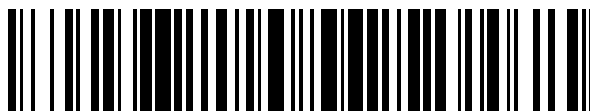


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 824**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012** **PCT/US2012/032649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO12139080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012** **E 12767275 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 2694116**

54 Título: **Nanopartículas a base de lípidos**

30 Prioridad:

06.04.2011 US 201161472605 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2018

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (25.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US;
ALZECA BIOSCIENCES, LLC (25.0%);
BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF HOUSTON SYSTEM (25.0%) y
TEXAS CHILDREN'S HOSPITAL (25.0%)

72 Inventor/es:

ANNAPRAGADA, ANANTH;
ERIKSEN, JASON, L.;
TANIFUM, ERIC, A.;
DASGUPTA, INDRANI y
COOK, STEPHEN, C.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 824 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

Nanopartículas a base de lípidos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de patente provisional U.S. N.º 61/472.605, presentada el 6 de abril de 2011.

declaración con respecto a la investigación o el desarrollo con patrocinio federal

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno bajo W81XWH-09-2-0139 otorgado por el Departamento de Defensa de los EE. UU. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

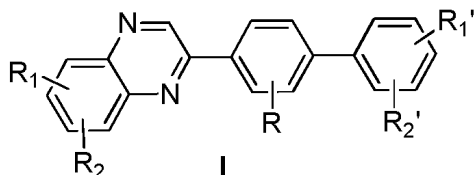
La enfermedad de Alzheimer ("AD") es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida de memoria y otros déficits cognitivos. AD es la forma más común de demencia y afecta a una de cada ocho personas mayores de 65 años y uno de cada dos mayores de 85 años. AD es la sexta causa de muerte en los Estados Unidos. Más de 5,5 millones de estadounidenses sufren de AD, con un costo anual estimado de \$ 200 billones USD. En el año 2050, se proyecta que AD afectará a más de 20 millones de estadounidenses con un precio anual de \$ 1,1 trillones USD (en 2011 dólares). En todo el mundo, las cifras estimadas para el año 2011 fueron más de 37 millones de pacientes, con un costo asociado de más de \$ 600 billones (USD).

Un obstáculo significativo para la identificación y el tratamiento de la AD es la escasez de pruebas de diagnóstico efectivas. En la actualidad, la AD generalmente se diagnostica de manera concluyente mediante análisis histopatológico post mortem. El diagnóstico en pacientes vivos se basa principalmente en pruebas psiquiátricas para detectar el deterioro cognitivo. Sin embargo, los principales marcadores neuropatológicos de depósitos de placa AD- β amiloide extracelular (" $A\beta$ ") y ovillos neurofibrilares intracelulares se manifiestan mucho antes de que los síntomas clínicos sean discernibles. Los depósitos de $A\beta$ también representan un importante factor de riesgo de accidente cerebrovascular hemorrágico.

Por lo tanto, existe una necesidad de composiciones y procedimientos adecuados para la formación de imágenes in vivo de depósitos de placa de $A\beta$ intracraneal, con fines de diagnóstico y para controlar la efectividad de terapias dirigidas a evitar depósitos de placa de $A\beta$. Los enfoques actuales sufren de una o más de una miríada de inconvenientes, que incluyen invasividad, falta de especificidad de los agentes de formación de imágenes para depósitos de $A\beta$, resolución inadecuada, la incapacidad de los agentes de formación de imágenes para atravesar la barrera hematoencefálica ("BBB") de manera efectiva, una tendencia por parte de los agentes de formación de imágenes para inducir una respuesta proinflamatoria inadecuadamente alta en la vecindad de los depósitos de $A\beta$, y una citotoxicidad inadecuada. Por lo tanto, existe una necesidad adicional de composiciones y procedimientos que sean adecuados para la formación de imágenes in vivo de depósitos de placa de $A\beta$ intracraneal, pero que no sufren de uno o más de los inconvenientes de los enfoques actuales. Todavía es necesario que existan composiciones y procedimientos adecuados para tratar o ayudar al tratamiento o la profilaxis de AD. SKAAT H ET AL: Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid-beta fibrils detection and removal by a magnetic field", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 386, núm. 4, septiembre de 2009, páginas 645-649, divulga nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3) que permiten la detección temprana de placas amiloides usando MRI.

Sumario

En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en la que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula I:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula I se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, polietilen glicol ("PEG") y un lípido, por ejemplo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina ("DPPC"), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DSPE"), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina ("DSPC"), 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina ("DPPE"), para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I se incorpora en una composición liposómica.

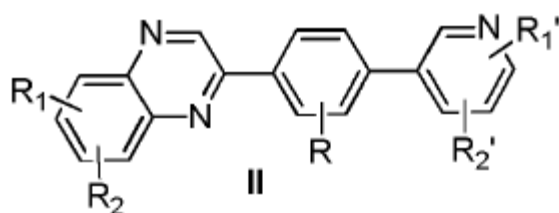
- 5 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 10 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula II:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 15 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula II se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II. En una realización, el conjugado de fosfolípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II se incorpora en una composición liposómica.

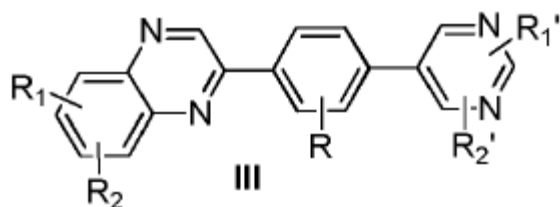
- 20 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con los uno o más depósitos amiloides.

- 25 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula III:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 30 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula III se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III se incorpora en una composición liposómica.

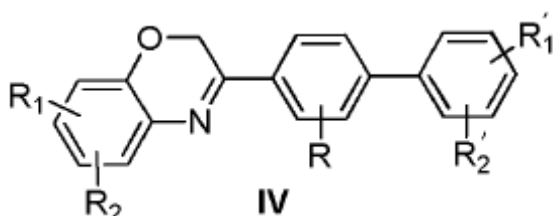
- 35 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 5 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula IV:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 10 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula IV se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV se incorpora en una composición liposómica.

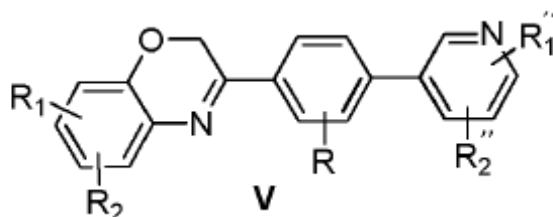
- 15 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 20 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula V:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 25 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula V se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V se puede incorporar en una composición liposómica.

- 30 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

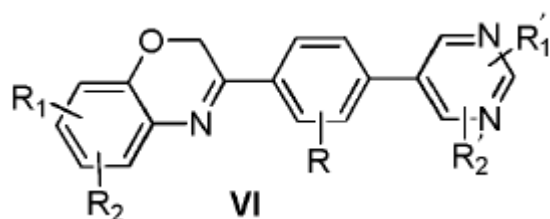
introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con los uno o más depósitos amiloides.

- 35 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un

fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula VI:



en el que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 5 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula VI se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI se incorpora en una composición liposómica.

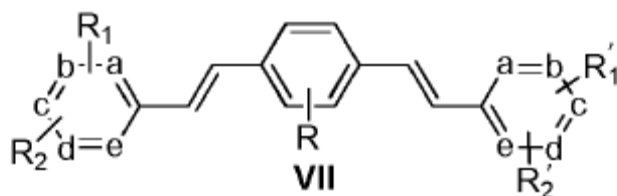
- 10 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 15 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula VII:



en el que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo; y en el que a, b, c, d, e = C, N, O, o S.

- 20 En una realización, el compuesto aromático de Fórmula VII se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII. En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII se incorpora en una composición liposómica.

- 25 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 30 En una realización, se proporciona una composición liposómica, la composición liposómica que comprende:

un fosfolípido;

colesterol,

un agente de potenciación de contraste que contiene gadolinio no radioactivo;

un fosfolípido que se derivatiza con un polímero; y

un conjugado que comprende un compuesto aromático que tiene cualquiera de las fórmulas I-VII, tal como un conjugado en una forma de un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-compuesto aromático descrito en la presente.

En una realización, la composición liposómica comprende:

DPPC;

5 colesterol;

(ácido dietilentriaminopentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio ("GdDTPA-BSA")

1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilen glicol)-2000] ("DSPE-mPEG-2000"; CAS Núm. 147867-65-0); y DSPE-PEG_n-metoxi-XO₄, donde n (es decir, el número de unidades repetidas de etilen glicol) = aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

10 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un fosfolípido; colesterol,

un agente de potenciación de contraste que contiene gadolinio no radioactivo;

15 un fosfolípido que se derivatiza con un polímero; y

un conjugado que comprende un compuesto aromático que tiene cualquiera de las fórmulas I-VII, tal como un conjugado en una forma de un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-compuesto aromático descrito en la presente;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

20 En una realización, la detección comprende la detección por imagen de fluorescencia (FI). En otra realización, la detección comprende la detección por imagen de resonancia magnética (MRI). También se describe un procedimiento, en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes que se estima apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

25 En una realización, la detección comprende la detección por FI. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para el uso con imágenes SPECT y/o imágenes PET en National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

30 Breve descripción de los dibujos

En las figuras acompañantes, se proporcionan fórmulas químicas, estructuras químicas y datos experimentales que, junto con la descripción detallada proporcionada a continuación, describen ejemplos de formas de realización de la invención reivindicada.

35 La Figura 1 ilustra un esquema de ejemplo para la síntesis del conjugado lípido-polímero hidrófilo-ligando aromático, DSPE-PEG_n-metoxi-XO₄ ("Me-XO₄").

La Figura 1A ilustra el ejemplo de imágenes del microscopio electrónico de transmisión ("TEM") de DSPE-PEG_{MW=3400}-metoxi-XO₄ liposómica.

La Figura 1B ilustra otro ejemplo de imágenes TEM de DSPE-PEG_{MW=3400}-metoxi-XO₄ liposómico.

40 La Figura 2A ilustra la afinidad de unión de liposomas marcados con Me-XO₄ a fibrillas Aβ(1-40) sintéticas.

La Figura 2B ilustra los resultados del ejemplo de la competición entre liposomas marcados con Me-XO₄, Crisamina G ("CG"), y ligando metoxi-XO₄ libre, para los sitios de unión en las fibrillas Aβ(1-40).

La Figura 3 ilustra los resultados del ejemplo de la tinción ex vivo de tejido cerebral de ratón con liposomas marcados con Me-XO₄.

45 La Figura 4 ilustra los resultados del ejemplo de la competición entre los liposomas marcados con Me-XO₄ y CG para los sitios de unión en los depósitos de la placa Aβ en el tejido cerebral de ratón, ex vivo.

La Figura 5 ilustra los resultados del ejemplo de tinción in vivo del tejido cerebral de ratón con liposomas marcados con Me-XO4, y con ligando de metoxi-XO4 libre.

La Figura 6 ilustra una reconstrucción óptica del ejemplo de imágenes del microscopio confocal de una sección sagital de un cerebro de ratón inyectado con liposomas marcados con Me-XO4.

- 5 La Figura 7 ilustra un ejemplo de comparación del potencial inflamatorio entre el ligando de metoxi-XO4 libre y el conjugado de Me-XO4.

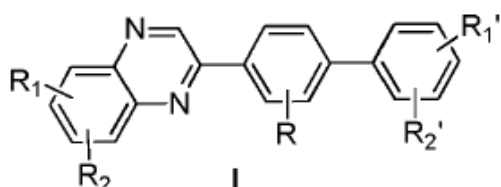
La Figure 8 ilustra un ejemplo de comparación de la toxicidad celular entre el ligando de metoxi-XO4 libre y el conjugado de Me-XO4.

- 10 La Figura 9A ilustra una comparación de toxicidad celular entre DSPE-PEG-ácido 3-fluoro-4-aminometilfenil borónico y el ligando libre, ácido 3-fluoro-4-aminometilfenil borónico.

La Figura 9B ilustra una comparación del potencial inflamatorio entre el conjugado de DSPE-PEG-ácido 4-aminopirimidin borónico y el ligando libre, ácido 4-aminopirimidin borónico.

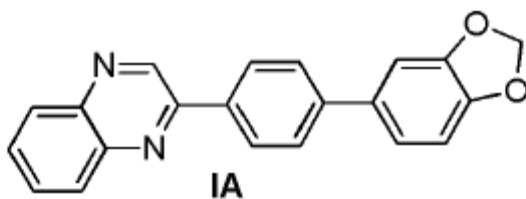
Descripción detallada

- 15 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula I:

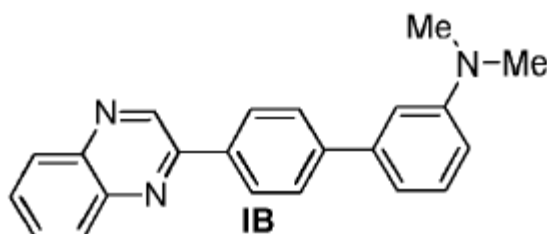


en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

- 20 En una realización, R = H, R₁ = H, R₂ = H, y R₁' y R₂' juntos forman la unión -O-CH₂-O-para formar un 1,3-benzodioxol. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula I es el compuesto 1,4-quinoxalin fenil 1,3-benzodioxolilo IA:

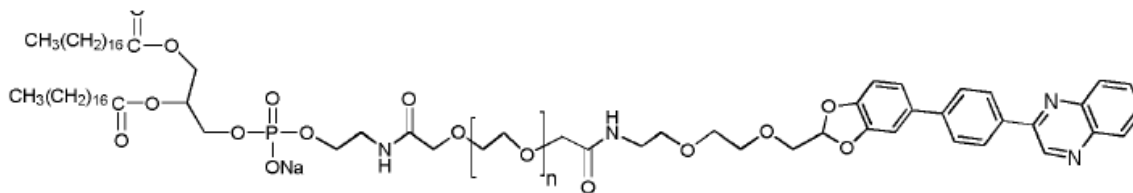


En otra realización, R = H, R₁ = H, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = NMe₂. En consecuencia, otro ejemplo de un compuesto de Fórmula I es el compuesto 1,4-quinoxalin bifenilo IB:



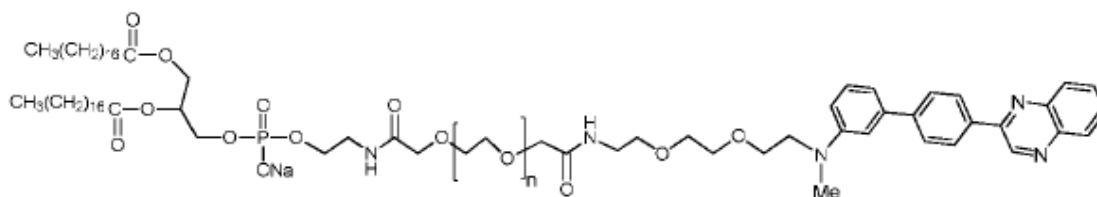
- 25 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula I se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 – 10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I.

En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I comprende:



en la que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

En otra realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I comprende:



5

en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I se incorpora en una composición liposómica.

En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

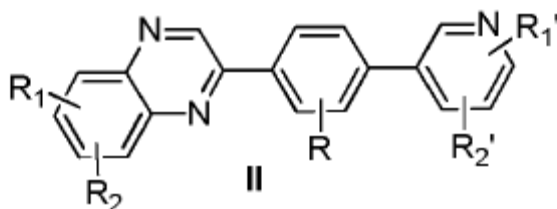
- 10 introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula I;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 15 En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

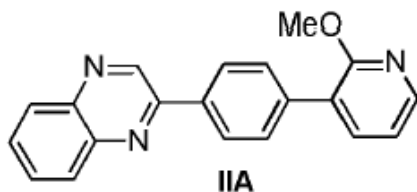
- 20 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula II:



en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

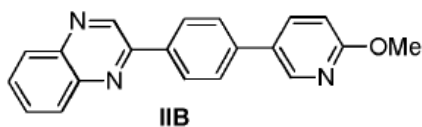
25

En una realización, $R = H$, $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_1' = H$, y $R_2' =$



OMe. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula II es el compuesto 1,4-quinoxalin fenil piridinilo IIA:

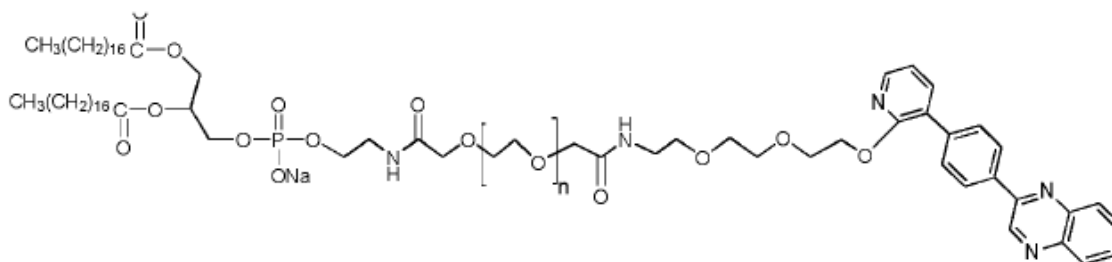
Otro ejemplo de un compuesto de Fórmula II es el compuesto 1,4-quinoxalin fenil piridinilo IIB:



5

En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula II se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II.

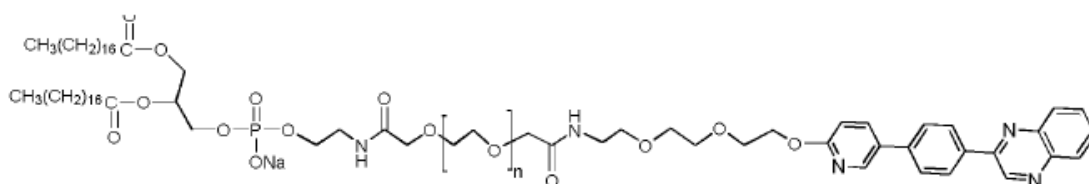
En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II comprende:



10

en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

En otra realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II comprende:



en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

15 El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II se incorpora en una composición liposómica.

En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula II;

20 dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

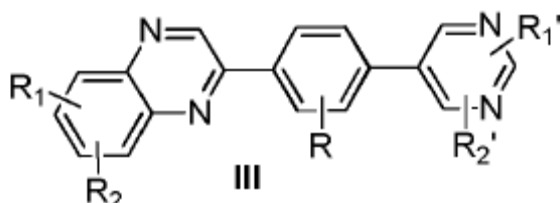
detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast

25

Agent Database ("MICAD").

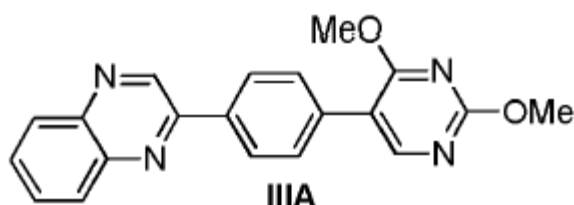
En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula III:



- 5 en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

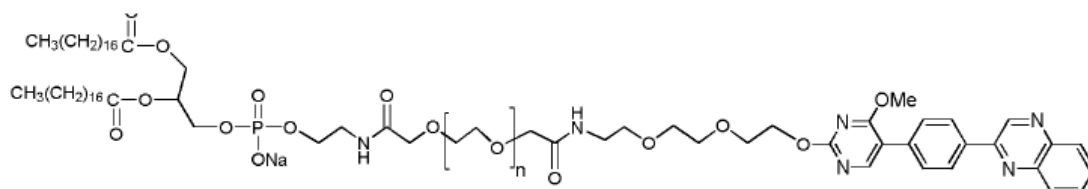
En una realización, R = H, R₁ = H, R₂ = H, R₁' = OMe, y

R₂' = OMe. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula III es el compuesto 1,4-quinoxalin fenil pirimidinilo IIIA:



- 10 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula III se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III.

En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III comprende:



- 15 en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III se incorpora en una composición liposómica.

En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes del depósito amiloide en un paciente, el procedimiento que comprende:

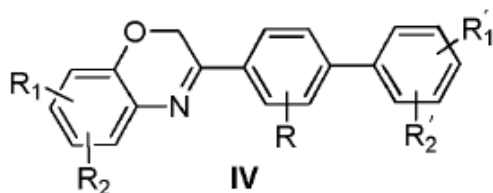
- 20 introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula III;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

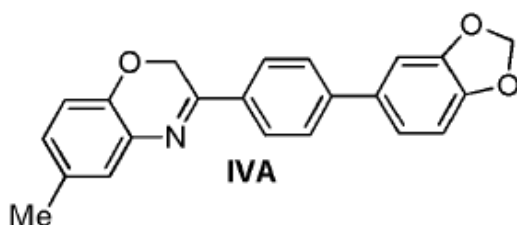
- 25 En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula IV:

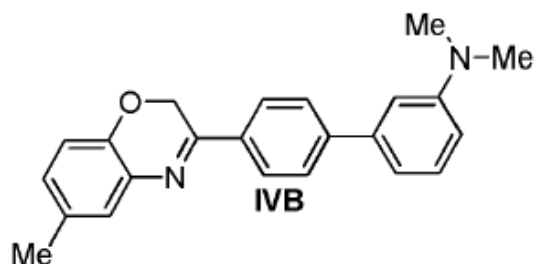


5 en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

En una realización, R = H, R₁ = Me, R₂ = H, y R₁' y R₂' juntos forman la unión -O-CH₂-O-para formar un 1,3-benzodioxol. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula IV es el compuesto 1,4-benzoxazin fenil 1,3-benzodioxolilo IVA:

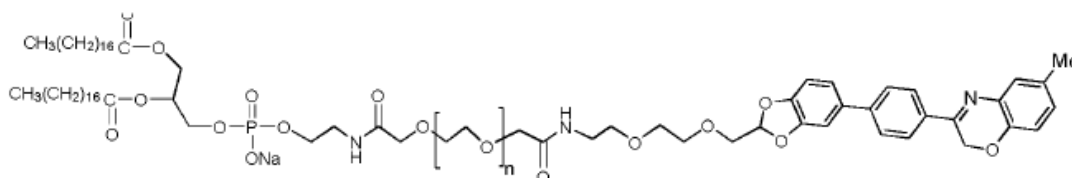


10 En otra realización, R = H, R₁ = Me, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = NMe₂. En consecuencia, otro ejemplo de un compuesto de Fórmula IV es el compuesto 1,4-benzoxazin bifenilo IVB:



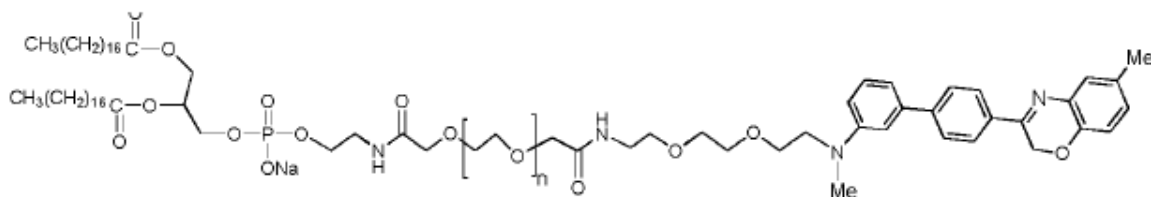
15 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula IV se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV.

En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV comprende:



en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

En otra realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV comprende:



en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV se incorpora en una composición liposómica.

- 5 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula IV;

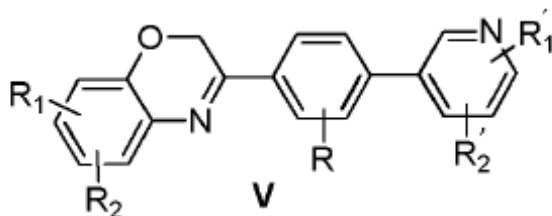
dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

- 10 detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

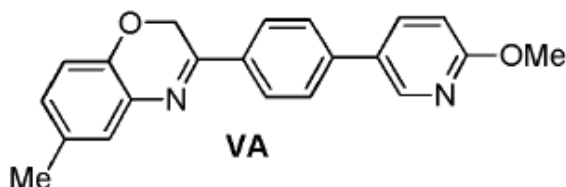
- 15

En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula V:



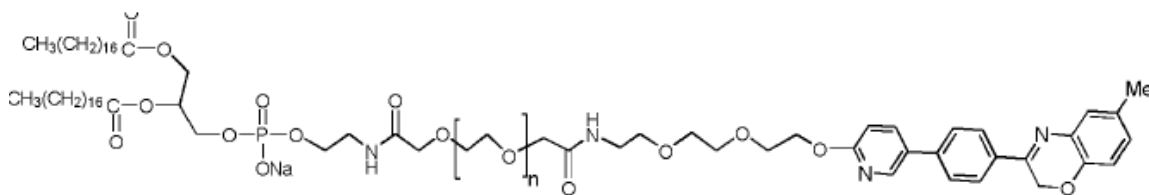
- 20 en la que $R, R_1, R_2, R_1', R_2' = H, F, Cl, Br, I$, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH_2 , NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

En una realización, $R = H, R_1 = Me, R_2 = H, R_1' = H$, y $R_2' = OMe$. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula V es el compuesto 1,4-benzoxazin fenil piridinilo VA:



- 25 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula V se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V.

En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V comprende:



en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V se incorpora en una composición liposómica.

- 5 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

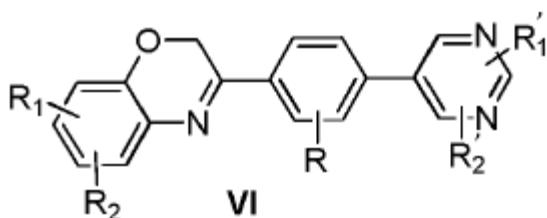
introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula V;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

- 10 detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

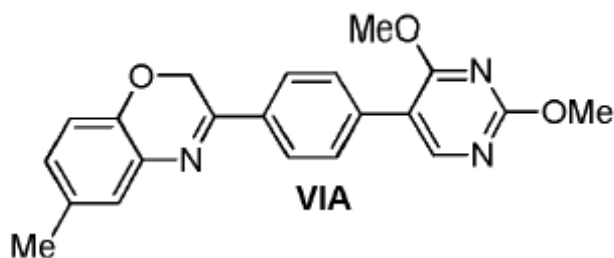
En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

- 15 En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula VI:



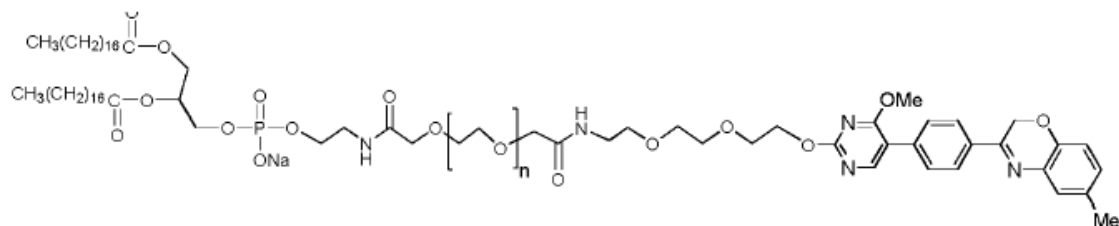
- 20 en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo.

En una realización, R = H, R₁ = Me, R₂ = H, R₁' = OMe, y R₂' = OMe. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula VI es el compuesto 1,4-quinoxalin fenil pirimidinilo VIA:



- 25 En una realización, el heterociclo aromático de Fórmula VI se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI.

En una realización, el conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI comprende:



en el que n es aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI se incorpora en una composición liposómica.

- 5 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VI;

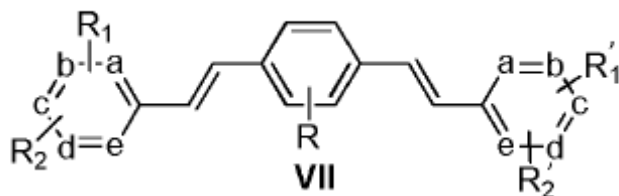
dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

- 10 detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

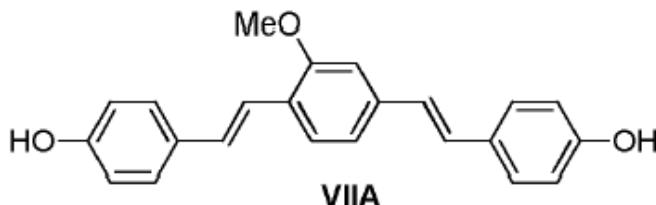
- 15

En una realización, se proporciona una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un fosfolípido-polímero-compuesto aromático en el que el compuesto aromático es un compuesto de Fórmula VII:



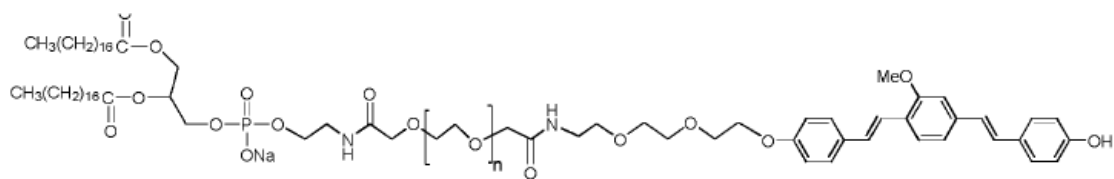
- 20 en la que R, R₁, R₂, R₁', R₂' = H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo, y a, b, c, d, e = C, N, O, o S.

En una realización, R = OMe, R₁ = H, R₂ = O-alquilo, R₁' = OH, y R₂' = H. En consecuencia, un ejemplo de un compuesto de Fórmula VII es el compuesto divinil benceno VIIA ("metoxi-XO4"):



- 25 En una realización, el compuesto aromático de Fórmula VII se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 – 10.000 Da) y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII. Por ejemplo, en una realización, el ligando de metoxi-XO4 se puede conjugar con PEG y DSPE para formar el conjugado de DSPE-PEG_n-Metoxi-XO4 mostrado como "1" en la Figura 1 (y algunas veces denominado de aquí en adelante como "Me-XO4"):

- 30



El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII, por ejemplo, Me-XO4, y aun más particularmente, DPSE-PEG₃₄₀₀Metoxi-XO4 (donde 3400 significa el peso molecular del polietilenglicol), se incorpora en una composición liposómica.

- 5 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de Fórmula VII;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

- 10 detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por imágenes MR. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

- 15 También se describen uno o más ligandos amiloides alternativos (es decir, diferentes de los ligandos de unión a amiloide descritos anteriormente), que incluyen, pero sin limitación, rojo Congo y sus derivados, Tioflavina T y sus derivados, y CG y sus derivados, que se puede conjugar con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 -10.000 Da) y similares, y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE, y similares, para formar un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de amiloide. El conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de amiloide se puede incorporar en una composición liposómica.

En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de lesiones amiloides, el procedimiento que comprende:

- 25 introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica definida en las reivindicaciones que comprende un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-ligando de amiloide;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

- 30 Las composiciones liposómicas descritas en la presente pueden permitir además la administración de moléculas terapéuticas a las lesiones amiloides, lo que permite el tratamiento de las lesiones.

En una realización, se proporciona una composición liposómica, la composición liposómica que comprende:

- 35 un fosfolípido; colesterol, un agente de potenciación de contraste que contiene gadolinio no radioactivo; un fosfolípido que se derivatiza con un polímero; y un conjugado que comprende un compuesto aromático que tiene cualquiera de las fórmulas I-VII, tal como un conjugado en una forma de un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-compuesto aromático descrito en la presente.

En una realización, la composición liposómica comprende:

DPPC; colesterol; Gd-DTPA-BSA; DSPE-mPEG-2000; y DSPE-PEG_n-metoxi-XO4, donde n = aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

- 40 En una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende un fosfolípido; colesterol,

un agente de potenciación de contraste que contiene gadolinio no radioactivo; un fosfolípido que se derivatiza con un polímero; y un conjugado que comprende un compuesto aromático que tiene cualquiera de las fórmulas I-VII, tal

como un conjugado en una forma de un conjugado de lípido-polímero hidrófilo-compuesto aromático descrito en la presente;

dejar suficiente tiempo para la que composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y

detectar la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

5 En una realización, la detección comprende la detección por FI. En otra realización, la detección comprende la detección por MRI. En efecto, los quelatos paramagnéticos hidrófilos, tales como GdDTPA, GdDOTA, GdHPDO3A, GdDTPA-BMA, y GdDTPA-BSA son agentes de contraste MRI conocidos. Ver Patente U.S. Núm. 5.676.928 presentada a Klaveness et al. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD").

10 Los fosfolípidos adecuados pueden incluir los descritos en la presente, y también pueden incluir los descritos en la Patente U.S. Núm. 7.785.568 presentado en Annapragada et al., Los fosfolípidos derivatizados con polímeros adecuados pueden incluir los descritos en la presente, y pueden incluir además los descritos en la patente U.S. Núm. 7.785.568.

15 En una realización, la detección comprende la detección por FI. También se describe un procedimiento en el que la detección comprende la detección por imágenes SPECT y/o imágenes PET, y el agente potenciador del contraste no radiactivo se reemplaza con un agente potenciador del contraste radiactivo, que comprende por ejemplo los agentes considerados apropiados para usar con imágenes SPECT y/o imágenes PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD"). Se contempla cualquier otro tipo adecuado de metodología de formación de imágenes conocida por los expertos en la técnica, que incluye imágenes de PET.

Ejemplos

Ciertas realizaciones se describen a continuación en la forma de ejemplos.

25 Ejemplo 1: Preparación del conjugado DSPE-PEG₃₄₀₀-Metoxi-XO4 1.

El conjugado DSPE-PEG_{MW= 3400}-Metoxi-XO4, 1, se sintetizó como la especie blanco (Figura 1) y más tarde se incorporó a las formulaciones liposómicas.

30 Con referencia a la Figura 1, la síntesis del compuesto 14, el resto de ligador-metoxi-XO4, se logró a través de una serie de reacciones de olefinación de Takai, Suzuki y JuliaKocienski. El bromuro 3 de precursor del ligador de PEG de 3 unidades protegido con Boc se preparó a partir del correspondiente alcohol 2 comercialmente disponible con buen rendimiento. El Intermedio 7, la sulfona para la etapa de olefinación de Julia-Kocienski también se preparó con excelentes rendimientos a partir de 4-hidroxibenzaldehído. El 4-hidroxibenzaldehído también se sometió por separado al protocolo Takai estándar para proporcionar el yoduro de vinilo 9. La reacción de 9 con ácido borónico 10 comercialmente disponible bajo condiciones de Suzuki proporcionó el compuesto 11 con buen rendimiento. El resto ligador se instaló cuantitativamente para dar el aldehído 12, que se expuso a la sulfona 7 en condiciones de Julia-Kocienski optimizadas para obtener el E, E-isómero 13 deseado con un rendimiento del 69% después de la purificación por cromatografía en columna. La desprotección global de los grupos MOM y Boc con HCl dio el resto del ligador-metoxi-XO4 14, como la sal de clorhidrato.

35 La conjugación con el resto lípido-PEG continuó mediante la sujeción de 14 y DSPE-PEG_{MW=3400}-COOH a condiciones de carbodiimida estándares para proporcionar el conjugado DSPE-PEG_{MW = 3400}-MeXO4 1 (un subconjunto de Me-XO4).

Ejemplo 2: Preparación y caracterización de liposomas marcados con Me-XO4 que contienen Gd.

40 Se empleó una mezcla de lípidos (50 mM) que comprende DPPC, colesterol, Gd-DTPA-BSA, DSPE-mPEG-2000, Me-XO4, y Rodamina-DHPE (para la detección óptica) en aproximadamente una relación molar 32,4: 40: 25: 2: 0,5: 0,1, respectivamente. Se contemplan otras relaciones, que incluyen una mezcla de lípidos que comprende DPPC, colesterol, Gd-DTPA-BSA, DSPE-mPEG-2000, y Me-XO4 en aproximadamente una relación molar de 32,5: 40: 25: 2: 0,5. Además, el DSPE-mPEG-2000 se puede reemplazar por completo con el conjugado Me-XO4, para una relación de conjugado DPPC, colesterol, Gd-DTPA-BSA, Me-XO4 de 32,5: 40: 25: 2,5. El límite superior en la molécula portadora de PEG puede ser de aproximadamente 15-25%, y el límite inferior en colesterol puede ser de aproximadamente 15-20%. Tras la hidratación en la solución PROHANCE® (Bracco Diagnostics, Inc., Monroe Township, NJ) durante 1,5 h, la mezcla se extruyó secuencialmente, a 65 °C, en un LIPEX™ THERMOLINE EXTRUDER (Northern Lipids Inc., Burnaby, B.C., Canadá) con cinco pasadas a través de una membrana NUCLEPORE™ de 200 nm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y diez pasadas a través de una membrana de 100 nm. La distribución del tamaño de partícula se determinó mediante TEM (Figuras 1A y 1B), de este modo se confirma un diámetro medio de aproximadamente 100,8 nm y una PDI de aproximadamente 0,05.

La concentración de ligando de Me-XO4 en las partículas se determinó usando una curva estándar de fluorescencia generada para que el ligando de Me-XO4 fuera de 26 μ M. El protocolo anterior da como resultado una distribución aproximadamente igual del ligando blanco entre las caras interna y externa de la bicapa lipídica. Esto implica que para cada concentración informada de ligando Me-XO4 en las nanopartículas, aproximadamente el 50% del total de ligandos Me-XO4 están disponibles para la unión. El ligando Me-XO4 es altamente fluorescente en forma intrínseca y también lo son las nanopartículas que portan el ligando de Me-XO4. Esta propiedad se usó como un indicador de las ubicaciones de las nanopartículas en el transcurso de todos los experimentos.

Ejemplo 3: Afinidad de unión in vitro de los liposomas marcados con Me-XO4 que contienen gadolinio para la síntesis de fibrillas A β

Los liposomas marcados con Me-XO4 del Ejemplo 2 y las soluciones madre del ligando Me-XO4 se diluyeron con Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, a 500 nM. Se añadió un pequeño volumen de la solución madre A β 100 μ M a los compuestos de ensayo para lograr una concentración final de fibrillas de 20 μ M. Esto fue seguido por la adición de concentraciones apropiadas del competidor no fluorescente, CG. La mezcla de unión se incubó a RT durante 1 hora y luego se centrifugó durante 20 minutos a 16.400 rpm para separar las fibrillas. El precipitado se lavó dos veces con tris-HCl. La fluorescencia se midió en un lector de placa SpectraMax 384 (Molecular Devices, Inc. Sunnyvale, CA), usando longitudes de onda de excitación y emisión de 368 nm y 450 nm, respectivamente. La Figura 2A ilustra la afinidad de unión de los liposomas marcados con Me-XO4 que contienen Gd del Ejemplo 2 a agregados de A β sintéticos (1-40). La Figura 2B ilustra la capacidad de los liposomas marcados con Me-XO4 que contienen Gd para competir por los sitios de unión con el ligando Me-XO4 libre.

Ejemplo 4: Tinción ex vivo del tejido cerebral de ratón.

La capacidad de los liposomas marcados con Me-XO4 que contienen Gd del Ejemplo 2 para unir las placas A β se evaluó mediante tinción de secciones cerebrales de la línea de ratones transgénicos APP/PSEN1. Los ratones se diseñaron para desarrollar progresivamente placas A β corticales e hipocampales de una manera relacionada con la edad similar a la observada en la patología de AD humana. Se incubaron secciones sagitales (30 μ m de espesor) de ratones APP/PSEN1 no transgénicos sacrificados (de control) a 5 y 7 meses de edad en una solución 3 mM de los liposomas (concentración de Me-XO4 en la solución fue 1 μ M) durante 2 horas a RT. Esto fue seguido por lavado extendido con PBS para eliminar los liposomas no unidos. Los tejidos teñidos se montaron con medios de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) para reducir la fluorescencia de fondo y se observaron bajo un microscopio confocal.

Como se muestra en la Figura 3, los portaobjetos de los ratones no transgénicos (panel I) no mostraron manchas fluorescentes distintas debido a la ausencia de placas. Distintos depósitos de placa (paneles II y III), así como angiopatía amiloide cerebral (panel IV) se destacaron mediante el agente en las secciones del cerebro de los ratones de 7 meses, pero no los ratones de 5 meses. Se observó el mismo patrón de deposición de placa cuando las secciones similares se sometieron al mismo protocolo con el ligando de metoxi-XO4 libre.

Para confirmar adicionalmente la capacidad de los liposomas marcados con Me-XO4 que contienen Gd para unir selectivamente depósitos de placa de A β en tejido cerebral, se repitió el protocolo de tinción con 1 μ M de Me-XO4 y concentraciones crecientes de CG. Los resultados (Figura 4) muestran una disminución en la intensidad de fluorescencia y el número de placas marcadas tanto en la corteza (A) como en el hipocampo (B), con el aumento de la concentración de CG.

Ejemplo 5: Administración in vivo de liposomas marcados con Me-XO4 que contienen gadolinio a placas corticales e hipocampales en una línea de ratón transgénico APP/PSEN1 de 7 meses.

Los liposomas marcados con Me-XO4 que contenían Gd se administraron a ratones APP/PSEN1 de 5 y 7 meses de edad mediante inyección en la vena de cola. 48 h después de la inyección, los ratones se sacrificaron y sus cerebros se seccionaron para estudios de microscopía óptica confocal. Se inyectaron ratones idénticos con ligando de metoxi-XO4 molecular/libre para servir como un control positivo, y con liposomas no dirigidos y solución salina como controles negativos.

No se observó una fluorescencia digna de mención (que indique la ausencia de placas) cuando se obtuvieron imágenes de las secciones de tejido cerebral de cualquiera de los ratones de 5 meses de edad. Las secciones de los ratones de 7 meses de edad (Figura 5) a lo que se inyectaron liposomas no dirigidos (panel I) y solución salina tampoco mostraron fluorescencia. Ratones idénticos a los que se les inyectó un ligando de metoxi-XO4 libre (paneles II y III) revelaron una tinción brillante de las placas tanto corticales como del hipocampo. Los animales a los que se les inyectaron liposomas Me-XO4 que contienen Gd (paneles IV, V y VI) revelaron depósitos de placa y patología vascular similares.

La reconstrucción óptica de imágenes en un portaobjetos de uno de los ratones tratados con nanopartículas en este estudio (Figura 6) muestra la localización de la fluorescencia predominantemente en la corteza (las cuatro flechas de más arriba, en la sección A) y el hipocampo (las cuatro flechas de más abajo, en la sección B). Los liposomas Me-XO4 que contienen Gd penetraron en la barrera BBB y migraron de manera penetrante a través del cerebro.

Ejemplo 6: Potencial inflamatorio de Me-XO4.

La inflamación alrededor del depósito de amiloide se considera un factor de riesgo importante para la progresión de la AD. Por lo tanto, es muy deseable que los agentes de formación de imágenes presenten un riesgo de inflamación bajo o reducido. Los conjugados lípido-PEG-ligando generalmente tienden a ser de naturaleza inflamatoria. En efecto, los lipopolisacáridos ("LPS"), que son similares en estructura a los conjugados de lípido-ligando-PEG, están entre las composiciones más inflamatorias conocidas.

El potencial inflamatorio de Me-XO4 se comparó con el ligando metoxi-XO4 libre (es decir, no conjugado), LPS y un control no tratado ("UTC"). La translocación de NF-kb del citosol al núcleo es un evento temprano en la reacción inflamatoria. Después de recibir el potencial inflamatorio, NF-kb se mueve desde el citoplasma al núcleo e induce la transcripción génica. Por lo tanto, la translocación de NF-kb es un marcador ampliamente utilizado para la inflamación. En resumen, el protocolo se describe a continuación.

Se sembraron 15.000 células HeLa en cada una de las placas de 96 pocillos y se dejaron reposar durante la noche. Las células se trataron con las diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo durante 2 horas en una incubadora a 37 °C. Los controles positivos se trataron con 1 mg/ml de LPS. Al final del período de incubación, el medio se aspiró y las células se lavaron con PBS. Las células se trataron con paraformaldehído 4% (para fijar las células) durante 10 minutos a RT. Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Las células se incubaron con Triton-X-100 0,25% en PBS durante 10 minutos a RT, y se lavaron de nuevo tres veces (5 minutos cada lavado) con PBS. Las células se incubaron con BSA 1% en PBS-T (PBS con Tween-20 0,1%) durante 45 minutos a RT. Al final del período de incubación, las células se incubaron adicionalmente con anticuerpo primario contra la dilución de NF-kb a 1:50 en PBST durante 1 h a RT. Las células se lavaron de nuevo con PBS tres veces (5 minutos cada una). Las células se incubaron con el anticuerpo secundario en PBST durante 1 h a RT y se lavaron nuevamente tres veces (5 min cada una) con PBS. Se colocaron 100 µl de DAPI (1 µg/ml) en cada pocillo y se mantuvieron a 4 °C hasta un análisis posterior. Las células se escanearon en un citómetro de imagen Cell Lab IC-100 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Los datos se analizaron adicionalmente usando el software CyteSeer (Vala Sciences, San Diego, CA), y se representaron como el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) de la intensidad de la proteína presente sobre la máscara nuclear.

Sorprendentemente, se encontró que Me-XO4 era menos inflamatorio que el ligando de metoxi-XO4 libre en absoluto, pero las concentraciones más altas (500 nM) analizadas. Los resultados se representan en la Figura 7. Por lo tanto, es una enseñanza particular de al menos una realización en la presente que el ligando de unión a amiloide conjugado y/o liposómico es menos (o al menos no más) inflamatorio que el ligando libre.

Ejemplo 7: Citotoxicidad de Me-XO4.

La citotoxicidad de Me-XO4 se comparó con el ligando metoxi-XO4 libre (es decir, no conjugado) y un control no tratado. La toxicidad de los compuestos de prueba se evaluó usando ensayos de MTT estándar. 15.000 células HeLa se sembraron en cada una de las placas de 96 pocillos y se dejaron reposar durante la noche. Las células se trataron con tres concentraciones diferentes de los compuestos de ensayo durante 2 horas en una incubadora a 37 °C. Los controles positivos se trataron con 1 mg/ml de LPS. Al final del período de incubación, se usó un kit de ensayo de toxicidad de células MTS (kit de ensayo CELLTITER 96® Aqueous Promega, Madison WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Al final del período de incubación, las células se trataron con 15 µl de medio reactivo MTS/ 100 µl durante 3 horas a 37 °C. Después de 3 h de incubación, se registró la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas.

Sorprendentemente, se descubrió que Me-XO4 es menos citotóxico que el ligando de metoxi-XO4 libre. Los resultados se representan en la Figura 8. Por lo tanto, es una enseñanza particular de al menos una realización en la presente que el ligando de unión a amiloide conjugado y/o liposómico es menos (o al menos no más) tóxico que el ligandolibre.

Ejemplo 8 (Comparativo): citotoxicidad y potencial inflamatorio del ligando de ácido borónico después de la conjugación con un anclaje de lípido-PEG.

La citotoxicidad del ácido 3-fluoro-4-aminometilfenilborónico se comparó con el ligando conjugado, a saber DSPE-PEG-ácido 3-fluoro-4-aminometilfenilborónico, LPS, y un control no tratado, de acuerdo con los mismos protocolos descritos anteriormente en el Ejemplo 7. La Figura 9A ilustra la fracción de células supervivientes. Como se esperaba, el ligando conjugado es significativamente más citotóxico que el ligando libre.

El potencial inflamatorio del ácido 4-aminopirimidina-borónico se comparó con el ligando conjugado, concretamente el DSPE-PEG-ácido 4-aminopirimidina-borónico, LSP, y un control no tratado, de acuerdo con los mismos protocolos descritos anteriormente en el Ejemplo 6. La Figura 9B representa el PCC entre las fracciones nuclear y citoplásmica de la molécula de NFkB en células HeLa. Como se esperaba, el ligando conjugado es significativamente más inflamatorio que el ligando libre.

En la medida en que el término "incluye" o "que incluye" se usa en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, se considera que sea inclusivo de una manera similar al término "que comprende" como se interpreta ese término

cuando se emplea como una palabra de transición en una reivindicación.

Finalmente, cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un número, se considera que incluye $\pm 10\%$ del número. Por ejemplo, "aproximadamente 10" puede significar de 9 a 11.

REIVINDICACIONES

1. Una composición liposómica, que comprende:

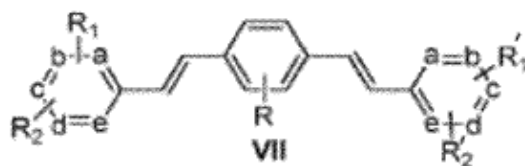
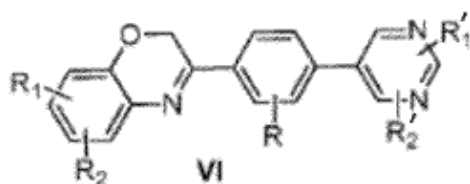
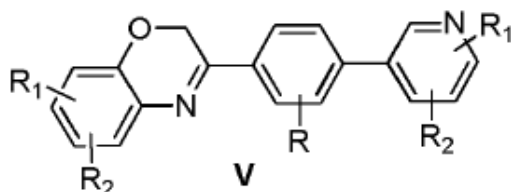
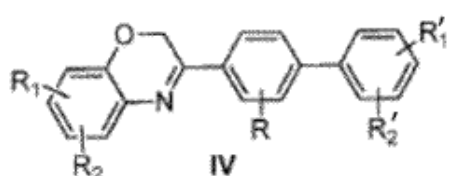
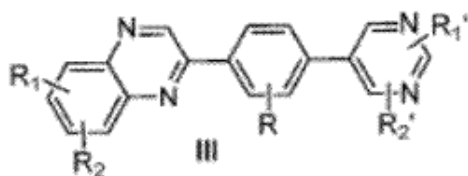
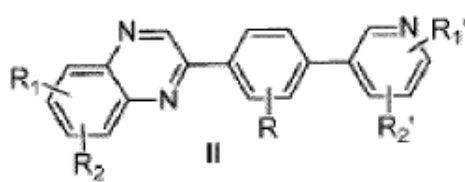
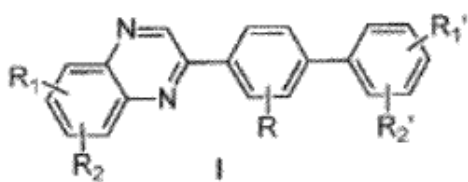
una membrana, que comprende:

un primer fosfolípido;

5 colesterol;

un segundo fosfolípido, el segundo fosfolípido que se derivativa con un polímero; y

un tercer fosfolípido, el tercer fosfolípido es un conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático, el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representados por una de las Fórmulas I, II, III, IV, V, VI, o VII:



en las que:

R, R₁, R₂, R₁', y R₂' son de modo independiente H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo, o glicosilo; y

15 a, b, c, d, e son de modo independiente C, N, O, o S; y

un agente potenciador de contraste de imagen por resonancia magnética no radioactiva (MRI) al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana.

2. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por la

Fórmula I; y

R = H, R₁ = H, R₂ = H, y R₁' y R₂' juntos forman la unión -O-CH₂-O-para formar un 1,3-benzodioxol, o R = H, R₁ = H, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = NMe₂.

3. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que :

5 el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por la Fórmula II; y

R = H, R₁ = H, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = OMe.

4. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

10 el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por la Fórmula III; y

R = H, R₁ = H, R₂ = H, R₁' = OMe, y R₂' = OMe.

5. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por la Fórmula IV; y

15 R = H, R₁ = Me, R₂ = H, y R₁' y R₂' juntos forman la unión -O-CH₂-O-para formar un 1,3-benzodioxol, o R = H, R₁ = Me, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = NMe₂.

6. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

el compuesto aromático in el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por la Fórmula VII; y

20 R = OMe, R₁ = H, R₂ = O-alquilo, R₁' = OH, y R₂' = H.

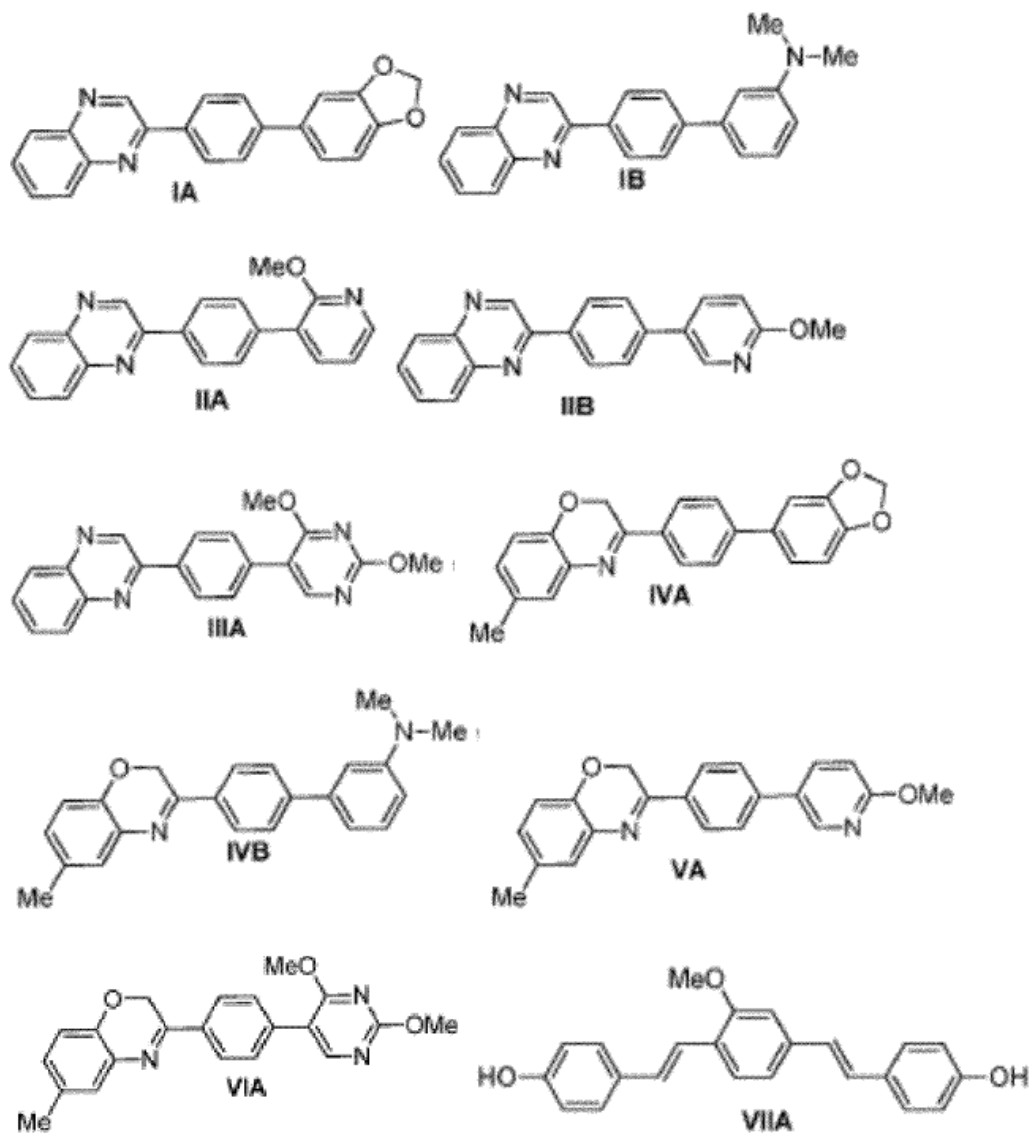
7. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

el compuesto aromático en el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por uno de:

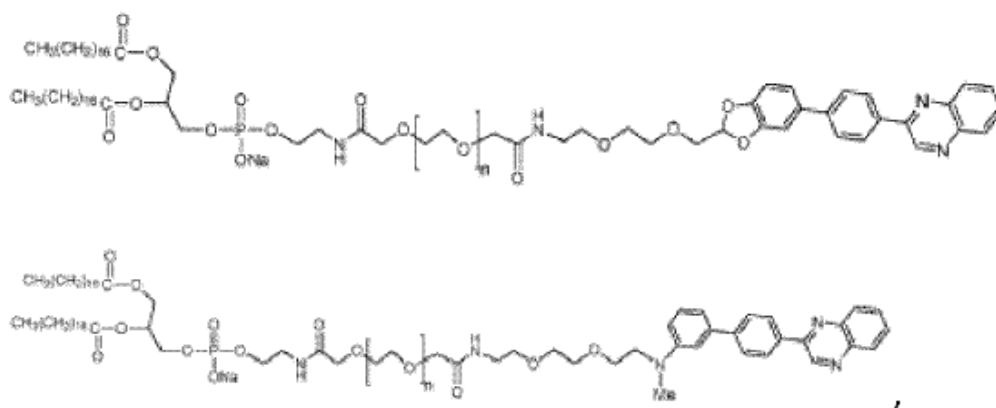
25 Fórmula V y R = H, R₁ = Me, R₂ = H, R₁' = H, y R₂' = OMe; o Fórmula VI y R = H, R₁ = Me, R₂ = H, R₁' = OMe, y R₂' = OMe.

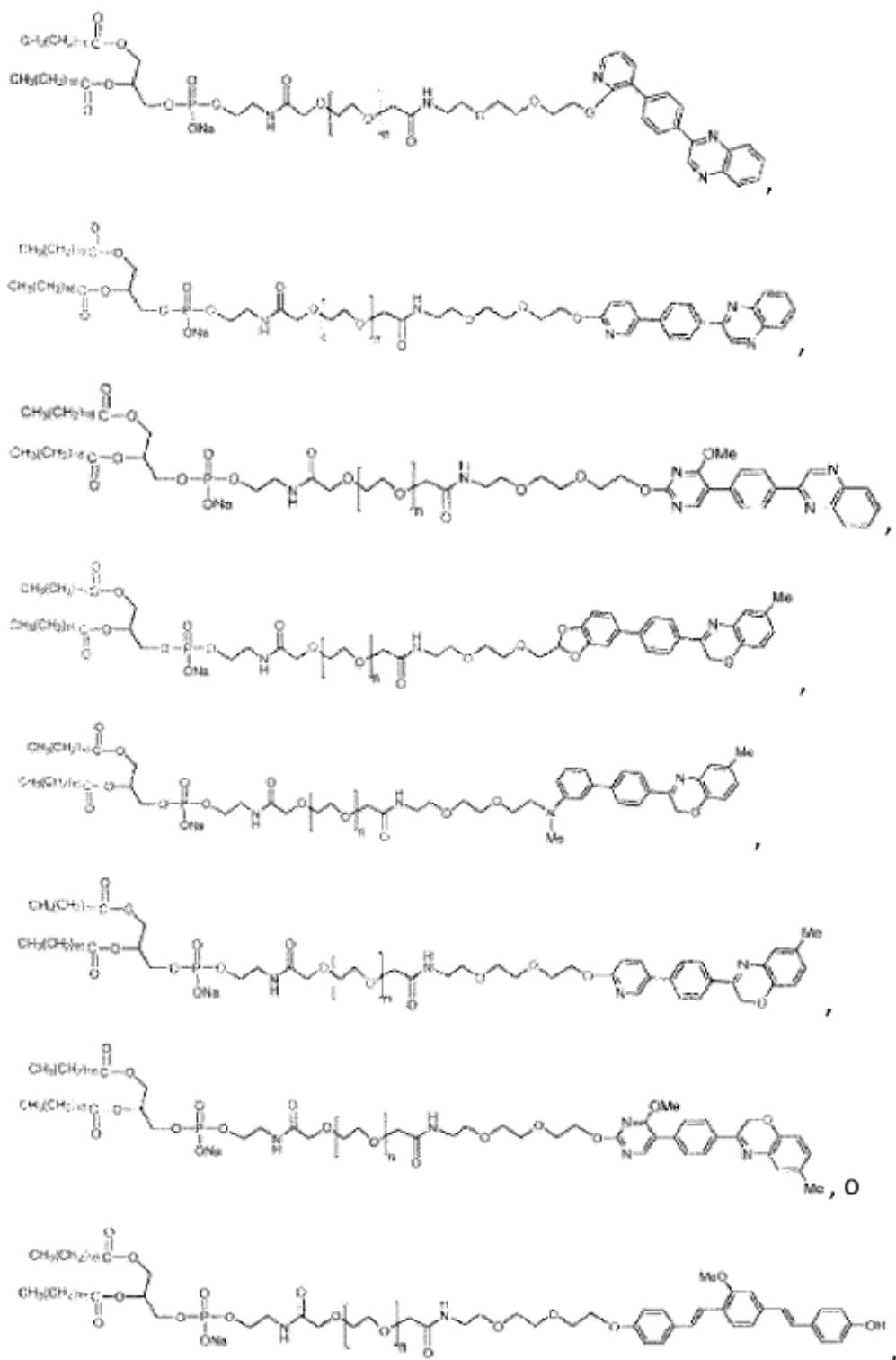
8. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que:

el compuesto aromático in el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático está representado por una de las fórmulas IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IVA, IVB, VA, VIA, o VIIA:



9. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático comprende una de:





donde n es 10 a 100.

10. La composición liposómica de la reivindicación 9, en la que n es aproximadamente 30 a aproximadamente 60.

5 11. La composición liposómica de la reivindicación 1, en la que el agente potenciador de contraste MRI no radiactivo comprende gadolinio.

12. Un procedimiento para examinar por imágenes depósitos amiloide en un paciente, el procedimiento que comprende:

introducir en el paciente una cantidad detectable de una composición liposómica que comprende:

una membrana, que comprende:

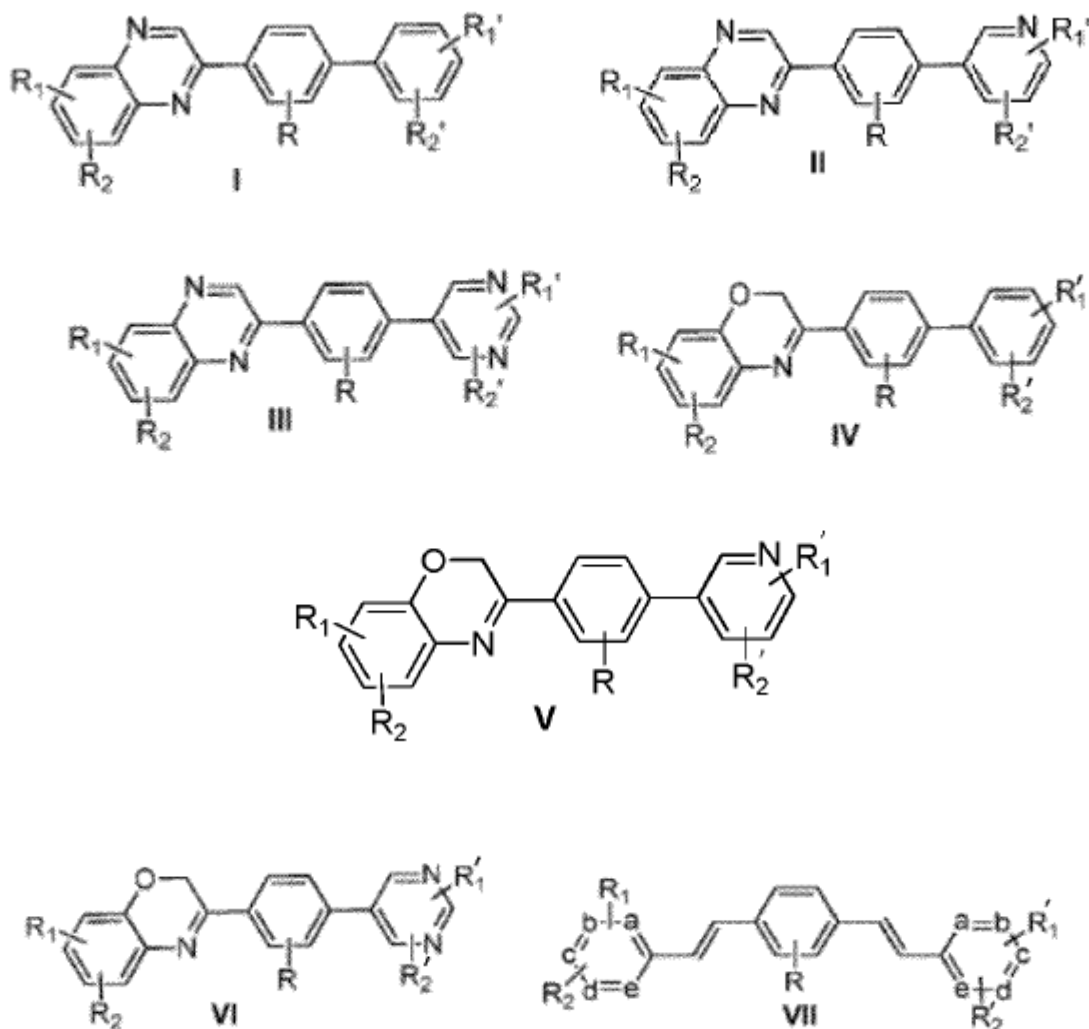
5 un primer fosfolípido;

colesterol;

un segundo fosfolípido, el segundo fosfolípido derivatizado con un polímero; y

un tercer fosfolípido, el tercer fosfolípido es un conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático, el compuesto aromático in el conjugado de fosfolípido-polímero-compuesto aromático que está representado por una

10 de las fórmulas I, II, III, IV, V, VI, o VII:



en las que:

15 R, R₁, R₂, R₁', y R₂' son de modo independiente H, F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, OH, O-alquilo, O-arilo, NH₂, NH-alquilo, N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamóilo, o glicosilo; y

a, b, c, d, e son de modo independiente C, N, O, o S; y

un agente potenciador de contraste resonancia magnética (MRI) no radiactivo al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana;

dejar suficiente tiempo para que la composición liposómica se asocie con uno o más depósitos amiloides; y
detectar la composición liposómica asociada con los uno o más depósitos amiloides.

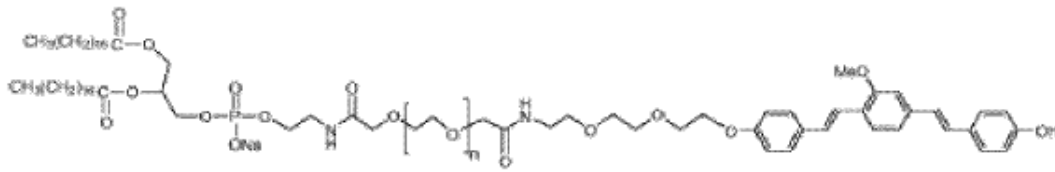
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el agente potenciador de contraste MRI no radiactivo comprende gadolinio.

5 14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la detección comprende la detección usando la imagen de resonancia magnética.

15. Una composición liposómica para capturar imágenes de depósitos amiloides en el cerebro del paciente, la composición liposómica que comprende:

DPPC;

10 colesterol; DSPE-mPEG-2000; y



en la que: n es 10 a 100; y

Gd-DTPA-BSA.

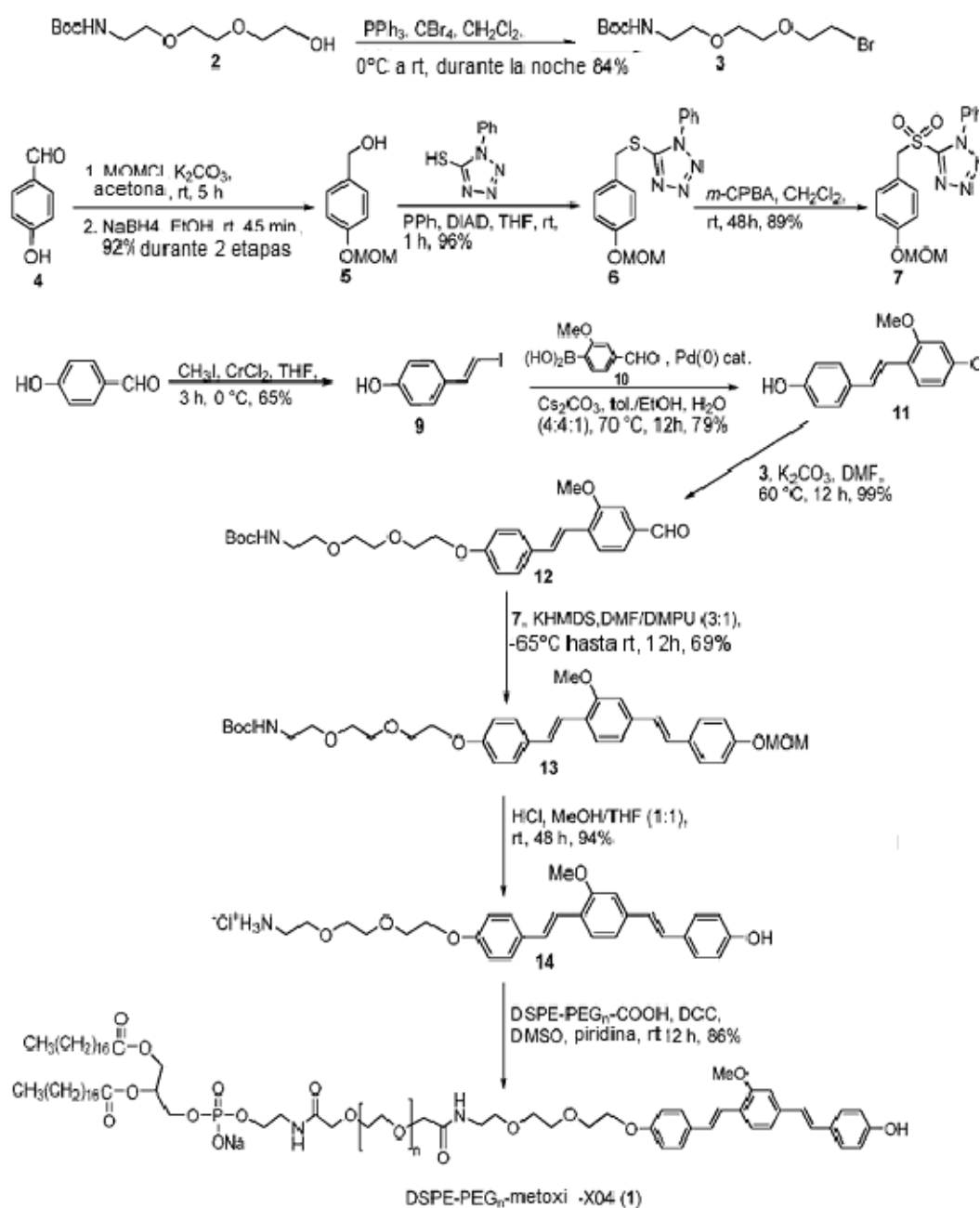
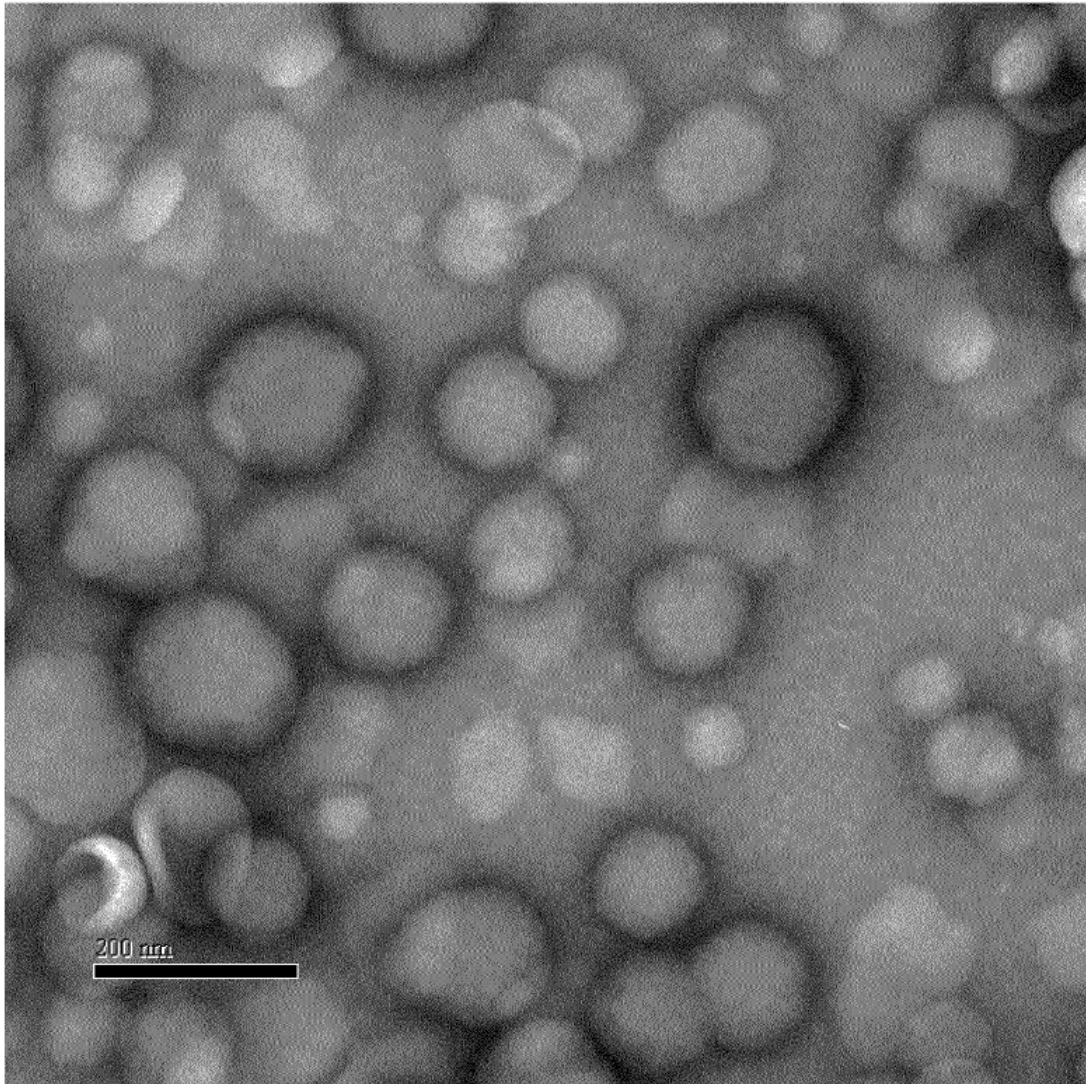


Figura 1



Espécimen: Muestra 1 UA 3 lavados 3 min de Incb 1 a 60 TNC 20K-3

Operador:

Nombre de imagen: Marco Fecha de adquisición:
2/23/2011

Voltaje: 80 kV

Tiempo de adquisición: 12:22:09 PM

Nombre del microscopio:

Tiempo de exposición 0,8 s

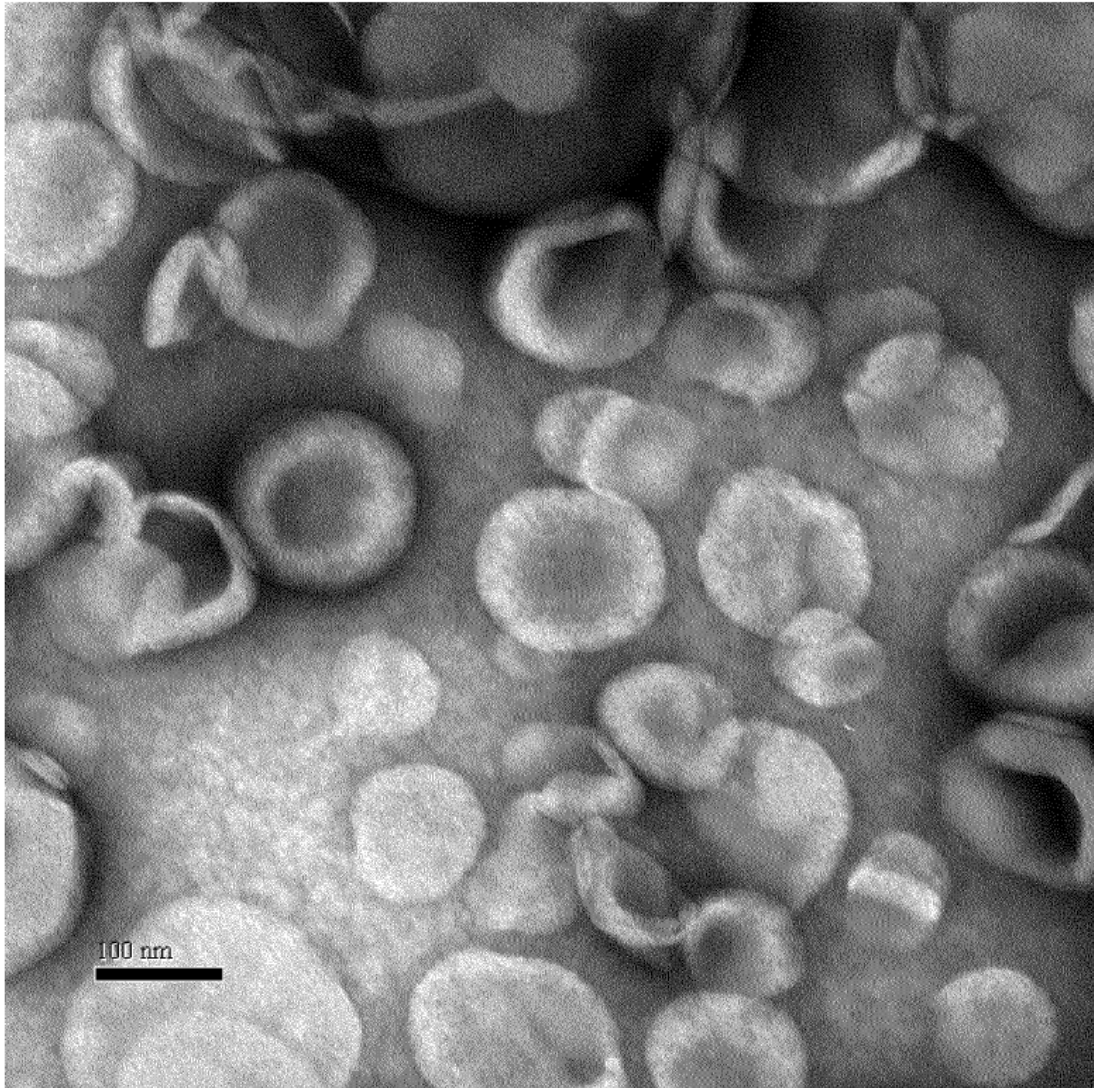
Nombre del dispositivo: US1000 3

Notas de imagen:

Aumento total: X179566

Aumento indicado: X20000

Figura 1A



Espécimen: Smp12 UA fresco, 3 lavados, 2 min Incb 1 a 6° TNC bajo G25K-3

Operador:

Nombre de imagen: Marco

Voltaje: 80 kV

Fecha de adquisición: 2/23/2011

Nombre del microscopio:

Tiempo de adquisición: 1:13:56 PM

Nombre del dispositivo: US1000 3

Tiempo de exposición 1,0 s

Aumento total: K222956

Notas de imagen:

Aumento indicado: X25000

Figura 1B

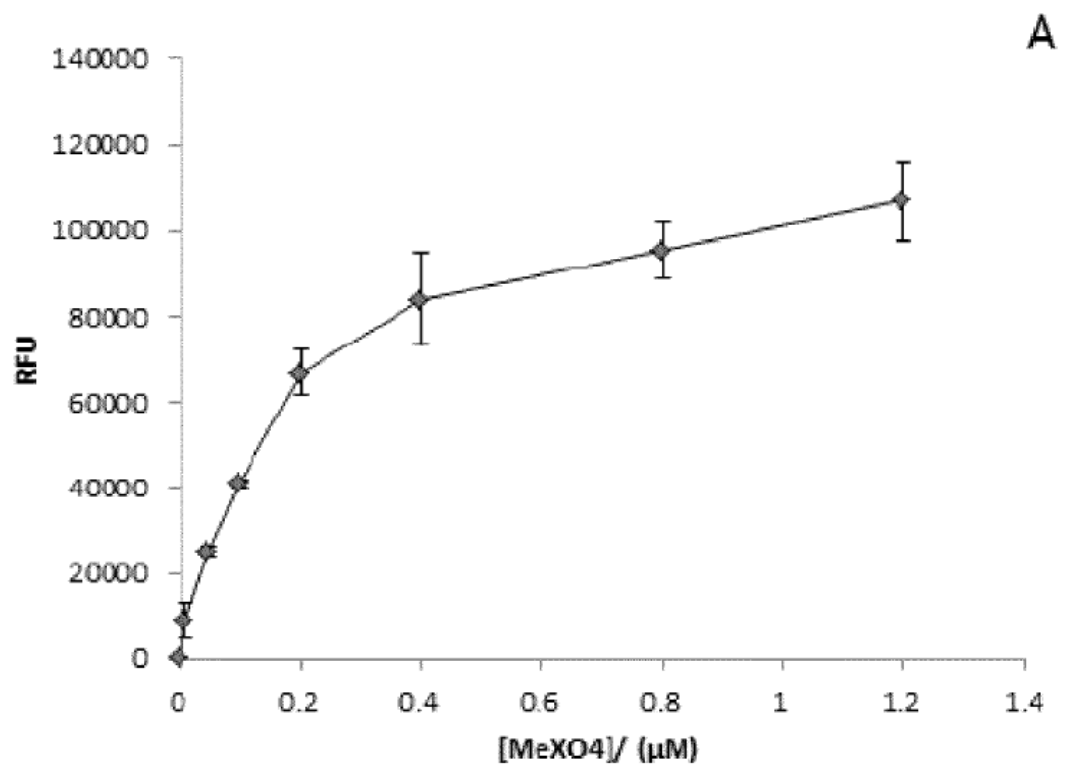


Figura 2A

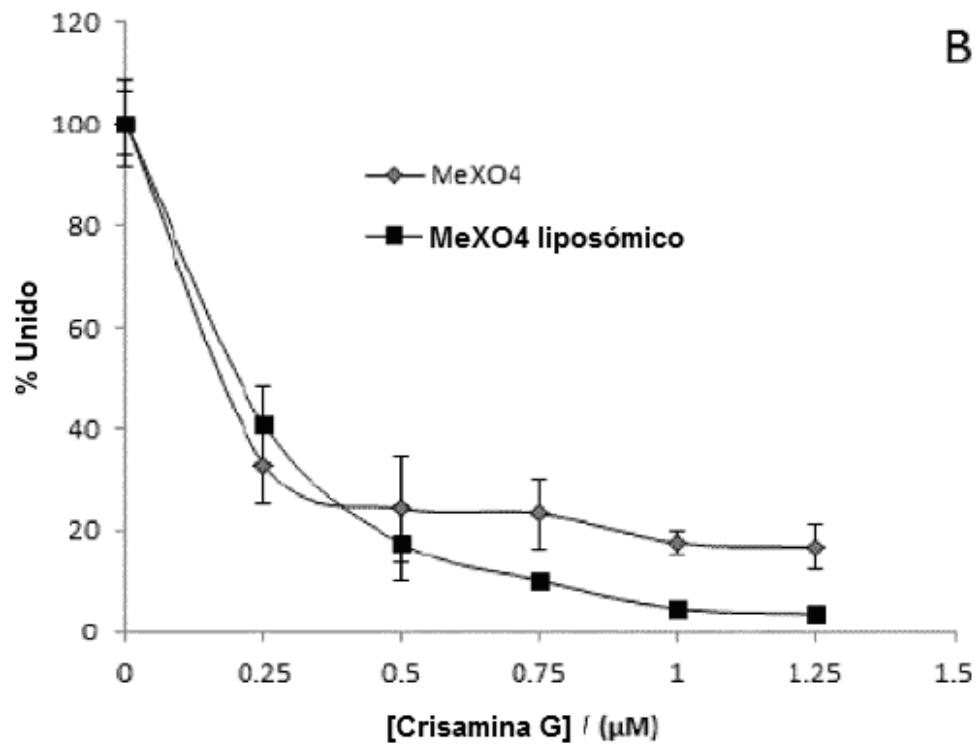


Figura 2B

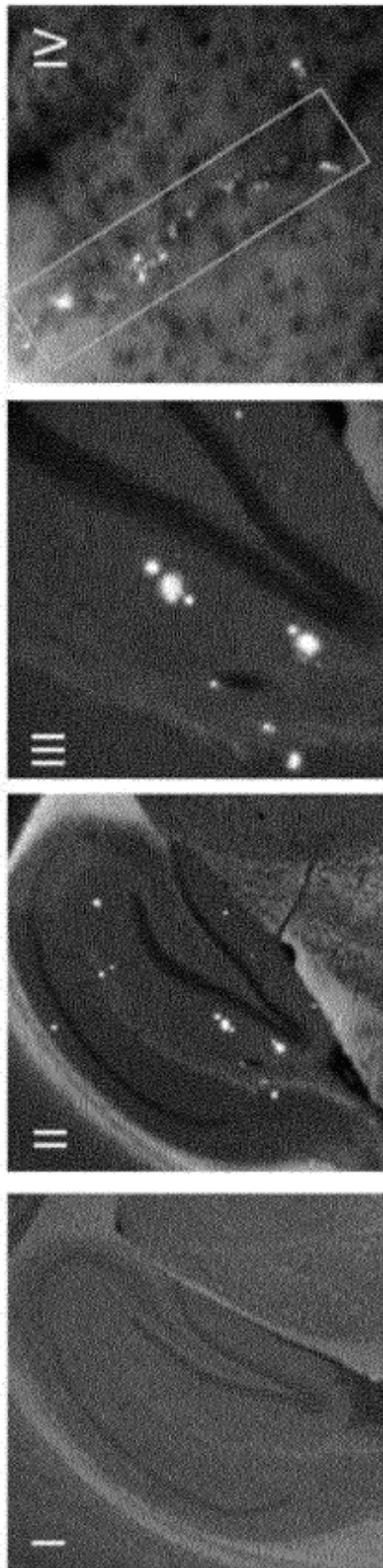


Figura 3

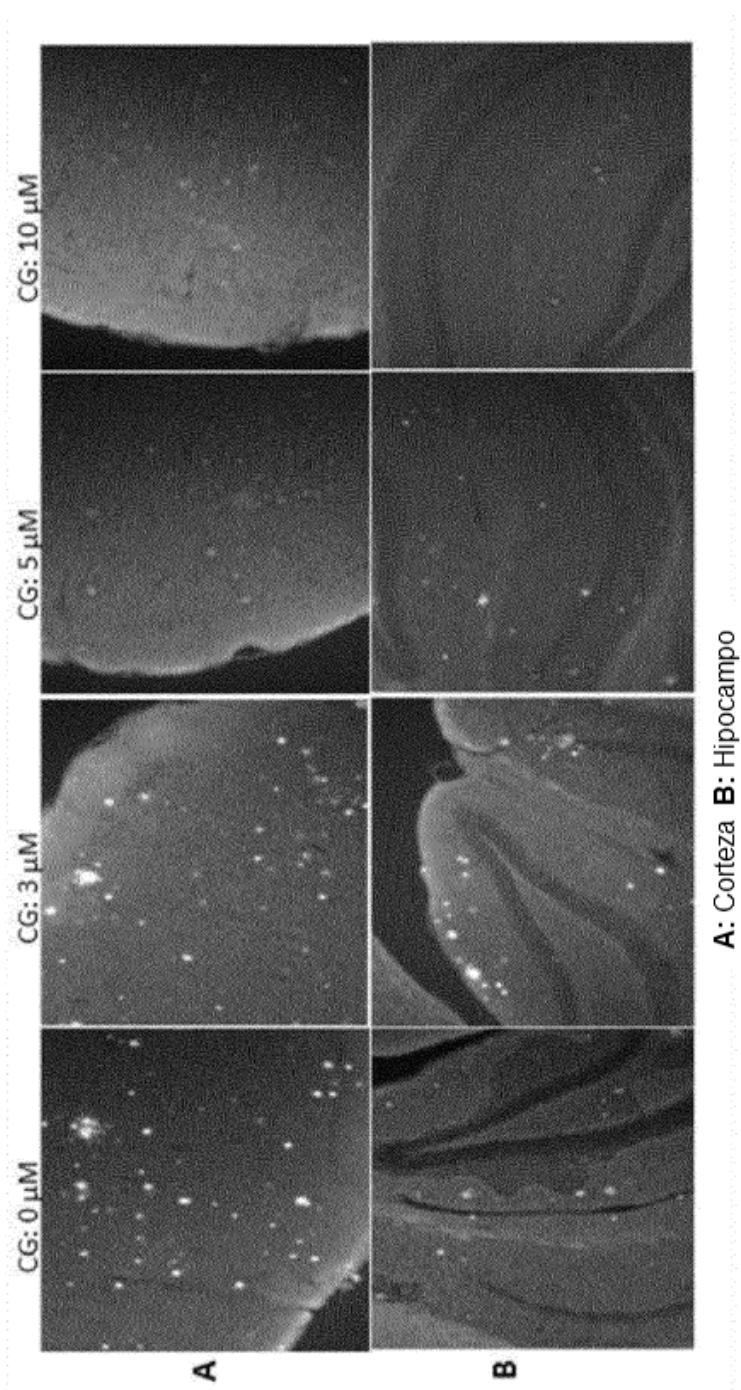


Figura 4

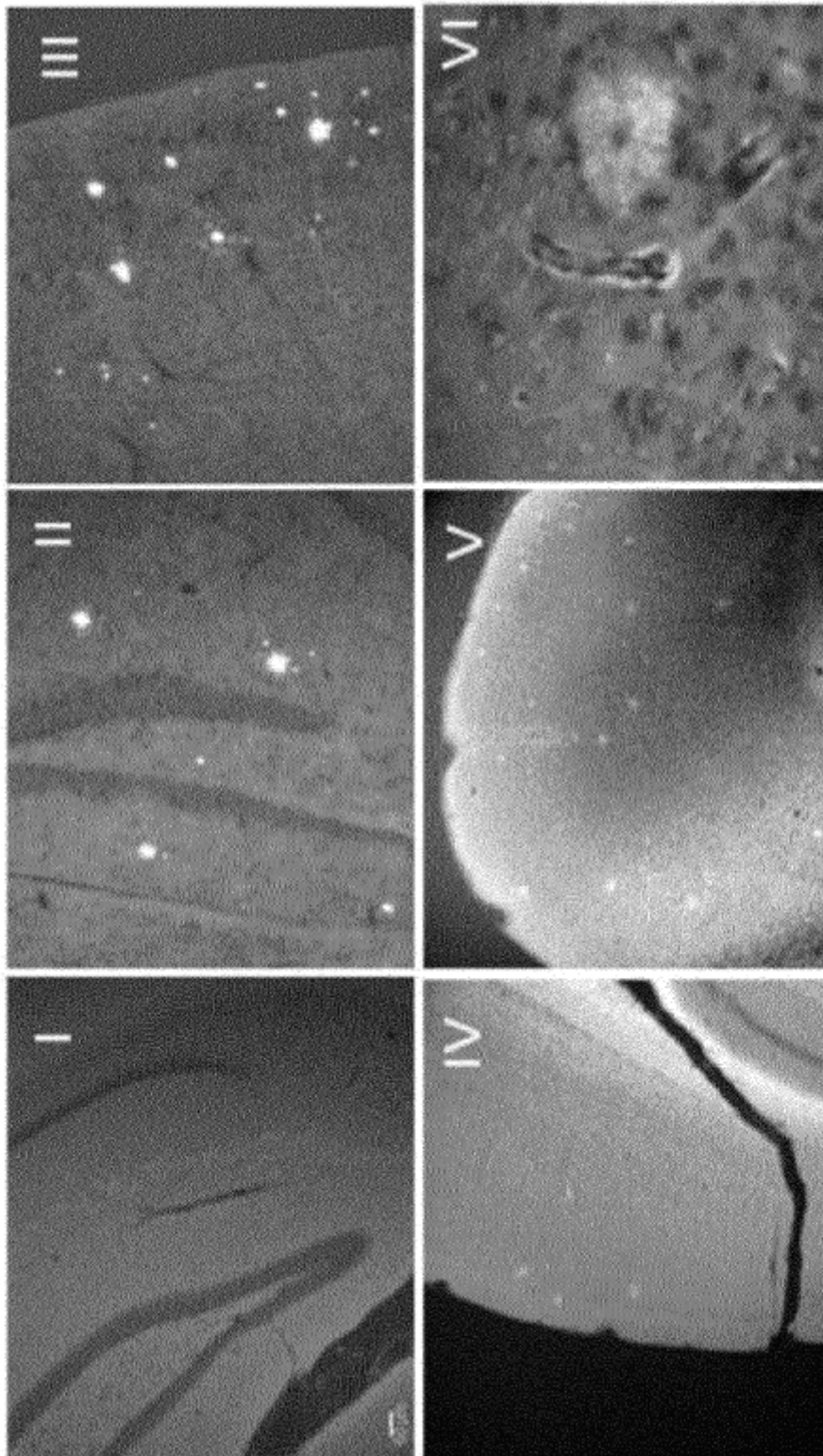


Figure 5

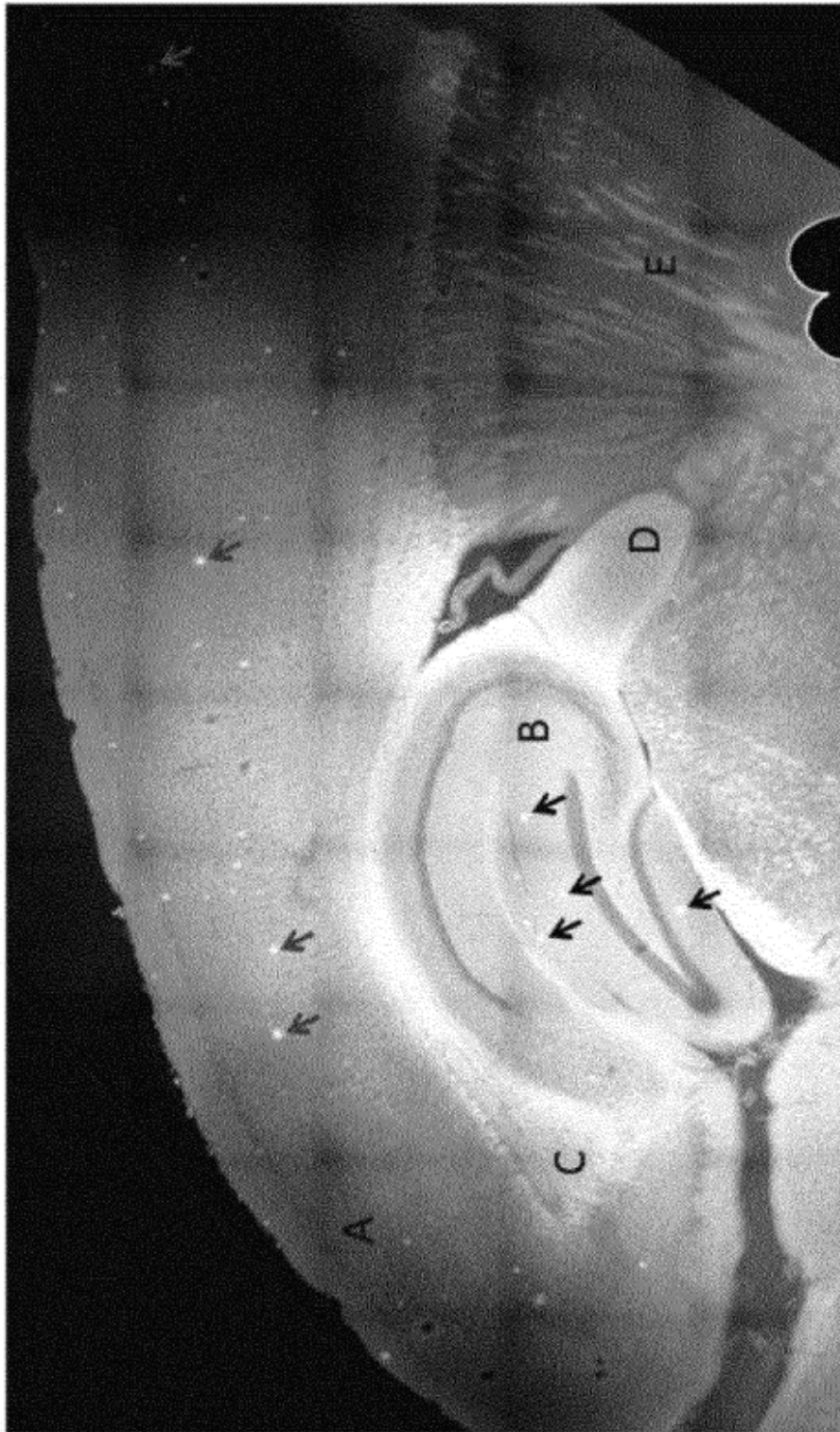


Figura 6

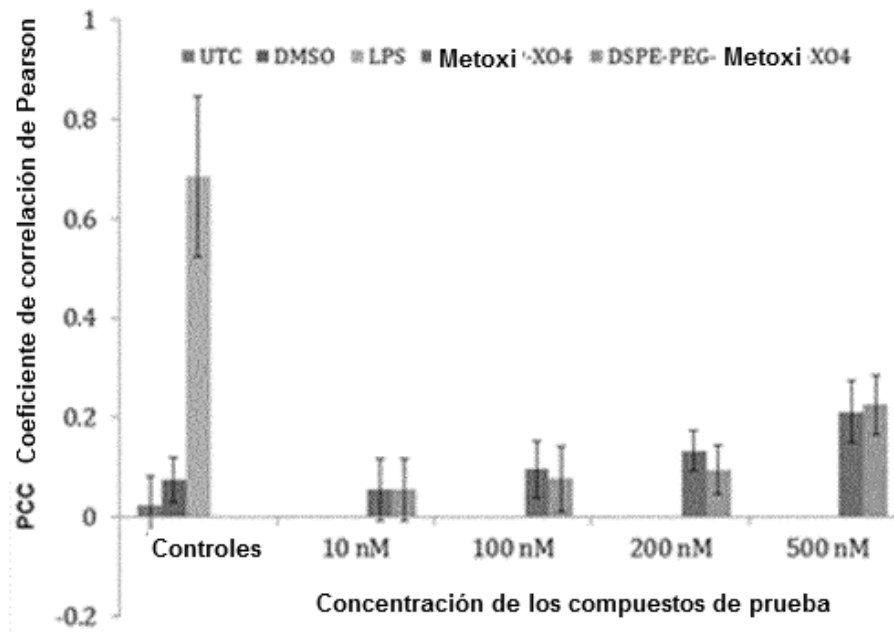


Figura 7

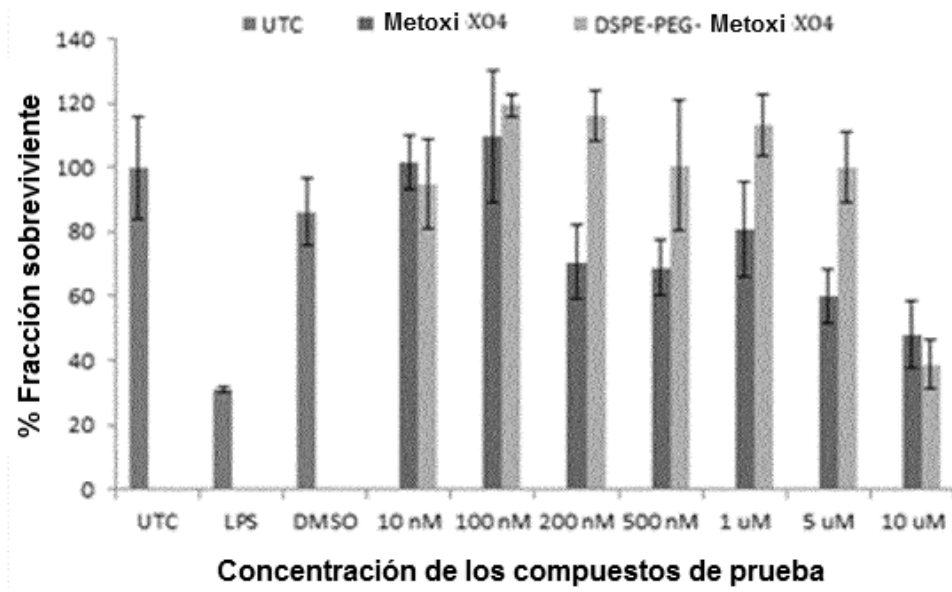


Figura 8

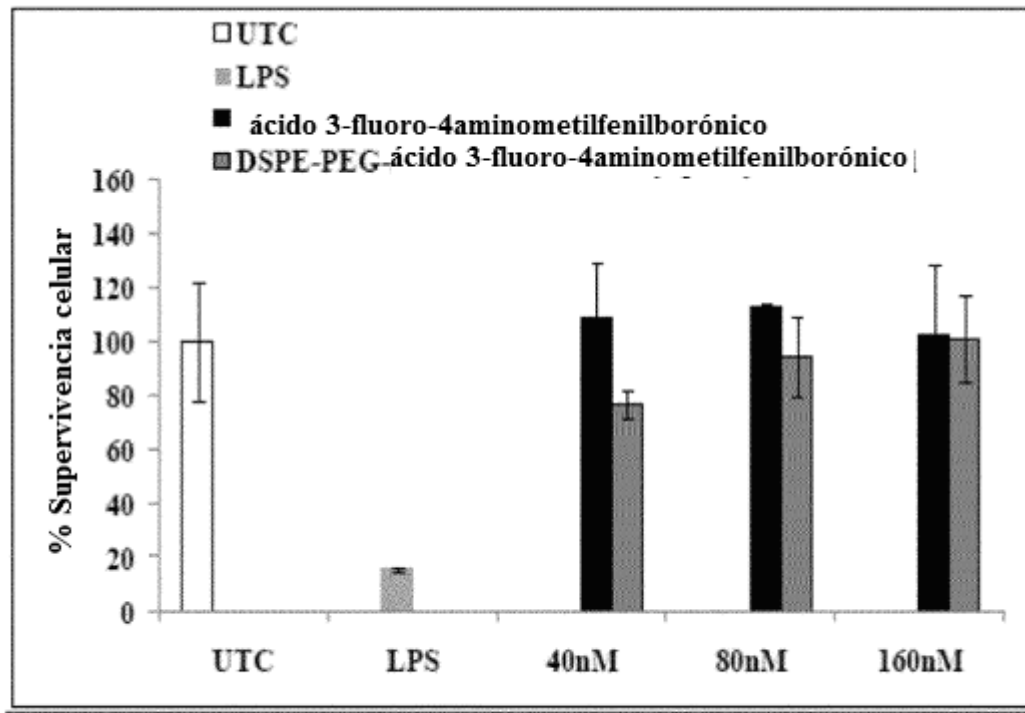


Figura 9A

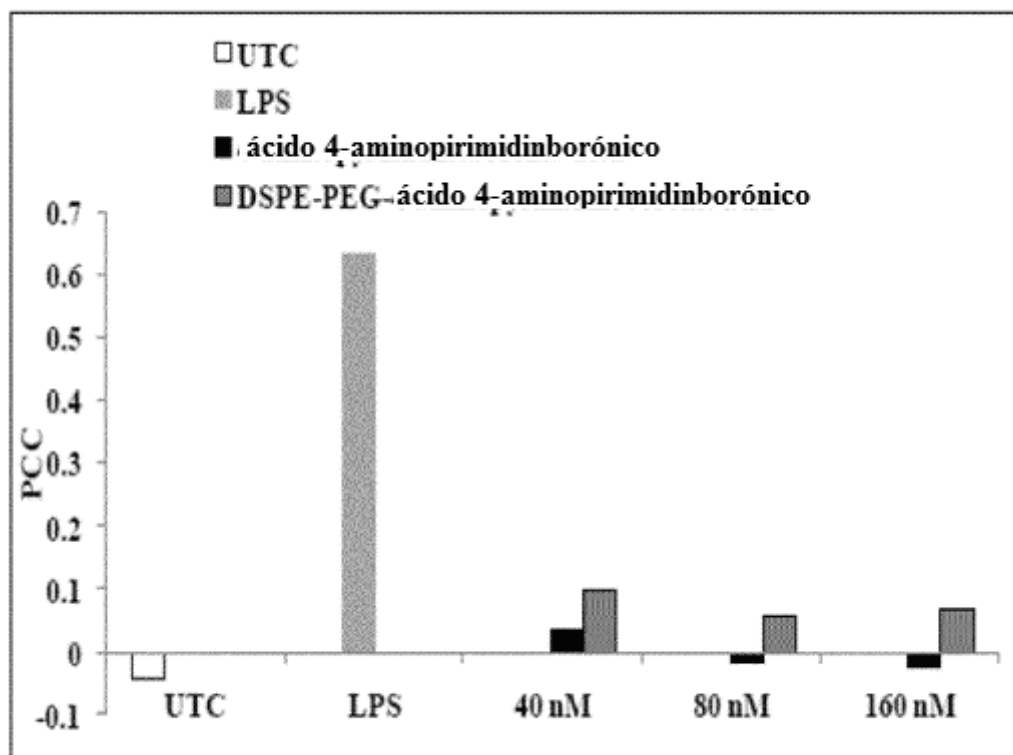


Figura 9B