 333 K. De esta manera se obtuvo una disolución en HBS de liposomas esféricos de tamaño en torno a 100 nm, tal y como puede observarse en la Fig. 5, obtenida con un microscopio electrónico de transmisión, y en la Fig. 6, una gráfica con la distribución de tamaños de los liposomas, en la que se ve que el diámetro de los mismos oscila entre 45y 450 nm, siendo 100 nm el tamaño medio.

2.2. Liposomas con sondas de imagen molecular

35 El siguiente paso consistió en la síntesis de sondas de contraste bimodales para imagen molecular. Para ello, se tomó como base los liposomas base mencionados con anterioridad y durante la fase de preparación se les añadió (Rodamine-PE). Estos fosfolípidos con rodamina entran a formar parte de la membrana de los mismos, lo que confiere al conjunto de liposomas la capacidad de fluorescencia.

40 La otra posibilidad es que las sondas moleculares permitan la detección de los liposomas mediante resonancia magnética. Para ello, se puede partir bien de los liposomas base o bien de los liposomas que ya llevan incluido el compuesto fluorescente, y se les incorporó un agente de contraste de resonancia magnética, concretamente basado en gadolinio: la sal del ácido dietilenetriaminopentaacético α,ω -bis(8-estearoilamido-3,6-dioxaoctilamide)gadolinio (Gd-DTPA-SADA) o bien, preferiblemente, la sal de gadolinio del ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-dietilenti amino pentaacético (PE-DTPA-Gd). Cualquiera de estos dos lípidos complejados con Gd se incorporan en la mezcla de preparado de liposomas, y se incorporan en su membrana, confiriendo a todo el conjunto del liposoma la capacidad

de reducir los tiempos de relajación longitudinal (T1, también llamado spin-lattice) en resonancia magnética.

Para comprobar que realmente estos liposomas servían para obtener imágenes de tejido cerebral, se realizaron experimentos *in vivo* con ratas sometidas a oclusión de la arteria cerebral media tal como se ha explicado previamente. Las imágenes de resonancia magnética se tomaron a 9,4 T utilizando un Bruker Biospec. Los mapas T1 y T2 se construyeron a partir de juegos de imágenes con 16 ecos (TE=6-9 ms) y 5 ó 10 valores de TR (que oscilaba entre 0,1-15 s). Los mapas de tiempos de relajación se calcularon ajustando las imágenes píxel a píxel (modelo exponencial simple para T2 y modelo de saturación-recuperación para T1) utilizando Image-J. Las soluciones de concentración variable de liposomas se prepararon utilizando el método de dilución-extracción descrito por Jover *et al.* (1990), refiriéndolas a la concentración total de gadolinio en las soluciones (recta calibrado usando dicho método con $[Gd]_0=120$ microMolar, $V=1$ ml ; $v=0.2$ ml ; factor $V_f=0.8$, $n=13$ diluciones, usando HBS como disolvente, usado también usado como vehículo para administración *in vivo*). Una vez inyectados en tejido cerebral, en imágenes de RM se observa perfectamente la presencia de los liposomas en mapas de tiempos de relajación o de relaxividad (Fig. 7, donde se indican los sitios de inyección de las cuatro formulaciones preparadas, puntos A y B $[Gd]=70$ microMolar, puntos C y D $[Gd]=20$ microMolar), así como en imágenes con peso T1 en RM (no mostradas), lo que permite su localización *in vivo*. A mayor concentración de liposomas en el tejido, mayor contraste. Como se ve en la Fig. 7, concentraciones crecientes de liposomas dopados con complejos de gadolinio, producen una disminución de los tiempos de relajación T1 o lo que es lo mismo un crecimiento lineal de la relaxividad, que es la inversa del tiempo de relajación ($R1 = 1/T1$). Los estudios realizados indican que la concentración mínima de gadolinio necesaria en el parénquima cerebral para obtener una señal fue de 70 nM ($[liposomas]=2,8$ picomolar).

De esta manera, estos liposomas pueden ser utilizados para ser administrados a individuos vivos y, dado que atraviesan la barrera hematoencefálica, pueden ser utilizados para obtener imágenes de resonancia magnética de los cerebros de los mismos. Esto es así porque, si bien el gadolinio libre no puede administrarse a seres humanos, el gadolinio quelado no supone riesgos, por lo que su administración es permisible, y de hecho, es uno de los agentes de contraste habituales utilizados en estudios de resonancia magnética en la práctica clínica.

Si la obtención de los liposomas cargados con gadolinio se realiza a partir de liposomas ya marcados con rodamina, se obtienen liposomas con una doble funcionalidad, que pueden ser detectados mediante estudios de fluorescencia (que serán especialmente indicados para estudios *ex vivo*, donde dicha fluorescencia sea fácil de detectar) y en estudios *in vivo*, tras suministrar los liposomas a un individuo, detectando su presencia y localización mediante resonancia magnética.

2.3. Liposomas vectorizados

Como paso siguiente, se procedió a anclar en la superficie de los liposomas proteínas, que sirven como vectores en procesos de reconocimiento molecular con diferentes dianas en células o tejidos *in vivo*. El concepto se esquematiza en la Fig. 8, tomada de Mulder *et al.* (Mulder *et al.*, 2004). Lo más significativo es que, cuando las células expresan la proteína diana, los liposomas se anclan y son incorporados en la célula.

En este caso, como lo que se desea es dirigir los liposomas preferentemente a la zona peri-infarto, en la que se sobreexpresa la proteína HSP70, la proteína anclada fue un anticuerpo anti-HSP70, concretamente el (HSP Antibody Rabbit Polyclonal, de Abbiotec).

Para la funcionalización de liposomas con dicha proteína se siguió el siguiente procedimiento:

a) Preparación de liposomas conjugados a proteínas:

- Preparar los liposomas tal como se describió en los apartados 2.1 y 2.2, pero reemplazando 2,5% en moles del PEG-lípido (PEG2000-DSPE) con Maleimida-PEG-lípido.
- Utilizar el siguiente tampon para hidratar los liposomas:
 - o HEPES: 2,38 g/l
 - o NaCl: 8,0 g/l
 - o pH: 6,7

b) Modificación de los grupos NH_2 libres de la proteína (el anticuerpo con SATA: N-succinimidil-S-acetilthioacetatO), para unirla al grupo maleimida:

- Preparar el siguiente tampón:
 - o HEPES: 2,38 g/l
 - o NaCl: 8,0 g/l
 - o EDTA: 0,37 g/l
 - 5 o pH: 7,0
- Disolver el anticuerpo en este tampón
- Preparar una solución nueva con 3 mg de SATA por cada 125 µl de DMF, comenzando con al menos 5 mg de SATA.
- 10 – Añadir la solución de SATA/DMF la solución de proteína/tampón ~1:100, v:v y SATA:proteína ~1:10, peso:peso.
- Colocar en un agitador rotatorio de mesa durante 45 minutos
- Preparar un Vivaspin™ 50.000 (Sartorius Stedim Biotech) empapándolo una vez en 1 ml de tampón (3000g, 5 min)
- Utilizar el siguiente tampón para empapar el Vivaspin y lavar la solución de proteínas:
 - 15 o HEPES: 2,38 g/l
 - o NaCl: 8,0 g/l
 - o pH: 7,4
- Poner la solución de proteínas en el Vivaspin y centrifugar a 3000 g durante 10 min.
- Lavar 2 veces con 1 ml de tampón a 3000g durante 10 min.
- 20 – Utilizar 200 µl de tampón para resuspender la proteína y pipetear en un tubo Eppendorf.
- Utilizar otros 200 µl para lavar el Vivaspin y pipetear en el mismo tubo Eppendorf.
- Este procedimiento da lugar a aproximadamente 0,5 ml de solución de anticuerpo modificado con SATA que se puede almacenar en la nevera.
- c) Desacetilación de los grupos SATA.
- 25 – Preparar una solución nueva de:
 - o Hidroxilamina: 34,8 g/l
 - o HEPES: 119 g/l
 - o EDTA: 9,4 g/l
 - 30 o pH: 7,0 (preparar por ejemplo 20 ml y añadir algunas lentejas de NaOH)
- Añadir esta solución de hidroxilamina a la solución de proteínas 1:10, v:v. (p. ej., 50 µl de solución de hidroxilamina por cada 500 µl de solución de proteínas)
- Colocarlo en el agitador rotatorio de sobremesa
- d) Conjugación de la proteína a los liposomas de Maleimida y PEG
- 35 – Añadir la solución de proteínas a la suspensión de liposomas y agitarla en un vórtex.
- Colocar N₂ sobre ella y dejarlo durante toda la noche en la nevera.
- e) Lavado tras conjugación

– La suspensión de liposomas se puede lavar dos veces por medio de ultracentrifugación a 55000-65000 rpm durante 45 minutos.

– Después de lavar, la concentración de lípidos deseada se puede obtener resuspendiendo el pellet lipídico en una cantidad específica de tampón con el pH deseado.

- 5 Siguiendo este procedimiento, se sintetizaron liposomas que en las cadenas PEG con terminación en maleimida, presentaban unido covalentemente un anticuerpo anti-HSP70, y que estaban marcados con gadolinio y rodamina.

- Ejemplo 3: Estudio de la funcionalidad de los liposomas vectorizados con anti-HSP70

3.1. Estudios de transfección de astrocitos

- 10 Es conocido que cultivos de astrocitos primarios de rata sobre-expresan cantidades importantes de proteína HSP70 cuando son sometidos a un choque térmico (Freitas *et al.*, 2002). De acuerdo con la bibliografía, se prepararon dos placas de astrocitos de rata hasta que alcanzaron un 70-80% de confluencia. Una de las placas se sometió a un choque térmico, colocándola durante 30 minutos en un incubador a 42°C. La segunda placa (control) se mantuvo en condiciones normales de cultivo (incubador a 37°C).
- 15 Tras el periodo de estrés, la primera placa se devolvió al incubador original (37°C) y ambas placas se mantuvieron en él durante un periodo de recuperación de 6 h. Los autores antes señalados demostraron (mediante técnicas de Western-blot e inmuno-histoquímica) que transcurridas esas 6 horas, los astrocitos de rata sobre-expresan de forma considerable la proteína HSP70. En este caso, este cultivo se usó como modelo de zona peri-infarto de cerebro, donde se sabe que hay sobre-expresión de dicha proteína por la bibliografía existente, y por los estudios de proteómica realizados con anterioridad en los laboratorios del grupo de los presentes inventores.
- 20

- Una vez transcurridas las 6 horas de recuperación al estrés, los astrocitos fueron transfectados con liposomas, añadiendo 10 µl de disolución de liposomas H02 (con maleimida, pero sin anticuerpo, control negativo) o anti-HSP70 (liposomas vectorizados con proteína anti-HSP70) por pocillo (que contenían 200 µl de medio de cultivo cada uno), logrando una concentración total de lípidos de 15 mM por pocillo (12 pocillos en total), según el siguiente esquema:
- 25

Tabla 2: Esquema de tiempos y distribución del ensayo de liposomas

Placa 1: control, astrocitos HSP70(-)			
Tiempo incubación	Pocillos		
30 min	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
30 min	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
1 h	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
1 h	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
Placa 2: choque térmico, astrocitos HSP70(+)			
Tiempo incubación	Pocillos		
30 min	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
30 min	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
1 h	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos
1 h	Lipos anti-HSP70	Lipos H02	No lipos

Así pues se obtuvieron los siguientes grupos experimentales (hasta 4 réplicas por combinación):

Tabla 3: Grupos experimentales

Astrocitos	Liposomas	
	anti-HSP70	H02
HSP70 (+)	++	-+
HSP70 (-)	+-	--

5 Transcurrido el tiempo de incubación (30 min o 1 h) se procedió al lavado de las placas de astrocitos (3 veces cada una con medio de cultivo) y se observó si había ocurrido la transfección celular con liposomas mediante un microscopio de fluorescencia (hay rodamina presente en los liposomas).

La observación de los astrocitos al microscopio permitió obtener las imágenes que se muestran en la Fig. 9

10 Una vez observados los astrocitos al microscopio, se trataron con acutasa (200 µl) para despegarlos de las placas de cultivo y se llevaron a tubos Eppendorf de 0,5 ml. Estos tubos se llevaron al equipo de imagen por RM para la caracterización de los tiempos de relajación de los mismos. Puesto que los liposomas contienen gadolinio, es de esperar que cuanta mayor cantidad de liposomas estuviera presente en las células (en ese momento ya en los tubos Eppendorf) menores serán los tiempos de relajación observados. Como control se estudiaron astrocitos a los que no se les añadieron liposomas.

15 Para la realización de estos estudios, se utilizó una secuencia RARE (factor 2) con un tiempo de eco de 12 ms y se obtuvieron imágenes con 8 tiempos de recuperación diferentes (variación exponencial entre 450 y 10000 ms), calculándose los tiempos de relajación T1 mediante una ecuación exponencial simple (modelo de inversión-recuperación). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 10:

20 Como puede observarse, el tratamiento con liposomas que presentan anticuerpos anti-HSP70 da lugar a una sensible disminución en el tiempo de relajación en los astrocitos tratados con los mismos.

3.3. Estudio de transfección de células endoteliales

25 Para confirmar los resultados obtenidos, se repitió el experimento con cultivos de células micro-endoteliales de rata. Se realizó un procedimiento experimental idéntico al anterior salvo en que la inducción de la expresión de HSP70 en estas células se realizó sometiendo a las mismas a 45°C durante 15 minutos (respetando un período de recuperación de 6 h post-choque térmico). Las células fueron transfectadas nuevamente con liposomas (10 µl de disolución de liposomas H02 o anti-HSP70 por pocillo conteniendo 200 µl de medio de cultivo cada uno, logrando una concentración total de lípidos de 15 mM por pocillo). Al ser las células endoteliales más sensibles que los astrocitos, durante su manipulación se levantaron de las placas, por lo que no fue posible observar su fluorescencia en el microscopio. No obstante, el contenido de los pocillos (suspensión de células en medio de cultivo) se traspasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron (5 min, 3000 rpm). Se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con medio. El proceso de centrifugación, retirada de sobrenadante y lavado con medio se repitió 3 veces. Los pellets de células resultantes (que han de contener gadolinio de los liposomas si ha habido transfección) en medio de cultivo, fueron analizados por RM, obteniéndose los tiempos de relajación correspondientes:

35 Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Los resultados obtenidos confirman la utilidad de los liposomas de la invención para diferenciar células que sobreexpresan HSP70 en muestras que las contienen, ya sea realizando análisis de fluorescencia o mediante resonancia magnética.

3.4. Estudio in vivo de marcaje de zona peri-infarto.

40 Para demostrar la efectividad de los liposomas anti-HSP70 sintetizados para marcaje de la zona peri-infarto *in vivo* se realiza el siguiente estudio.

a) inducción de lesión isquémica.

45 Se toman una ratas macho (250-300 g de peso) de la cepa Sprague Dawley y tras inducirle anestesia en una caja de inducción bajo atmósfera de sevoflurano al 6%, se traslada a la mesa de cirugía donde se continua con la anestesia con sevoflurano al 3% con una corriente de gas N₂O:O₂ en

proporciones 65:35 y se procede a la cirugía de inducción de isquemia cerebral usando el modelo de sutura permanente de la arteria cerebral media. En breve, en primer lugar se realiza una incisión ventralmente en el cuello, de unos 3cm de longitud, por encima del esternón. Tras retirar el músculo omioide se disea la arteria carótida común izquierda para, a continuación, ligarla mediante una doble sutura de 4/0. Tras cerrar la incisión se coloca al animal sobre su costado (derecho en este caso) para realizar un corte desde el extremo de la oreja izquierda hasta la comisura del ojo, dejando expuesto el músculo temporal que se retrae para exponer el hueso. Tras realizar un trépano en el mismo mediante un torno de microcirugía se retiraran las meninges y se aísla la arteria cerebral media (MCA). Con un gancho situado en un micromanipulador se levanta ligeramente la arteria separándola del parénquima cerebral y se sutura con una seda de 10/0 haciendo una doble lazada. A continuación se retira con cuidado el micromanipulador, dejando descansar de nuevo la MCA sobre la superficie cerebral, se vuelve a colocar el músculo temporal en su sitio, y se sutura la piel del animal, cerrando la herida.

Acabada la cirugía se traslada el animal al equipo de resonancia magnética manteniendo la anestesia gaseosa, y se realiza una Angio-RM sin contraste (técnica 2D TOF-MRA) con un campo de visión de 32x32x14 mm que cubre por completo el cerebro desde la entrada de arteria carótida hasta el vértice del círculo de Willis. De esta manera es posible observar la oclusión de la MCA. Así mismo se realiza una imagen de difusión (imagen EPI-DWI en 5 cortes coronales de 2 mm de grosor, con gradientes de difusión en la dirección Perpendicular al eje rostro-caudal del animal, y usando los valores de $b=600$ y $b=1500$ s/mm²), para observar la extensión del núcleo de la lesión isquémica (al igual que se hace en la clínica humana).

El animal se devuelve a su jaula para que se recupere de la anestesia y se le deja reposar, con agua y comida *ad libitum*, durante 48 horas.

b) Estudio de la zona peri-infarto por RM

Al animal al que se le ha inducido una lesión isquémica 48 h antes, se le induce anestesia con Sevoflurano (3% en N₂O:O₂ en proporciones 65:35) y se le coloca un catéter *Insyte Autogard* de 22 G (de la casa comercial BD) en una de las dos venas de la cola, indistintamente. Si se necesita dilatar la vena se puede colocar una banda elástica en su parte superior para comprimirla durante la inserción del catéter.

A continuación se conecta al catéter una jeringa de 1 ml que contiene 0.5 ml de disolución de liposomas anti-HSp70 (vehículo Hepes Buffer Solution, HBS, concentración 100-300 mg lípidos /kg peso animal) y se introduce al animal dentro de la resonancia magnética.

Se obtiene una serie de imágenes con diferente peso T1 (imágenes RARE, con factor 2, TE=20 ms, 14 cortes coronales de 1 mm de grosor, cubriendo todo el cerebro desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo, con una resolución en el plano de 100x100 micras, y tiempos de repetición TR=0.5, 1.5, 3, 6 y 9 segundos), a partir de las cuales se realiza un mapa de tiempos de relajación T1 y de relaxividades (1/T1) ajustando pixel a pixel las 5 imágenes de RM de TR variable a un modelo de saturación-recuperación, usando el software Image-J. Esta imagen es la imagen basal con los tiempos de relajación del tejido cerebral (sano e isquémico) antes de inyectar los liposomas. Una vez hecho esto, se inyectan los liposoma en la cola del animal y se espera a que circulen por el torrente sanguíneo. El set de imágenes con peso T1 antes mencionado se repite 1 h tras la inyección y se repite a las 6, 12 y 24 h (tras 1 h post inyección y tras cada sesión que le sigue el animal se retira de la resonancia y se devuelve a su jaula para que se recupere). De esta manera se puede seguir la entrada de liposomas marcados con gadolinio, observando que su acumulación en la zona peri-infarto hace que los tiempos de relajación T1 en dicha zona del tejido desciendan de forma significativa, lo que permite distinguirla del resto del tejido (tanto sano como núcleo de la lesión isquémica).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Freitas , T.C., et al., (2002). Brain Res. 958:359-370.

Huwyler , J. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Science 93: 14164-14169.

Jover, A., et al. (1990). J Chem Educ. 67(6):530-2

Kato, H., et al. (1995). Brain Research 679:1-7.

Kleindorfer, D., et al. (2009). Us geographic distribution of rt-PA utilization by hospital for acute ischemic stroke. Stroke 40: 3580-3584.

Lu, W. (2007) J Control Release. 12;118(1):38-53. Epub 2006 Nov 24

Mulder WJM et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15, 799-806

Saito , R., et al. (2004). Cancer Res, 64, 2572-9

Saito, R., et al. (2005). Exp Neurol. 196(2):381-389. Epub 2005 Sep 28.

Schelinger, P.D., et al. (2007). Stroke 38: 2640-2645.

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma basado en 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfocolina (DSPC), colesterol, 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfetanolamina-N-[Metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE) y maleimida-PEG2000-DSPE, caracterizado porque el liposoma presenta anticuerpos dirigidos contra la proteína de choque térmico de 70 kDa (anti-HSP70) unidos al liposoma por el grupo maleimida.
2. Liposoma según la reivindicación 1, en el que las proporciones molares entre DSPC y colesterol varían entre 2,5:1 y 1,5:1.
3. Liposoma según la reivindicación 2, en el que la proporción molar del total de fosfolípidos con PEG2000-DSPE en su composición varía entre 0,05:1 y 0,25:1.
4. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proporción DSPC:colesterol:PEG2000-DSPE es 0,62:0,33:0,05.
5. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la maleimida-PEG2000-DSPE está en una proporción 2,5% molar respecto al total de fosfolípidos con PEG2000-DSPE.
6. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuyo diámetro está en el intervalo de 45 a 450 nm.
7. Liposoma según la reivindicación 6, cuyo diámetro está en el intervalo de 90 a 140 nm.
8. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende fosfolípidos que llevan unido un compuesto fluoróforo.
9. Liposoma según la reivindicación 8, en el que el compuesto fluoróforo es rodamina.
10. Liposoma según la reivindicación 8 ó 9, que comprende 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina Rodamina B Sulfonilo) (rodamina-PE).
11. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende fosfolípidos que comprenden una sal de gadolinio.
12. Liposoma según la reivindicación 11, que comprende la sal del ácido dietilentríaminopentaacético α,ω -bis(8-estearoilamido-3,6-dioxaoctilamido)gadolinio (Gd-DTPA-SADA) o bien, la sal de gadolinio del ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-dietilentríaminopentaacético (PE-DTPA-Gd).
13. Liposoma según las reivindicaciones 10 y/o 12, que comprende 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina Rodamina B Sulfonilo) (rodamina-PE) y la sal de gadolinio del ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-dietilentríaminopentaacético (PE-DTPA-Gd).
14. Uso de los liposomas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 para la identificación in vitro de células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que los liposomas comprenden fosfolípidos que comprenden un compuesto fluoróforo y en el que las células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada se identifican con las células en las que la señal de fluorescencia del fluoróforo comprendido en los liposomas es superior a la señal del resto de las células presentes en la muestra, tras haber puesto en contacto todas las células de la muestra con los liposomas.
16. Uso según la reivindicación 14, en el que los liposomas comprenden fosfolípidos que comprenden una sal de gadolinio y las células en las que HSP70 está sobreexpresada se identifican con las células que presentan los menores tiempos de relajación tras haber puesto en contacto las células con los liposomas y al hacer un estudio de resonancia magnética de la muestra.
17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que las células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada son células presentes en una muestra de tejido cerebral.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que se identifica la región peri-infarto como la región de la muestra de tejido cerebral en la que las que la proteína HSP70 está sobreexpresada.
19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18; en el que las células se ponen en contacto con los liposomas incubando in vitro las células con los liposomas.
20. Uso según la reivindicación 19, en el que las células se incuban con los liposomas entre 10 minutos y 1 hora.

21. Uso según la reivindicación 17 ó 18, en el que las células se ponen en contacto con los liposomas inyectando los liposomas al animal en el que están presentes las células previamente a la toma de una muestra de tejido en la que están presentes dichas células, determinándose posteriormente in vitro tras haber extraído la muestra de tejido del individuo, las células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada.

5 22. Un método para la determinación de la región peri-infarto de un individuo a partir de neuroimágenes de resonancia magnética que comprende las siguientes etapas:

a) suministrar al individuo una composición que comprende liposomas de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13;

b) obtener imágenes de resonancia magnética del cerebro del individuo;

10 c) identificar como región peri-infarto la región de las neuroimágenes que corresponda a los tiempos de relajación T1 más bajos.

23. Método según la reivindicación 22, en el que la composición que comprende liposomas se administra por vía sistémica

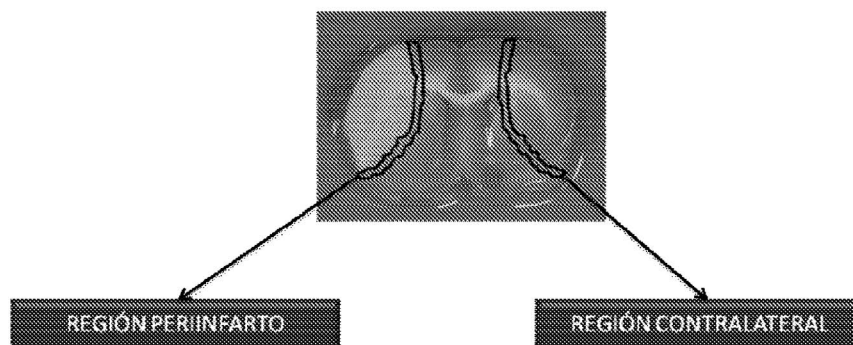


Fig. 1

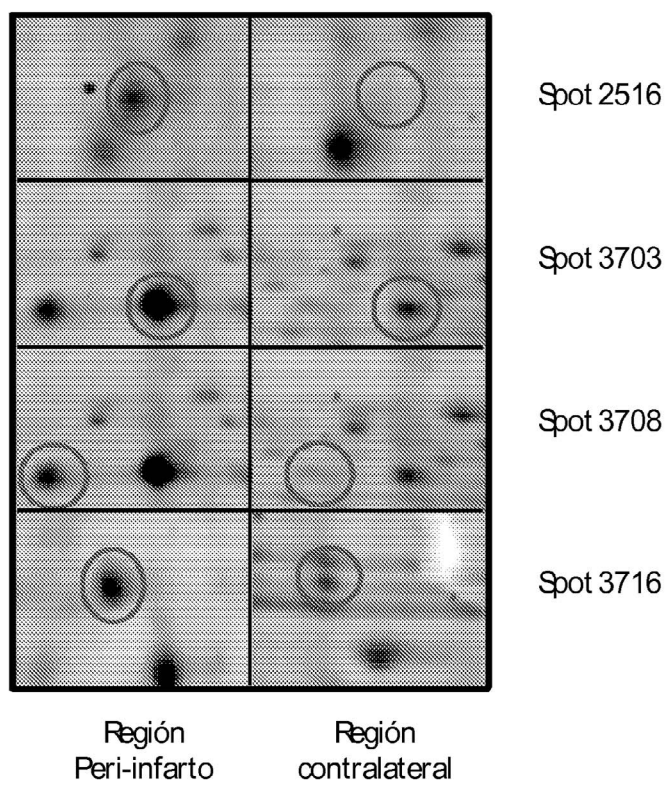


Fig. 2

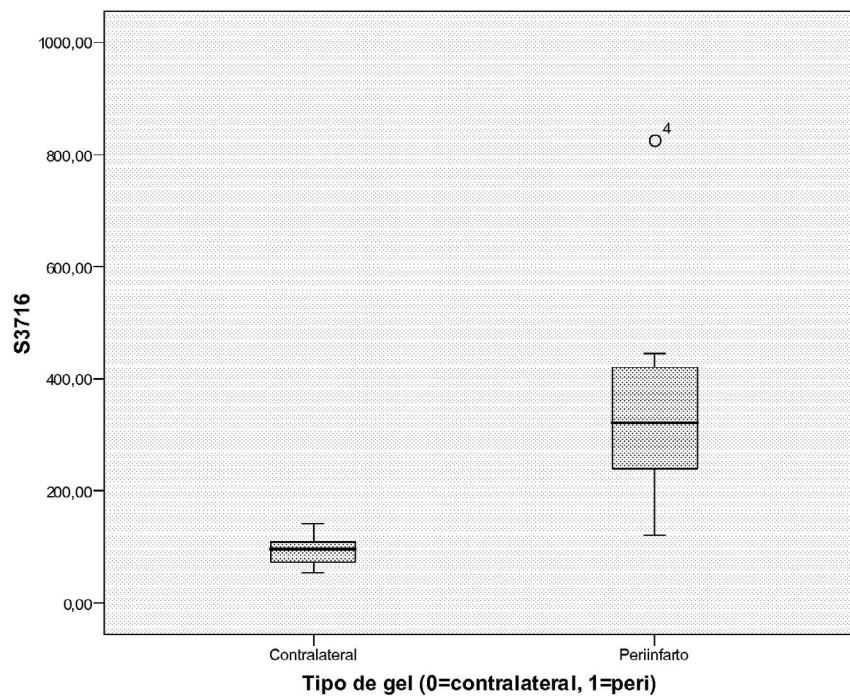


Fig. 3

Proteína de choque térmico de 70 kDa 1A/1B

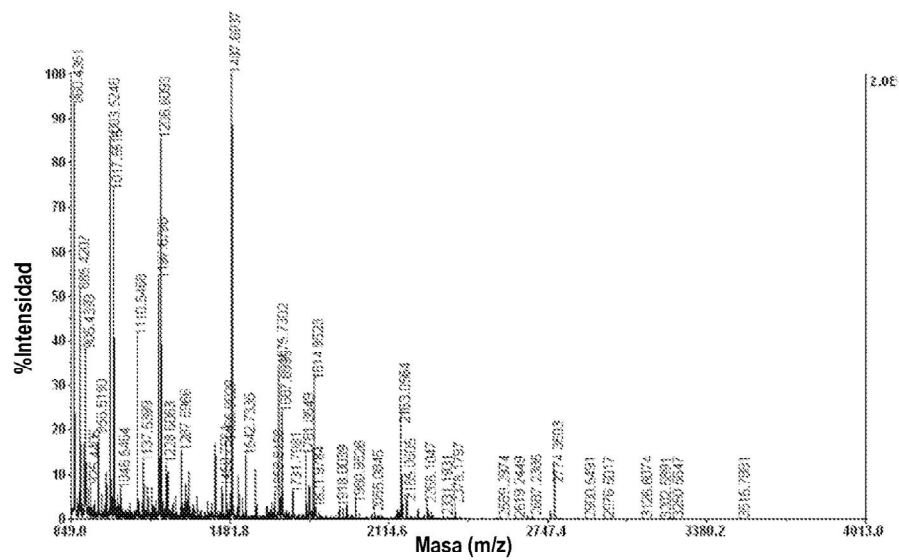


Fig. 4

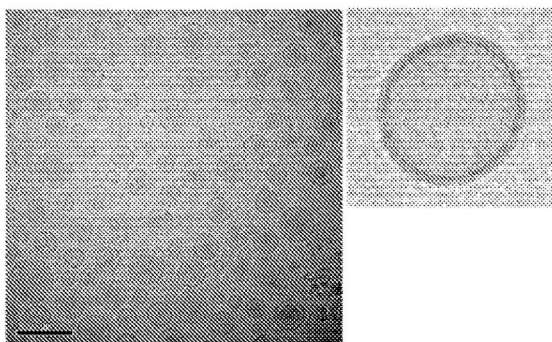


Fig. 5

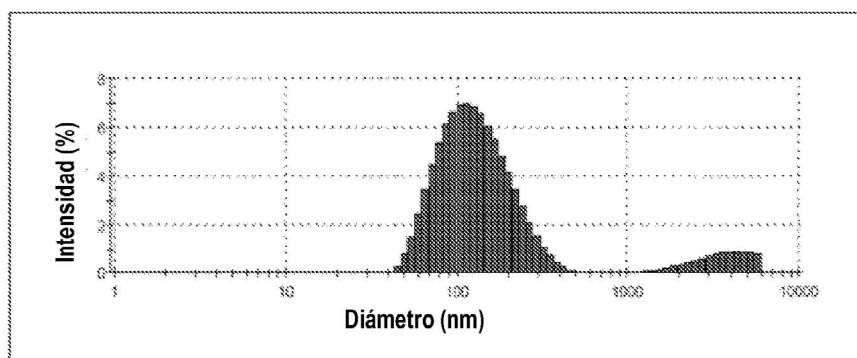
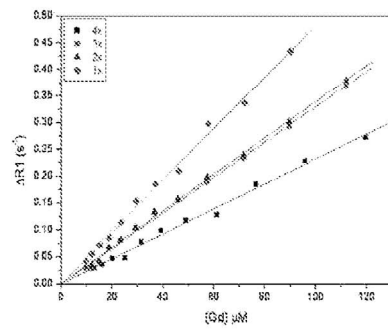


Fig. 6

A



B

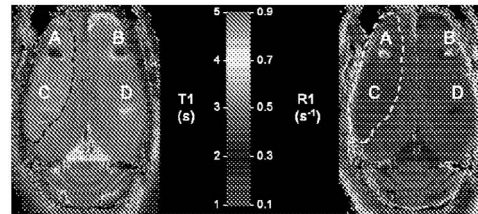


Fig. 7

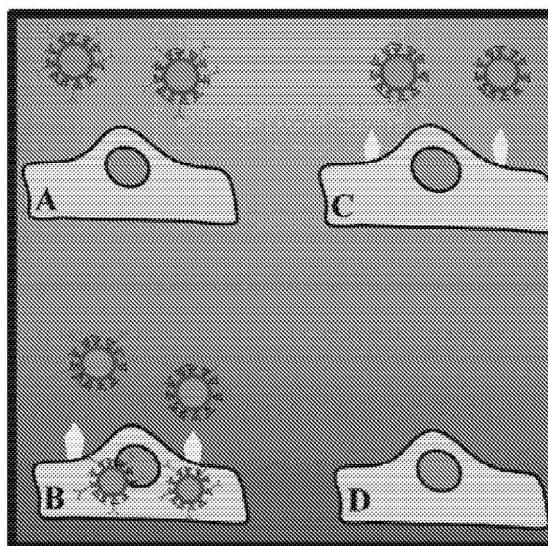


Fig. 8

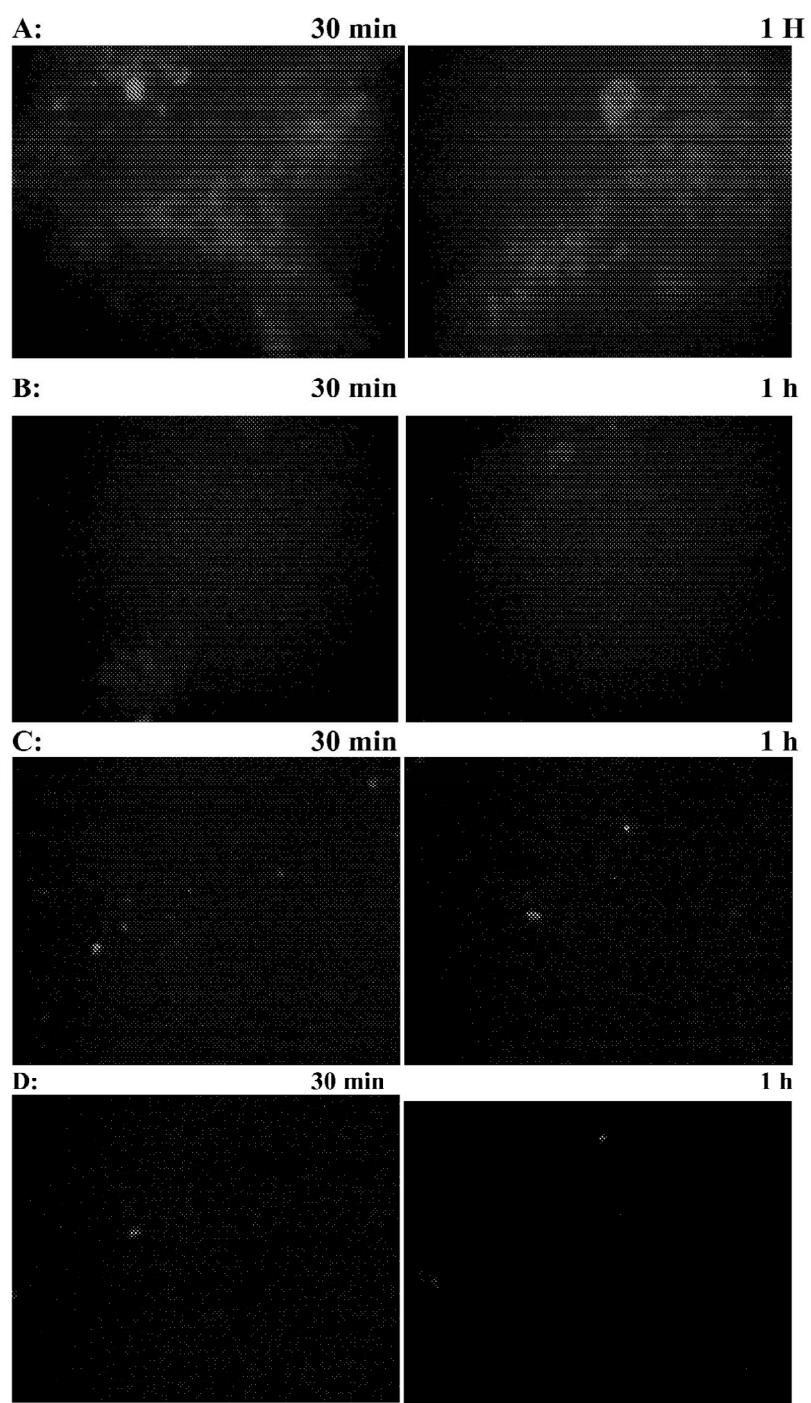


Fig. 9

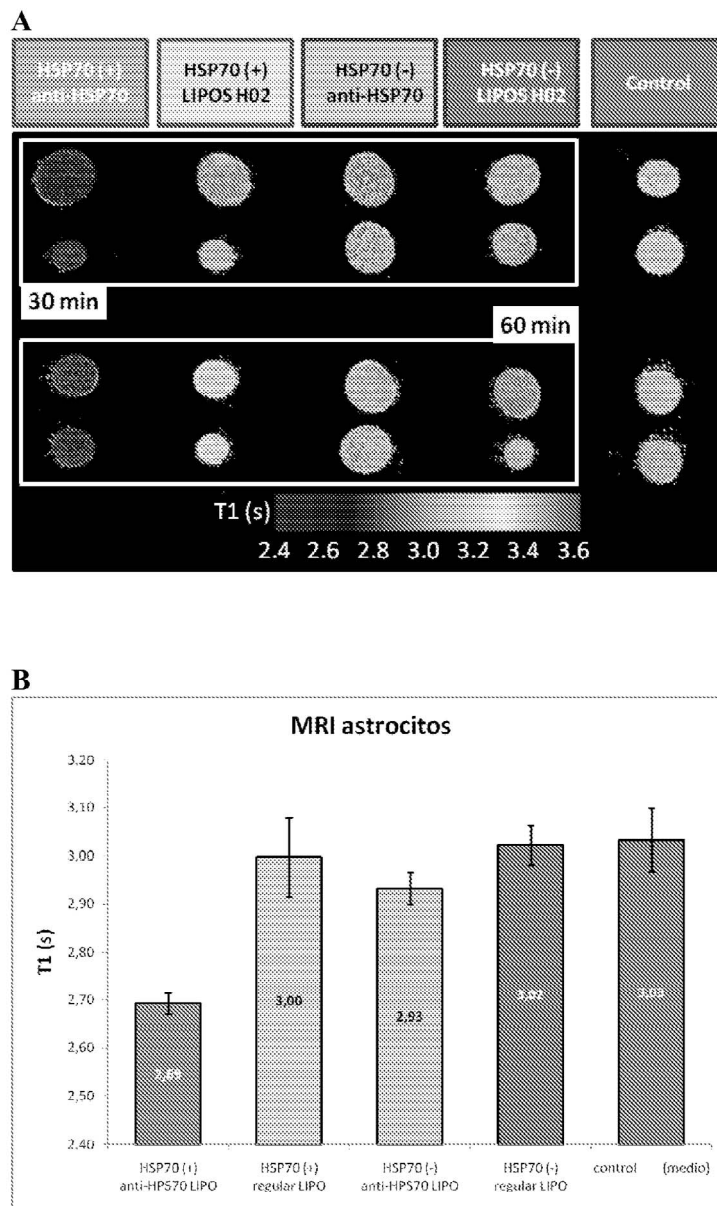


Fig. 10

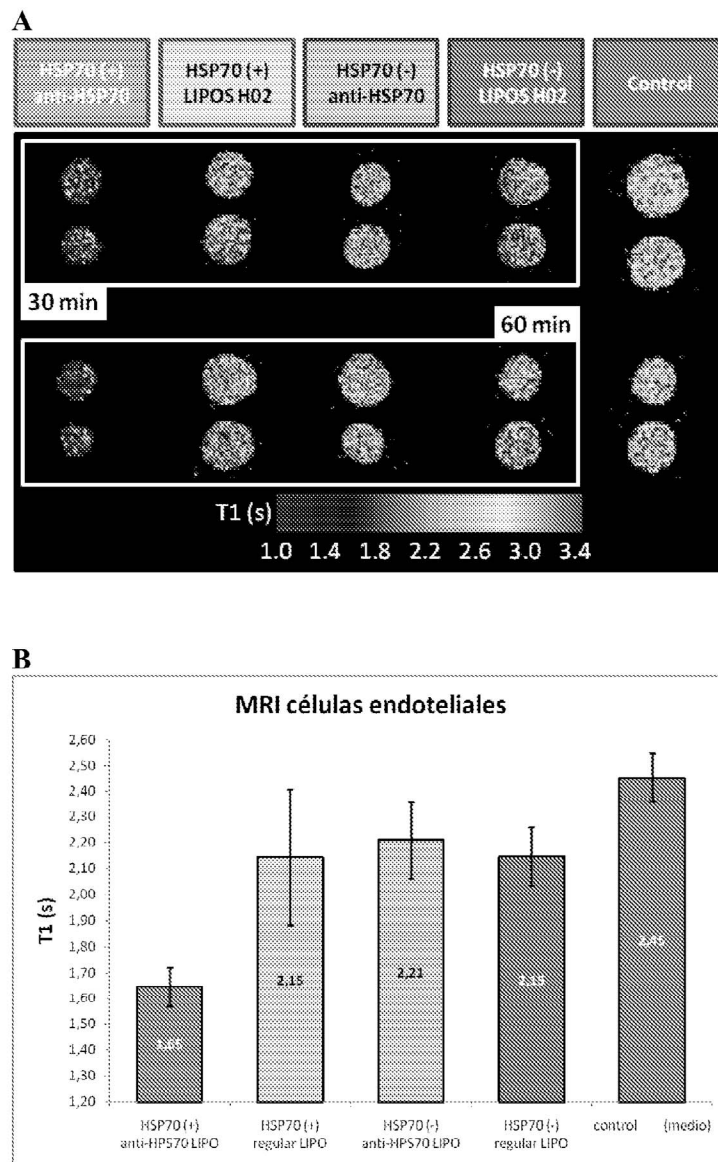


Fig. 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031645

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KATO H. et al. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. Brain Research. 1995, Vol. 679, páginas 1-7, todo el documento.	1-23
A	GIFFARD R. G. et al. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia. Anesthesiology. 08.2008, Vol. 109, Nº 2, páginas 339-348, todo el documento.	1-23
A	WO 2009045579 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 09.04.2009, todo el documento.	1-23
A	WO 2009126297 A2 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 15.10.2009, todo el documento.	1-23
A	US 20050089471 A1 (JOHNSON et al.) 28.04.2005, todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.10.2011

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/395 (2006.01)

A61K49/18 (2006.01)

A61K51/12 (2006.01)

A61K103/34 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KATO H. et al. Brain Research. Vol. 679, páginas 1-7	1995
D02	GIFFARD R. G. et al. Anesthesiology. Vol. 109, Nº 2, páginas 339-348.	08.2008
D03	WO 2009045579 A2	09.04.2009
D04	WO 2009126297 A2	15.10.2009
D05	US 20050089471 A1	28.04.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un liposoma que posee anticuerpos dirigidos contra la proteína de choque térmico de 70 kDa (anti-HSP70) unidos al liposoma por el grupo maleimida (reivindicaciones de la 1 a la 5) con un diámetro entre 45 y 450 nm (reivindicaciones 6 y 7) y que comprende fosfolípidos unidos a un compuesto fluoróforo (reivindicaciones de la 8 a la 10) y/o fosfolípidos que comprenden una sal de gadolinio (reivindicaciones de la 11 a la 13). También tiene por objeto el uso de los mencionados liposomas para la identificación de células en las que la proteína HSP70 está sobreexpresada (reivindicaciones de la 14 a la 21) y un método para la determinación de la región peri-infarto de un individuo (reivindicaciones 22 y 23).

D01 investiga la inducción y localización de la proteína HSP27 en el cerebro de rata después de 1 hora de oclusión de la arteria cerebral en comparación con la proteína HSP70, llevando a cabo el análisis de secciones de cerebro inmunohistoquímicamente con anticuerpos frente a ambas proteínas. HSP70 se localiza sobre todo en neuronas de áreas periféricas del centro isquémico después de 1 y 3 días, y en células endoteliales y células perivasculares dentro del centro isquémico después de 1 día. Concluye que HSP70 puede ser un marcador sensible de estrés neuronal agudo en las áreas de penumbra.

D02 revisa el papel de la familia de proteínas HSP70 considerando especialmente las funciones protectoras de HSP72 en isquemia cerebral. Tales proteínas ejercen efectos tanto antiinflamatorios como proinflamatorios dependiendo del tipo celular, contexto y localización intra o extracelular. HSP70 podría usarse como tratamiento farmacológico en diversas enfermedades, así como biomarcador útil en el diagnóstico y pronóstico de diferentes patologías como la isquemia.

D03 anticipa nanopartículas cubiertas de una capa hidrofílica unidas a un agente útil para diagnóstico por imagen, como gadolinio, y a moléculas que puedan servir para diferenciar una célula sana de una célula enferma, como anti-HSP70, e iniciar la apoptosis en el caso de estas últimas. En concreto, dichas nanopartículas pueden emplearse en la elaboración de un medicamento para el diagnóstico *in vivo* mediante técnicas como MRI o PET y para el tratamiento del cáncer.

D04 divulga un método para predecir o detectar isquemia neurológica en pacientes sometidos a cirugía torácica aortica que implica analizar los cambios que experimenta un bio-marcador, HSP70 y/o HSP27, en el líquido cefalorraquídeo.

D05 anticipa compuestos marcados con capacidad de unión a LOX-1 útiles en el diagnóstico y monitorización de enfermedades que cursan con inflamación como el infarto de miocardio, la isquemia causada por trombos o la artritis reumatoide. Los compuestos pueden estar marcados con gadolinio el cual puede estar encapsulado, por ejemplo, en un liposoma, y contienen también una molécula peptídica como Hsp70 con capacidad de unión a LOX-1.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

En la literatura que se ha consultado, constituida por documentos de patentes y por publicaciones científicas, se han encontrado nanopartículas y compuestos que comprenden agentes útiles en el diagnóstico por imagen, como gadolinio, y moléculas que puedan servir, por ejemplo, para diferenciar una célula sana de una célula enferma, como es el caso de anti-HSP70, en los que alguno/s de sus componentes pueden estar incluidos o unidos a liposomas. También se ha hallado que HSP70 juega un papel importante en los procesos isquémicos y, en particular, en isquemia cerebral de modo que podría ser utilizado como biomarcador útil en el diagnóstico y pronóstico de esta y otras enfermedades.

Sin embargo, en la documentación y bases de datos consultadas no se ha encontrado un liposoma con la misma composición que el liposoma que es objeto de la presente invención.

Por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 23 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.