

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 704**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849750 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3204051**

54 Título: **Obtención de imágenes de IRM de la placa amiloide usando liposomas**

30 Prioridad:

08.10.2014 US 201462061514 P
02.02.2015 US 201562111057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

TEXAS CHILDREN'S HOSPITAL (25.0%)
1919 S. Braeswood Blvd.
Houston, TX 77030, US;
ANNAPRAGADA, ANANTH (25.0%);
TANIFUM, ERIC A. (25.0%) y
SRIVASTAVA, MAYANK (25.0%)

72 Inventor/es:

ANNAPRAGADA, ANANTH;
TANIFUM, ERIC A. y
SRIVASTAVA, MAYANK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 743 704 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

Obtención de imágenes de IRM de la placa amiloide usando liposomas

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad de las solicitudes provisionales de patente de EE.UU. N.º 62/061.514, presentada el 8 de octubre de 2014 y 62/111.057, presentada el 2 de febrero de 2015.

10 Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer ("EA") es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida de memoria y otros déficits cognitivos. La EA es la forma más común de demencia y afecta a una de cada ocho personas mayores de 65 años y una de cada dos mayores de 85 años. La EA es la sexta causa principal de muerte en los Estados Unidos. Más de 5,5 millones de americanos padecen EA, con un coste anual estimado de 200 mil millones de dólares. Para 2050, se proyecta que la EA afectará a más de 20 millones de americanos a un precio anual de 1,1 billones de dólares (en dólares de 2011). Alrededor del mundo, las cifras estimadas para el año 2011 fueron de más de 37 millones de víctimas, a un coste asociado de más de 600 mil millones (dólares).

20 Se necesitan pruebas de diagnóstico eficaces para la EA en el campo. Actualmente, la EA generalmente se diagnostica de manera concluyente mediante análisis histopatológico postmortem. El diagnóstico en sujetos vivos se basa principalmente en pruebas psiquiátricas para detectar el deterioro cognitivo. Sin embargo, las principales características neuropatológicas distintivas de la EA, los depósitos de placa amiloide- β ("A β ") extracelular y los ovillos neurofibrilares intracelulares, se manifiestan mucho antes de que los síntomas clínicos sean discernibles. Los depósitos de A β también representan un factor de riesgo importante para el accidente cerebrovascular hemorrágico.

Recientemente, la FDA ha aprobado dos agentes de obtención de imágenes de tomografía por emisión de positrones (TEP) que se unen específicamente a las placas amiloides y pueden usarse para la detección de placas amiloides. Sin embargo, su resolución espacial está limitada por la de la modalidad de la TEP, y es del orden de 5-10 mm, lo que limita cualquier información específica de la anatomía disponible en la imagen. La generación de imágenes por TEP también requiere el uso de radioisótopos, y conlleva el riesgo de radiación significativa: se estima que un escaneo de las placas amiloides expone al paciente a aproximadamente 7 mSv de dosis de radiación, aproximadamente equivalente a varios escaneos de TC, ya que una TC normal de la cabeza puede ser de aproximadamente 2 mSv. La disponibilidad de agentes radiactivos de TEP también sigue siendo un desafío, debido a su corta semivida. La detección simultánea de un factor afín, como los ovillos de tau, podría mejorar la especificidad de una prueba de diagnóstico, y actualmente se están desarrollando varios agentes de imagen de TEP para la detección de tau. Sería de interés significativo un agente no radiactivo de obtención de imágenes de placas amiloides, que aborde tanto los desafíos de distribución como los problemas de dosis de radiación con los agentes de obtención de imagen TEP actuales, y en combinación con un agente de imagen de tau, que posiblemente constituyese un diagnóstico para la EA.

Algunos esfuerzos previos para desarrollar un agente no radiactivo de IRM dirigido a las placas amiloide se han centrado principalmente en el protón T2 (utilizando las relajividades de T2 de las nanopartículas de óxido de hierro) o la generación de imágenes por ^{19}F (utilizando altas proporciones de señal frente a ruido alcanzables debido a la ausencia de señal F endógena). Las altas relajividades de T2 llevan a la supresión de la señal general, haciendo que la detección y diferenciación de las regiones hipointensas inherentes sea un desafío, y la cuantificación de las imágenes no sea fiable. Además, la ausencia de flúor endógeno visible por RM también significa que no hay señal anatómica en la imagen por ^{19}F .

50 Otro trabajo previo demostró que los liposomas dirigidos a la placa amiloide por el análogo de tioflavina Metoxi-XO4, penetró la barrera hematoencefálica (BHE), y se unió con éxito a la mayoría de las placas amiloides en el modelo de EA en ratón APP/PSEN1. Los ligandos de unión a placas amiloides existentes, incluyendo metoxi-XO4 son, sin embargo, hidrófobos. En formulaciones liposomales, interfieren con la bicapa lipídica. Cuando se cargan con quelatos de Gd para el contraste por IRM de T1, los liposomas dirigidos con metoxi-XO4 eran inestables al gradiente osmótico creado por la alta concentración interna de quelato de Gd y se desestabilizaron.

El documento US201225 8044 describe composiciones de nanopartículas a base de lípidos, que pueden ser útiles para la obtención de imágenes y/o el tratamiento de los depósitos de placa amiloide- β característicos de la enfermedad de Alzheimer.

60 La presente solicitud aprecia que la detección de depósitos amiloides puede ser una labor difícil.

Sumario

65 El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo de un ser humano o un animal se refiere a los compuestos y composiciones

de la presente invención para su uso en dichos métodos. La presente divulgación proporciona una composición liposomal. La composición liposomal puede incluir una membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser $-R^2-O-$ o $-R^2-N(R^3)-$. R^1 puede ser alquilo o alqueno C_2-C_6 . R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alqueno o alcoxialqueno. R^3 puede ser hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxialquilo C_1-C_6 . Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I puede estar sustituido. Por ejemplo, R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C_1-C_6 e hidroxialquilo C_1-C_6 . Ar, Het, R^1 y R^3 distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; $-OH$; alquilo, $-O$ -alquilo, arilo, $-O$ -arilo u $-(O$ -alqueno) $_{1-6}$ opcionalmente sustituido con $-OH$ o halógeno; $-NH_2$; $-NH$ -alquilo; $-N$ -dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

Se divulga una composición liposomal para su uso en un método para la formación de imágenes de depósitos amiloideos en un sujeto. El método puede incluir introducir dentro del sujeto una cantidad detectable de una composición liposomal. El método puede incluir permitir tiempo suficiente para que la composición liposomal se asocie con uno o más depósitos amiloideos. El método puede incluir detectar la composición amiloide asociada con el uno o más depósitos amiloideos. La composición liposomal del método puede incluir una membrana. Un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo puede estar al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula I;



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser $-R^2-O-$ o $-R^2-N(R^3)-$. R^1 puede ser alquilo o alqueno C_2-C_6 . R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alqueno o alcoxialqueno. R^3 puede ser hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxialquilo C_1-C_6 . Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C_1-C_6 e hidroxialquilo C_1-C_6 . Ar, Het, R^1 y R^3 distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; $-OH$; alquilo, $-O$ -alquilo, arilo, $-O$ -arilo u $-(O$ -alqueno) $_{1-6}$ opcionalmente sustituido con $-OH$ o halógeno; $-NH_2$; $-NH$ -alquilo; $-N$ -dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

Se divulga un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser R^2-O- o $-R^2-N(R^3)-$, R^1 puede ser alquilo o alqueno C_2-C_6 , R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alquilo o alcoxialquilo. R^1 puede ser hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxialquilo C_1-C_6 . Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C_1-C_6 e hidroxialquilo C_1-C_6 . Ar, Het, R^1 y R^3 distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; $-OH$; alquilo, $-O$ -alquilo, arilo, $-O$ -arilo u $-(O$ -alqueno) $_{1-6}$ opcionalmente sustituido con $-OH$ o halógeno; $-NH_2$; $-NH$ -alquilo; $-N$ -dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

Se divulga un compuesto representado por la fórmula estructural II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el compuesto representado por la fórmula II, R^1 puede ser alquilo o alqueno C_2-C_6 . R^5 puede ser hidrógeno, hidroxilo, $H-R^2-$, $HO-R^2-$, $H-R^2-N(R^3)-$ o $HO-R^2-N(R^3)-$, R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alqueno o alcoxialqueno. R^3

puede ser hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxialquilo C₁-C₆. Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el compuesto representado por la fórmula estructural II puede estar sustituido. Por ejemplo, R² puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C₁-C₆ e hidroxialquilo C₁-C₆. Ar, Het, R¹ y R³ distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; -OH; alquilo, -O-alquilo, arilo, -O-arilo u -(O-alquileo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH o halógeno; -NH₂; -NH-alquilo; -N-dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

Se divulga un kit para formación de imágenes de depósitos amiloideos en un sujeto. El kit puede incluir instrucciones y una composición liposomal. Las instrucciones pueden dirigir a un usuario para introducir dentro del sujeto una cantidad detectable de la composición liposomal. Las instrucciones pueden dirigir al usuario para permitir tiempo suficiente para que la composición se asocie con uno o más depósitos amiloideos. Las instrucciones pueden dirigir al usuario para detectar la composición liposomal asociada con el uno o más depósitos amiloideos. La composición liposomal del kit puede incluir una membrana. Un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo puede estar al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser -R²-O- o -R²-N(R³)-. R¹ puede ser alquilo o alquileo C₂-C₆. R² puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R² pueden incluir uno de: alquileo o alcoxialquileo. R⁵ puede ser hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcoxialquilo C₁-C₆. Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R² puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C₁-C₆ e hidroxialquilo C₁-C₆. Ar, Het, R¹ y R³ distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; -OH; alquilo, -O-alquilo, arilo, -O-arilo u -(O-alquileo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH o halógeno; -NH₂; -NH-alquilo; -N-dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

Breve descripción de los dibujos

Se dan figuras adjuntas, fórmulas químicas estructuras químicas y datos experimentales que, junto con la descripción detallada que se proporciona a continuación, describe realizaciones ejemplares de la presente divulgación o invención.

La FIG. 1A es una tabla que muestra los valores de CLogP y las estructuras para varios compuestos.

La FIG. 1B es una tabla que muestra los valores de CLogP y las estructuras para varios compuestos.

La FIG. 1C es una tabla que muestra los valores de CLogP y las estructuras para varios compuestos.

La FIG. 2 es un perfil de unión que muestra el enlace del Compuesto ii a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a la concentración en μ M.

La FIG. 3 es un perfil de unión que muestra el enlace del Compuesto iii a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a la concentración en μ M.

La FIG. 4 es un perfil de unión que muestra el enlace de MeXO4 (un compuesto anterior) a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a la concentración en μ M.

La FIG. 5A es un gráfico que muestra que Compuestos ii y iii se unen a las fibrillas amiloides representado como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a concentración en μ M.

La FIG. 5B es un perfil de unión competitiva que muestra el enlace de los Compuestos ii y iii, cada uno unido de manera estable a las fibrillas en suspensión en competencia con Crisamina-G, representada como % unido frente a la concentración de crisamina-G en μ M.

La FIG. 5C es una imagen de microscopía fluorescente que muestra que el Compuesto iii tiñe de manera específica las placas amiloides en una sección de tejido cerebral humano de la corteza frontal de un caso de autopsia de EA.

La FIG. 5D es una imagen de microscopía fluorescente que muestra que el Compuesto iii marca la angiopatía amiloide cerebral en tejido cerebral de perro anciano.

La FIG. 6 es un perfil de unión competitiva que muestra el enlace del compuesto anterior MeXO4 y MeXO4 liposomal, cada uno a fibrillas en competencia con crisamina-G, representada como % unido frente a la concentración de crisamina-G en μ M.

La FIG. 7A es un gráfico de perfiles de unión a liposomas marcados con compuesto, que muestra la cantidad del conjugado de DSPE-PEG-Compuesto iii unida a 20 μ M de fibrillas, representada gráficamente frente a la concentración de DSPE-PEG-Compuesto iii en las composiciones de liposomas.

La FIG. 7B es un gráfico que muestra datos de unión de fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la constante de unión para el Compuesto ii a las fibrillas a $K_d = 5,0 \mu$ M.

La FIG. 7C es un gráfico que muestra datos de unión de fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la constante de unión para el Compuesto iii a las fibrillas a $K_d = 5,0 \mu$ M.

La FIG. 7D es un gráfico que muestra los datos de unión de fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la

constante de unión para liposomas que llevan DSPE-PEG-Compuesto iii a fibrillas a $K_d = 3,3 \mu\text{M}$.

La FIG. 8 es una tabla que muestra los diámetros medios y los índices de polidispersidad de los liposomas preparados con el ligando de direccionamiento MeXO4, el Compuesto iii, y liposomas PEGilados sin ligando.

La FIG. 9A muestra imágenes del MET de tinción negativa de liposomas con DSPE-PEG-XO4 en la bicapa.

La FIG. 9B muestra imágenes del MET de tinción negativa de liposomas con liposomas no dirigidos (estructura de bicapa idéntica, sin MeXO4).

La FIG. 10A es un gráfico de barras que muestra la alta relaxividad molar de Gd de los liposomas a baja intensidad de campo en comparación con un quelato de Gd libre.

La FIG. 10B es un gráfico que muestra que las partículas resultantes tienen una relaxividad extremadamente alta por partícula.

Las FIG. 11A-F son imágenes que muestran varios resultados de imágenes de amiloide ejemplares en modelos de ratón.

La FIG. 11A representa los resultados para un ratón TetO/APPswe-ind, de 15 meses de vida.

La FIG. 11B representa los resultados de una escaneo previo a la inyección del ratón de la FIG. 11A.

La FIG. 11C representa los resultados para un ratón Tg2576 (APPswe), de 9 meses de vida.

La FIG. 11D representa los resultados de un escaneo previo a la inyección del ratón de la FIG. 11C.

La FIG. 11E representa los resultados para un ratón Tg2576 inyectado con partículas no dirigidas (sin unión a amiloide).

La FIG. 11F representa los resultados para un hermano no transgénico del ratón de la FIG. 11E, inyectado con partículas direccionadas al amiloide.

La FIG. 12 es una tabla que muestra la puntuación de patología amiloide por inmunohistoquímica usando el anticuerpo 4G8, el agente de imagen utilizado (Compuesto iii direccionado o control no direccionado) y medidas individuales de presencia de nanopartículas en el cerebro del ratón.

Las FIG. 13A-13Z representan 13 pares de imágenes de IRM representativas de los datos resumidos en la FIG. 12.

La FIG. 13A y 13B son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP 5756, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13C y 13D son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP 7110, genotipo APP-, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13E y 13F son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP 5785, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13G y 13H son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP 5633, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13I y 13J son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP 6949, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13K y 13L son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP XX21, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13M y 13N son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa TetO/APP XXXX, genotipo APP-, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13O y 13P son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 (Control 1), genotipo APP-, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13Q y 13R son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 (Control 2), genotipo APP-, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13S y 13T son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 TG1, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13U y 13V son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 TG2, genotipo APP+, y partículas direccionadas al Compuesto iii.

La FIG. 13W y 13X son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 TG3, genotipo APP+, y partículas no dirigidas.

La FIG. 13Y y 13Z son imágenes de 3-4 días después y antes del contraste, respectivamente, para ratones de la cepa Tg2576 TG4, genotipo APP+, y partículas no direccionadas.

Las FIG. 14A-H4 muestran los resultados de imágenes de infrarrojo cercano de cerebros de ratones postmortem.

La FIG. 14A muestra imágenes confocales de secciones de cerebros de ratones Tg2576 con señal ICG mejorada en la corteza y el hipocampo de los ratones transgénicos, lo que demuestra una mayor localización en el cerebro APP+ en comparación con los controles no transgénicos (véase la FIG. 14B).

La FIG. 14B muestra imágenes confocales de secciones cerebrales de controles no transgénicos bajo las mismas condiciones de tratamiento y medición que la FIG. 14A.

La FIG. 14C es una imagen que muestra que los cerebros completos de los ratones TetO/APP+ demostraron una fluorescencia infrarroja cercana mayor que sus controles hermanos APP (véase la FIG. 14D).

La FIG. 14D son imágenes que muestran que los cerebros completos de los ratones TetO/APP+ mostraron una fluorescencia infrarroja cercana mayor que sus hermanos APP (véase la FIG. 14C).

La FIG. 14E es una versión de gran aumento de la FIG. 14A que muestra la característica estructura puntiforme de los depósitos amiloides.

La FIG. 14F es una versión de gran aumento de la FIG. 14B.

La FIG. 14G1-G4 son imágenes de colocalización de fluorescencia para un grupo de 3 placas.

La FIG. 14G1 (verde) muestra un anticuerpo 4G8 marcado con fluorescencia unido al grupo de 3 placas amiloides.

La FIG. 14G2 (rojo) muestra ICG unido al grupo de 3 placas amiloides.
 La FIG. 14G3 (azul) muestra el Compuesto iii unido al grupo de 3 placas amiloides.
 La FIG. 14G4 muestra una combinación de las FIG. 14G1, 14G2, y 14G3.
 La FIG. 14H1-H4 son imágenes de colocalización de fluorescencia para una sola placa.
 La FIG. 14H1 (verde) muestra un anticuerpo 4G8 marcado con fluorescencia unido a la placa única.
 La FIG. 14H2 (rojo) muestra ICG unido a la placa única.
 La FIG. 14H3 (azul) muestra el Compuesto iii unido a la placa única.
 La FIG. 14H4 muestra una combinación de las FIG. 14G1, 14G2y 14G3.

10 Descripción detallada

La invención reivindicada incluye una composición liposomal tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6. La invención reivindicada incluye además una composición liposomal para su uso en el método para formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente tal como se define en las reivindicaciones 7 a 13. La invención reivindicada también incluye un kit para la formación de imágenes de depósitos amiloides tal como se define en las reivindicaciones 14 a 15.

Se proporciona la siguiente divulgación.

20 En la presente divulgación se proporciona una composición liposomal. La composición liposomal puede incluir una membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser -R²-O- o -R²-N(R³)-. R¹ puede ser alquilo o alquenilo C₂-C₆. R² puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R² pueden incluir uno de: alquileo o alcóxialquileo. R³ puede ser hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcóxialquilo C₁-C₆. Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R² puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C₁-C₆ e hidroxialquilo C₁-C₆. Ar, Het, R¹ y R³ distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; -OH; alquilo, -O-alquilo, arilo, -O-arilo u -(O-alquileo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH o halógeno; -NH₂; -NH-alquilo; -N-dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamilo y glicosilo.

En varias realizaciones, se proporciona un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde las variables, por ejemplo, X, Ar, R¹, Het y similares pueden representar los mismos restos que en la fórmula estructural I de la composición liposomal o la fórmula estructural II del compuesto tal como se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto representado por la fórmula estructural II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde las variables, por ejemplo, Ar, R¹, Het, R⁵ y similares pueden representar los mismos restos que en la fórmula estructural I de la composición liposomal o la fórmula estructural I del conjugado fosfolípido-polímero-aromático descrito en el presente documento.

En la fórmula estructural II, R⁵ puede ser hidrógeno, hidroxilo, H-R²-, HO-R²-, H-R²-N(R³)- o HO-R²-N(R³)-. En algunas realizaciones, R⁵ puede ser hidroxilo, H-R²-, HO-R²-, H-R²-N(R³)- o HO-R²-N(R³)-. R⁵ puede ser H-R²-, HO-R²-, H-R²-N(R³)- o HO-R²-N(R³)-. R⁵ puede ser H-R²- o H-R²-N(R³)-. R⁵ puede ser HO-R²- o HO-R²-N(R³)-. R⁵ puede ser H-R²- o HO-R²-.

En diversas realizaciones de las fórmulas estructurales I y II, R¹ puede ser alquilo o alquenilo C₂. Por ejemplo, R¹ puede ser alquenilo C₂-C₆. R¹ puede ser alquenilo C₂-C₆ en una configuración *trans* o *cis*, por ejemplo, *trans*. R¹ puede ser *trans* 1,2-etenilo.

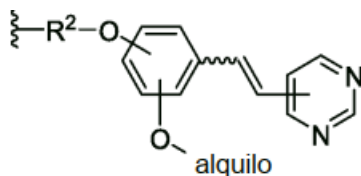
En algunas realizaciones de las fórmulas estructurales I y II, uno, dos, tres o cuatro átomos en el anillo de los anillos heteroaromáticos incluidos por Ar y Het pueden ser, cada uno independientemente, uno de: N, O o S. Por ejemplo, dos átomos en el anillo del anillo heteroaromático representado por Het pueden ser cada uno, uno de: N, O o S. Cada

uno de Het y/o Ar puede incluir al menos uno anillo heteroaromático seleccionado entre el grupo que consiste en: piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, tiofeno, furano, pirrol, tiazol, oxazol, diazol, tiadiazol, oxadiazol y triazol. Cada uno de Het y/o Ar puede incluir, por ejemplo, uno de: fenilo, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, tiofeno, furano, pirrol, tiazol, oxazol, diazol, tiadiazol, oxadiazol, triazol, benzofurano, indol, benzotiofeno, tienopirimidina, benzooxazol, benzotiazol, benzooxadiazol o benzotiadiazol. Por ejemplo, Het pueden incluir uno de: piridina, pirimidina, tienopirimidina o benzotiazol. Ar pueden incluir uno de fenilo o indol.

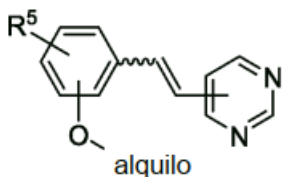
En diversas realizaciones de las fórmulas estructurales I y II, Ar y Het puede estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: F, Cl, Br, I, alquilo, arilo, -OH, -O-alquilo, -O-arilo, -NH₂, -NH-alquilo, -N-dialquilo, carboxilo, sulfonilo, carbamoilo y glicosilo.

En diversas realizaciones de las fórmulas estructurales I y II, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por -O-Ar-R¹-Het. El compuesto puede estar representado por H-O-Ar-R¹-Het. Het y/o Ar pueden estar sustituidos por -O-alquilo. Het y/o Ar pueden estar sustituidos por metoxi. Het puede ser monocíclico. Uno o dos átomos en el anillo del anillo heteroaromático incluido por Het pueden ser N.

En algunas realizaciones de la fórmula estructural I, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

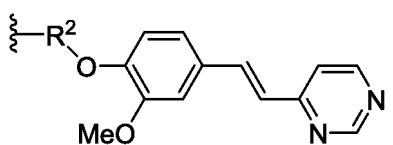


De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

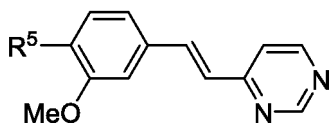


R⁵ puede ser H, hidroxilo, H-R²-, HO-R²-, H-R²-N(R³)- o HO-R²-N(R³)-.

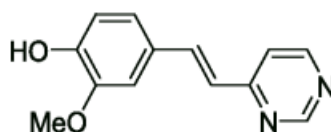
En algunas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

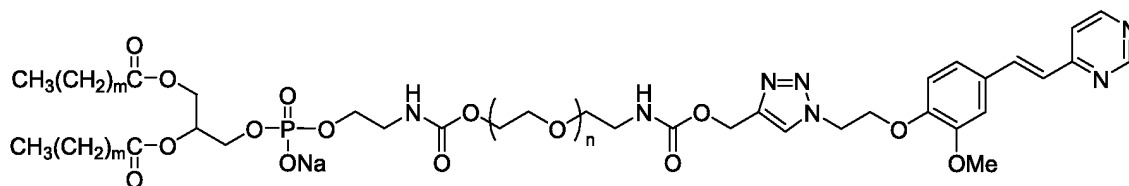


R⁵ puede ser H, hidroxilo, H-R²-, HO-R²-, H-R²-N(R³)- o HO-R²-N(R³)-. En algunas realizaciones, R⁵ puede ser hidroxilo. Por ejemplo, el compuesto puede ser:



Compuesto i

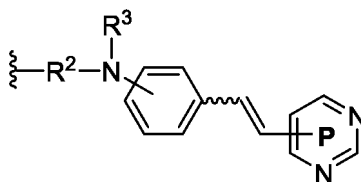
En varias realizaciones, el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



- 5 La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85, aproximadamente 77 y similares. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.
- 10 En diversas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por $-R^2-N(R^3)-Ar-R^1-Het$. Ar puede estar sin sustituir. Ar puede ser monocíclico. Ar pueden incluir un anillo aromático carbocíclico, por ejemplo, Ar puede ser un anillo fenilo. Ar puede ser indol. Por ejemplo, Ar puede ser 1,4-fenileno sin sustituir o 1,5-indolilo sin sustituir. Het puede ser monocíclico. Uno o dos átomos en el anillo del anillo heteroaromático incluido por Het pueden ser N. R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más -OH. R^3 puede ser alquilo C_1-C_6 sustituido con cero, uno o más de: -OH y alquilo opcionalmente sustituido con uno o más -OH. Por ejemplo, R^3 puede ser alquilo o hidroxialquilo C_1-C_3 .
- 15

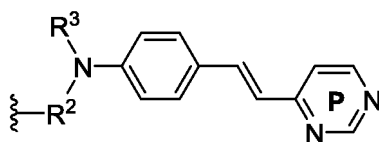
En algunas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

20



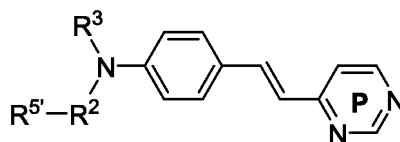
La pirimidina P puede estar sustituida con cero, uno o más de -OH, -O-alquilo y -NH₂. Por ejemplo, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

25



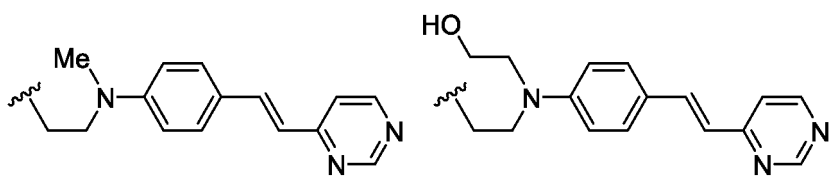
La pirimidina P puede estar sustituida con cero, uno o dos de -OH, -OMe y -NH₂. De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

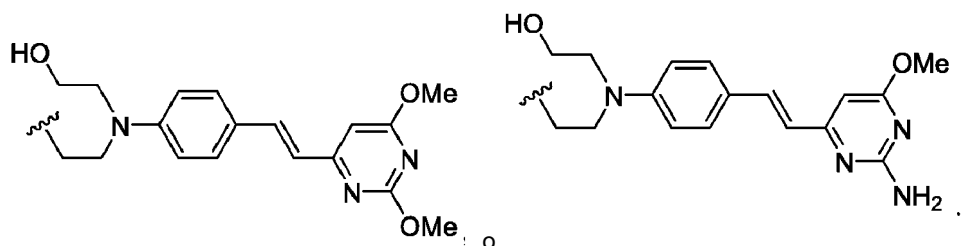
30



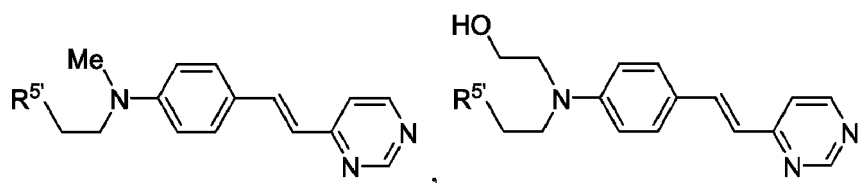
$R^{5'}$ puede ser hidrógeno o hidroxilo.

- 35 En varias realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por uno de:

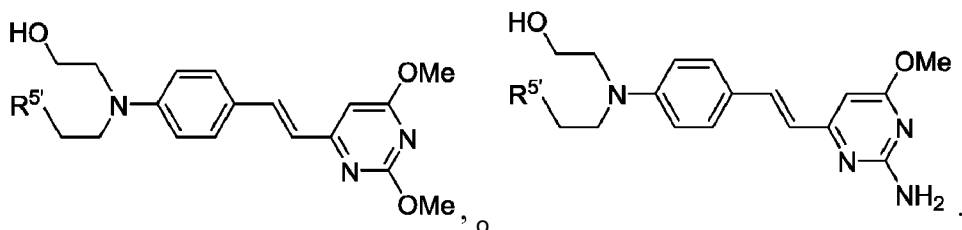




De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

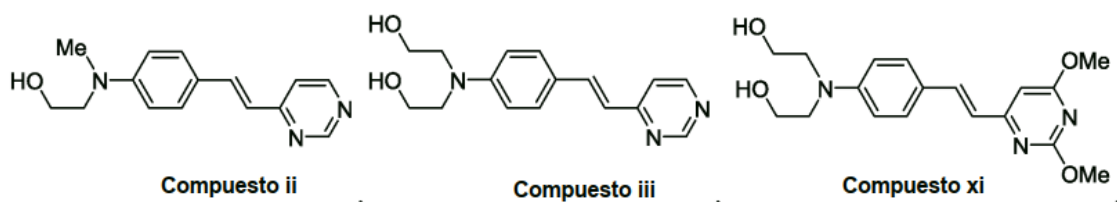


5

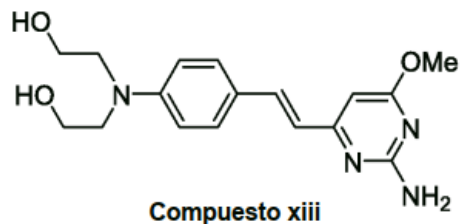


R^{5'} puede ser hidrógeno o hidroxilo. Por ejemplo, el compuesto puede ser uno de:

10

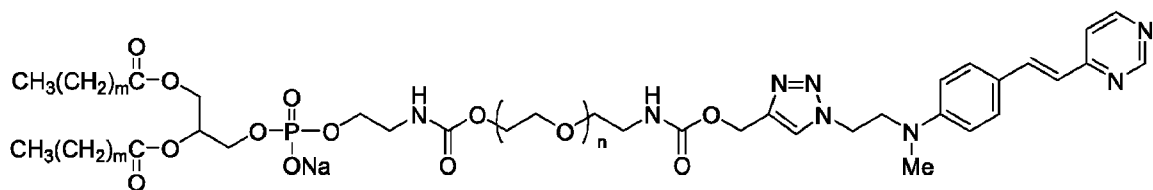


o

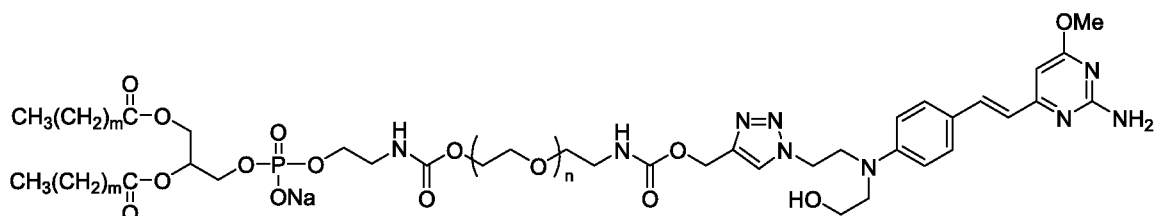
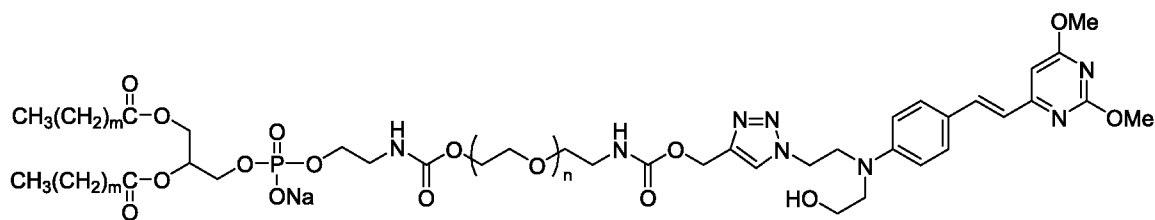
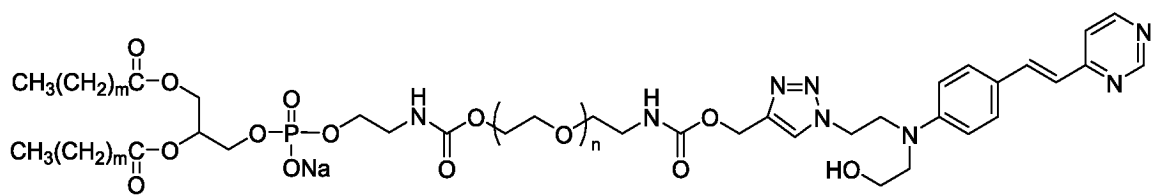


15

En diversas realizaciones, el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por uno de:



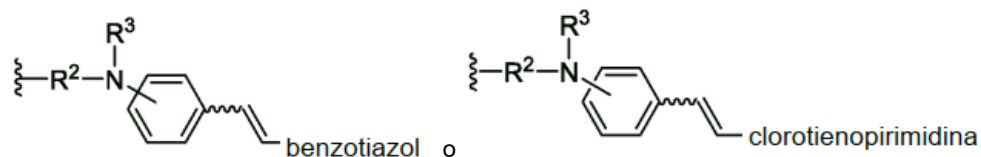
20



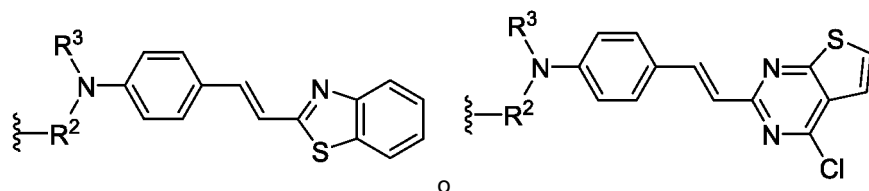
5 o

10 La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.

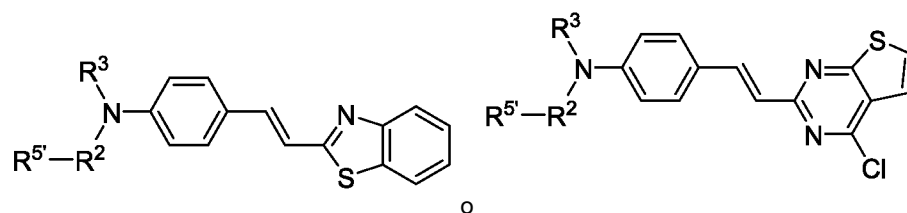
15 En algunas realizaciones, Het puede incluir un grupo heteroaromático bicíclico. Por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro átomos en el anillo del grupo heteroaromático bicíclico incluido por Het pueden ser cada uno, uno de: N, O o S. Por ejemplo, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



20 Además, por ejemplo, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



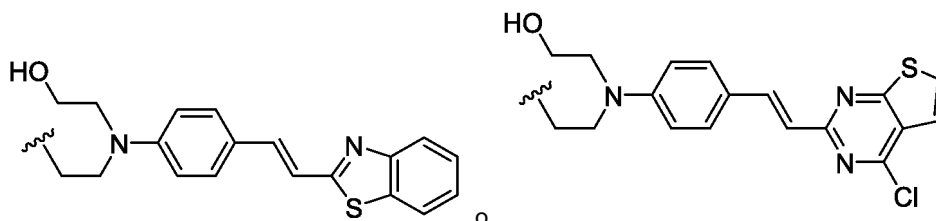
25 De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:



R^{5'} puede ser hidrógeno o hidroxilo.

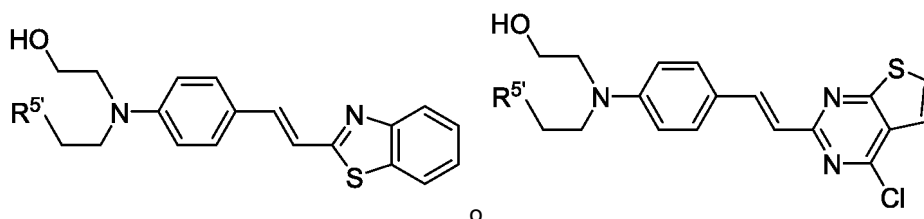
En varias realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

5

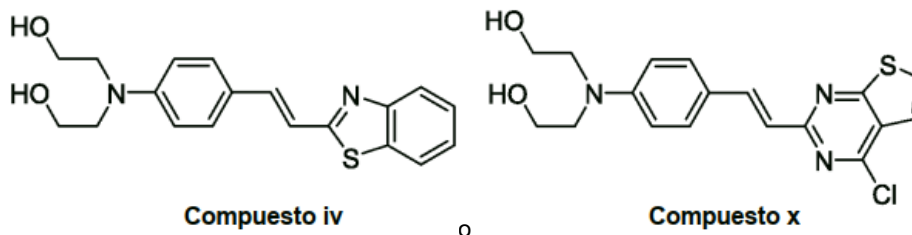


De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

10

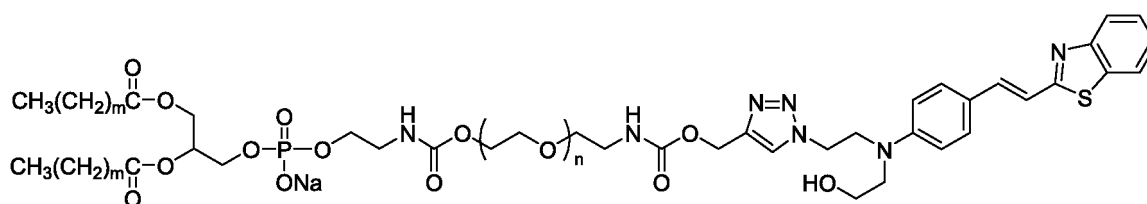


R^{5'} puede ser hidrógeno o hidroxilo. Por ejemplo, el compuesto puede estar representado por:

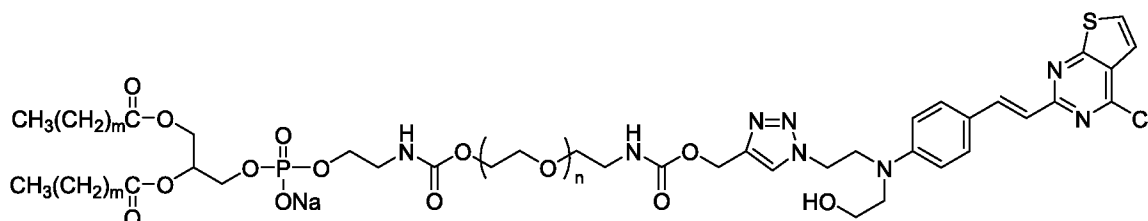


15

En varias realizaciones, el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



20 o



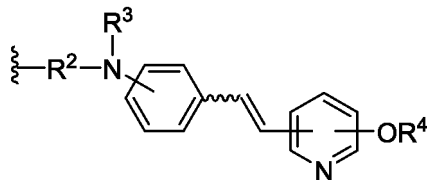
25

La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por

ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.

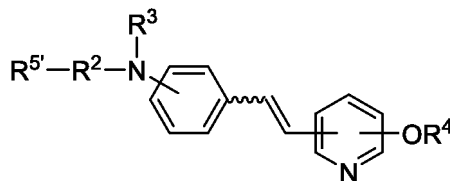
En diversas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

5



De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

10

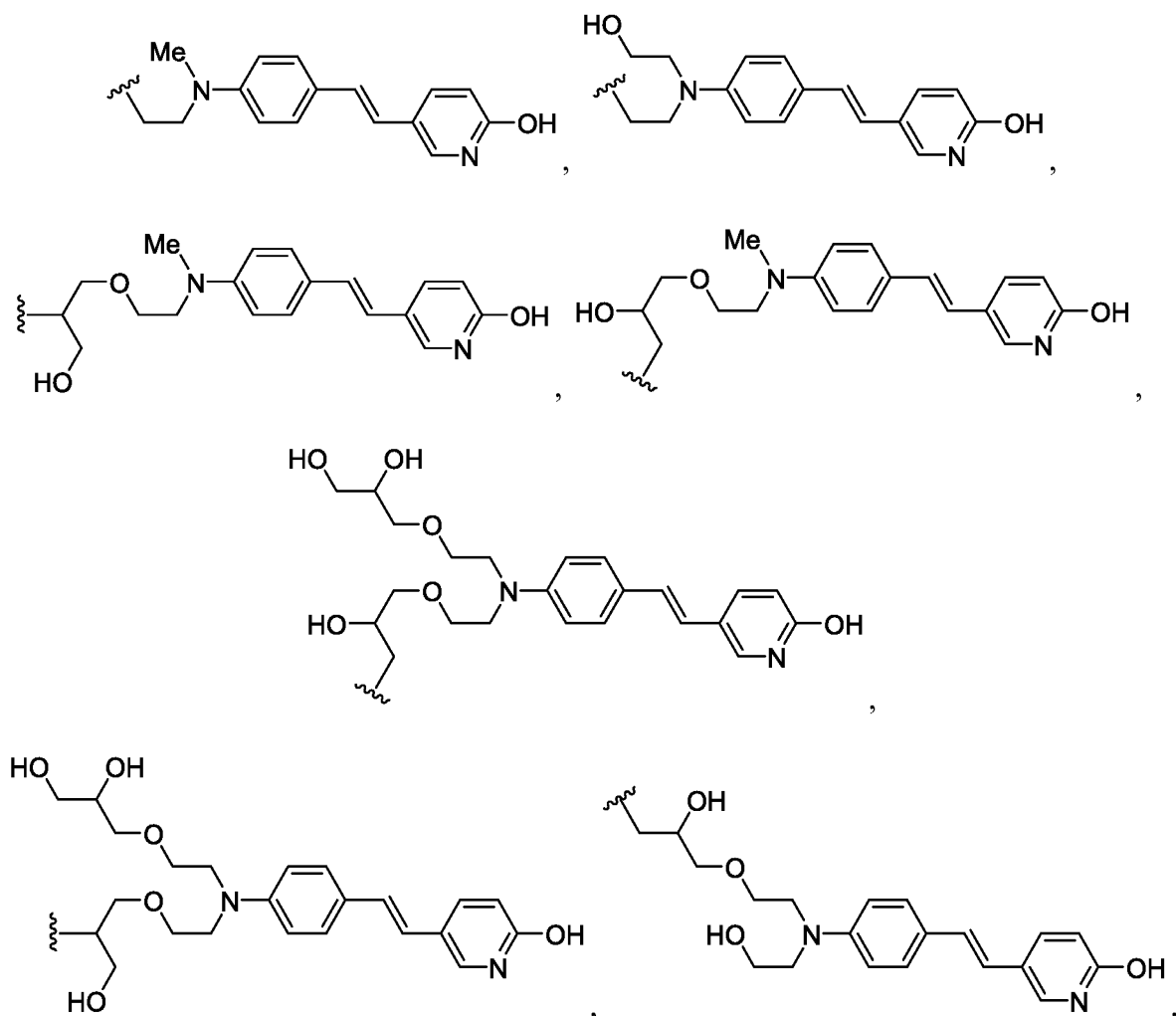


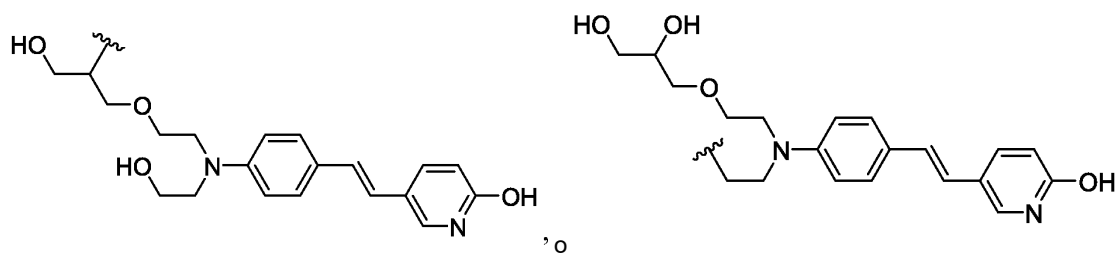
R^{5'} puede ser hidrógeno o hidroxilo. En las estructuras anteriores, R⁴ puede ser H. R⁴ puede ser alquilo opcionalmente sustituido con -OH. -OR⁴ puede ser -(O-alquileo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH.

15

En algunas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por uno de:

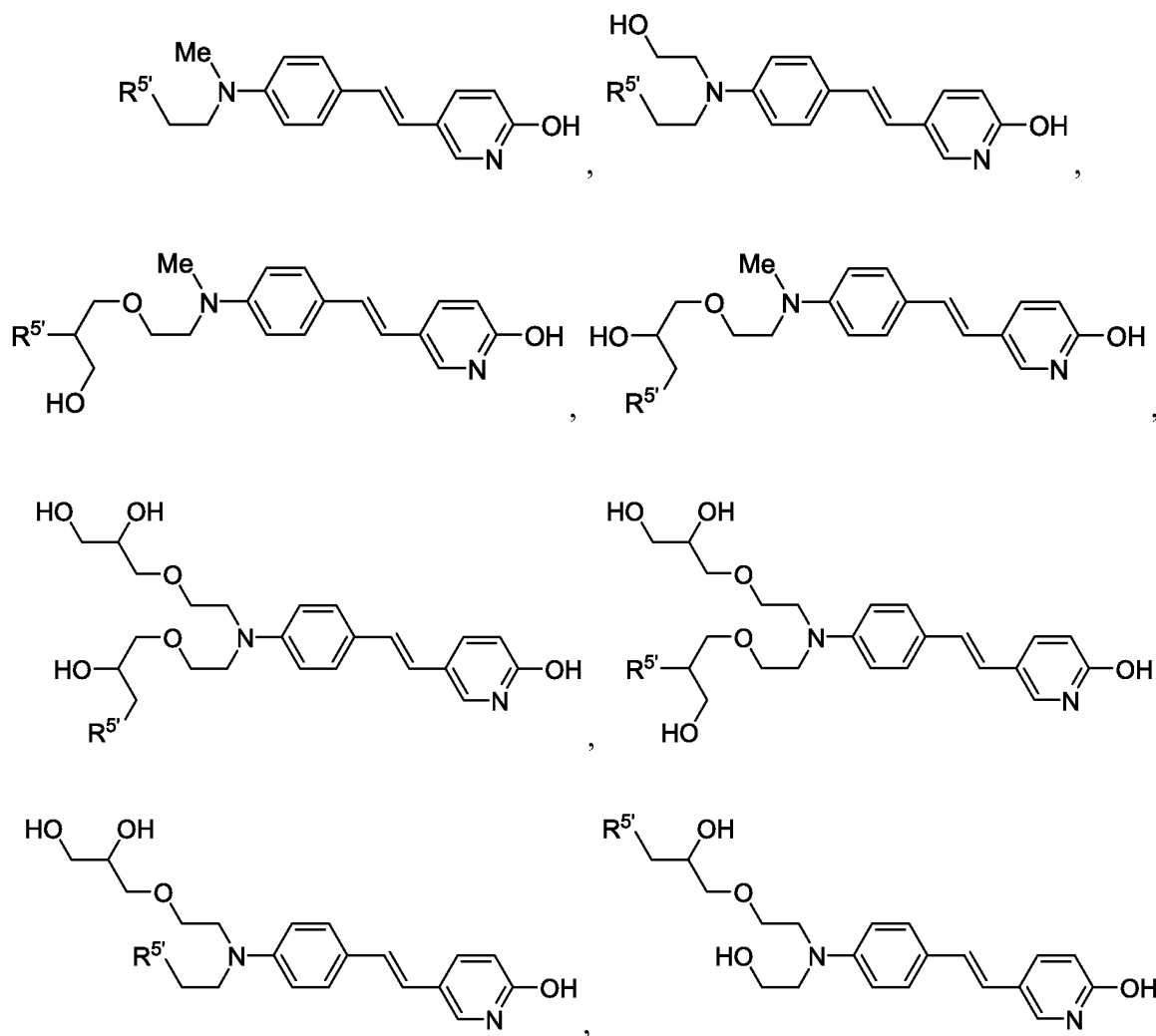
20



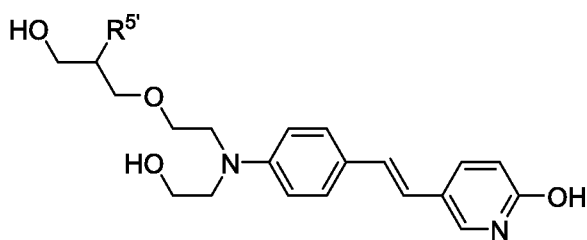


De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:

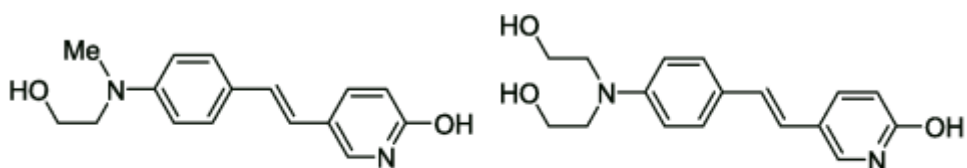
5



10

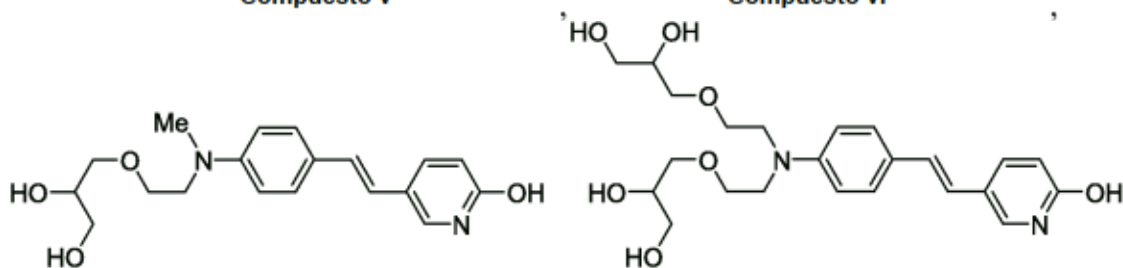


R⁵ puede ser hidrógeno o hidroxilo. Por ejemplo, el compuesto puede estar representado por uno de:



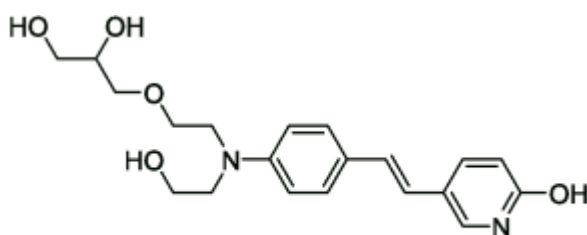
Compuesto v

Compuesto vi



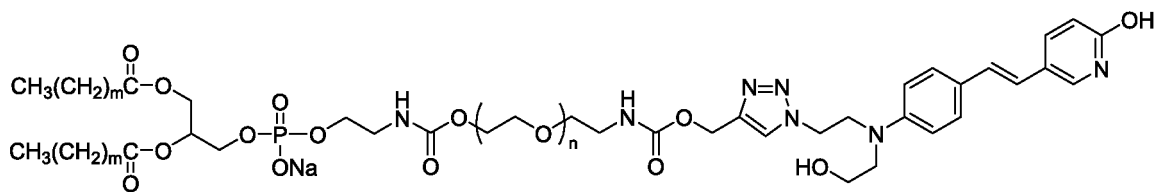
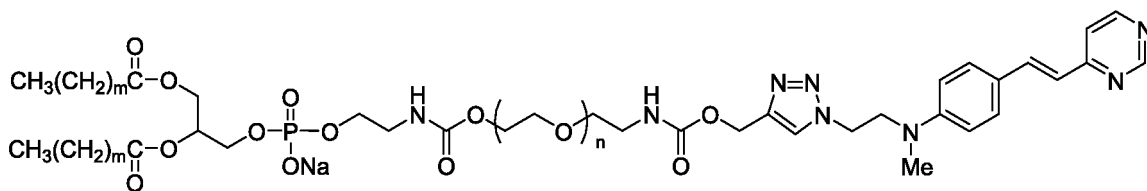
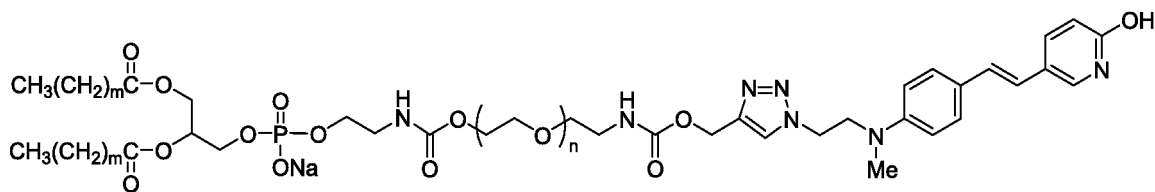
Compuesto vii

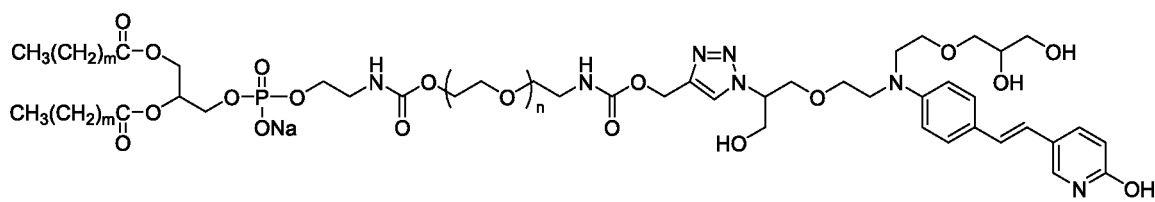
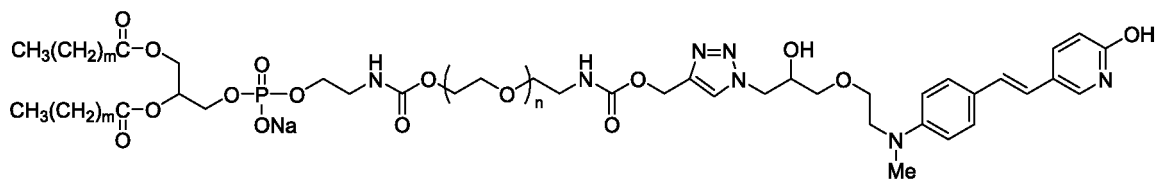
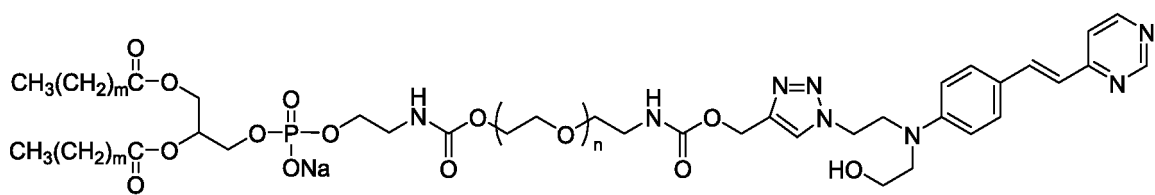
Compuesto viii



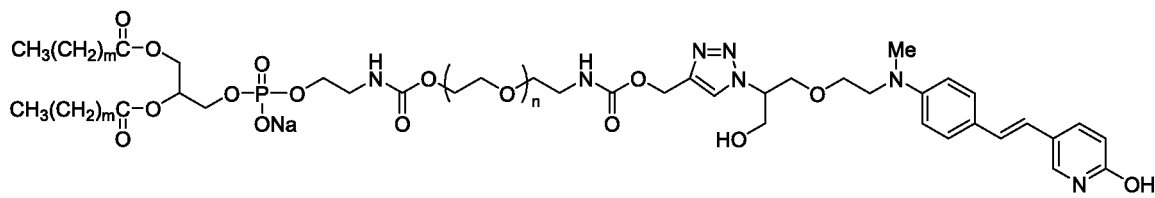
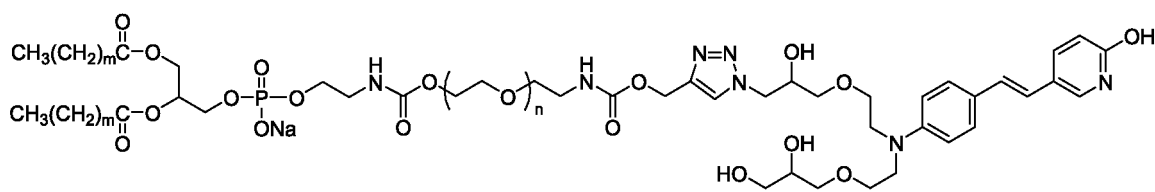
Compuesto ix

En varias realizaciones, el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por uno de:

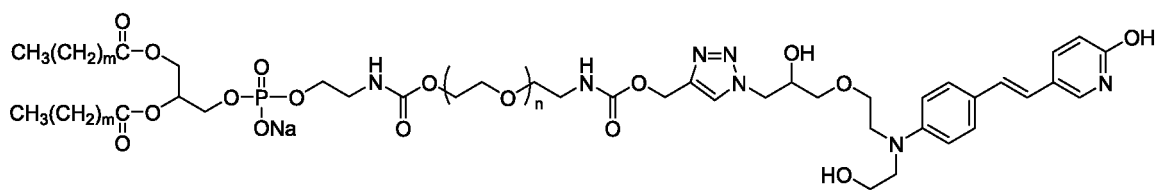
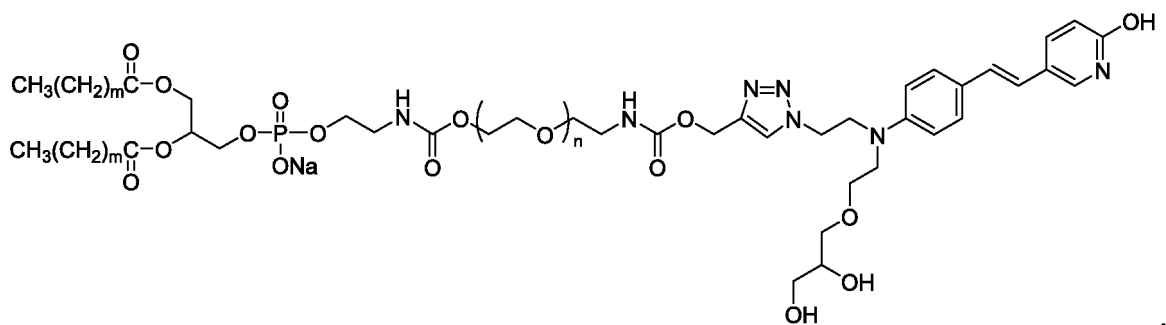




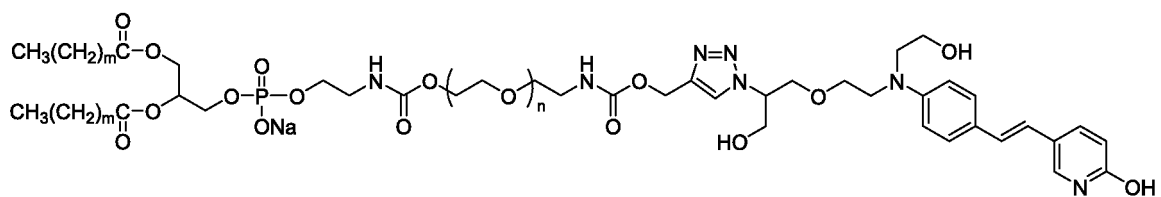
5



10

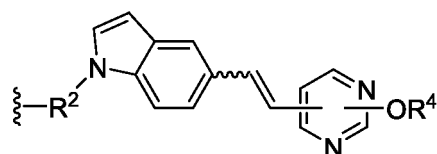


15 o

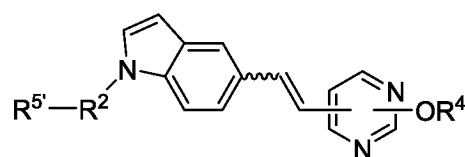


La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.

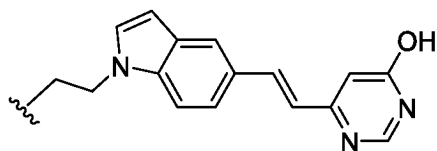
En diversas realizaciones, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



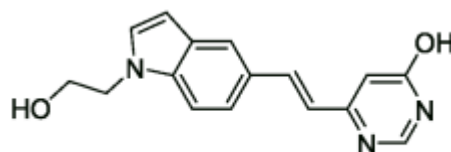
R⁴ puede ser H. R⁴ puede ser alquilo opcionalmente sustituido con -OH. -OR⁴ puede ser -(O-alquileo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH. De manera similar, el compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:



R^{5'} puede ser hidrógeno o hidroxilo. Además, por ejemplo, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:

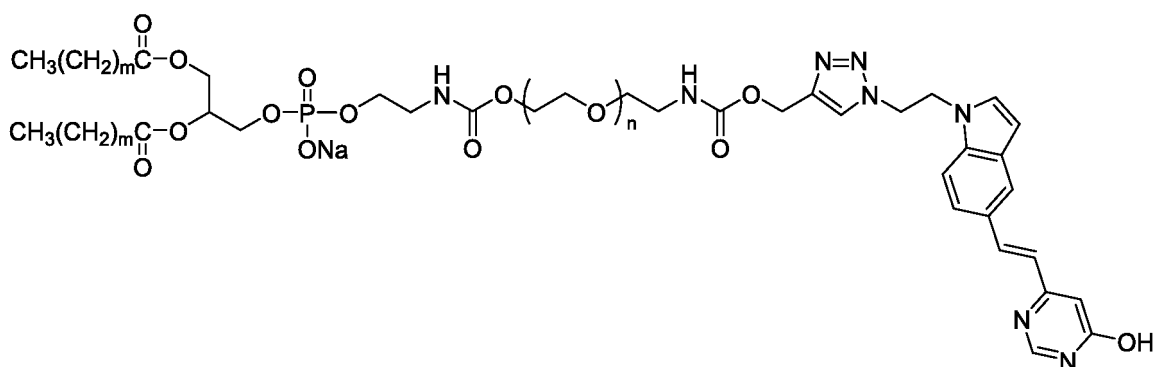


El compuesto de fórmula estructural II puede estar representado por:



Compuesto xii

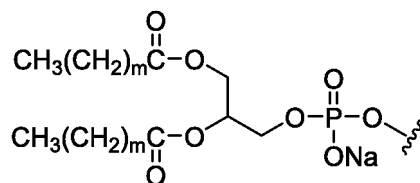
El conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por:



La variable n puede ser un número entero de aproximadamente 60 a aproximadamente 100; y m puede ser uno de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

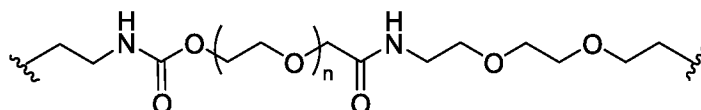
En diversas realizaciones, los compuestos pueden incluir cualquiera de los compuestos i-xiii.

En algunas realizaciones, el resto fosfolípido en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural siguiente:

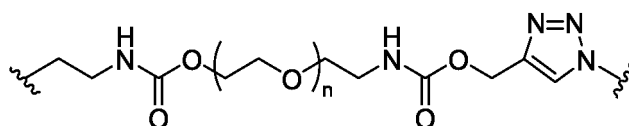


La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, m puede ser 14 o 16. En diversas realizaciones, el resto fosfolípido en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede ser uno de: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE). Los fosfolípidos adecuados pueden incluir también los desvelados en el presente documento y pueden incluir además los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.785.568 concedida a Annapragada *et al.* Los fosfolípidos derivados de polímeros adecuados pueden incluir los descritos en el presente documento y pueden incluir además los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.785.568.

En algunas realizaciones, el resto polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede incluir un polímero hidrófilo, por ejemplo, un poli(óxido de alquileo). El poli(óxido de alquileo) hidrófilo pueden incluir entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 unidades de repetición y tener, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 a 10.000 Daltons. El poli(óxido de alquileo) puede incluir, por ejemplo, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y similares. El resto polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar conjugado al resto fosfolípido mediante una amida o un grupo carbamato. El resto polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar conjugado al resto aromático mediante una amida, carbamato, poli(óxido de alquileo), triazol, combinaciones de los mismos y similares. Por ejemplo, el resto polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:

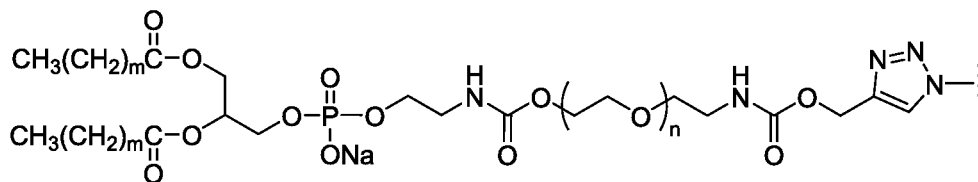
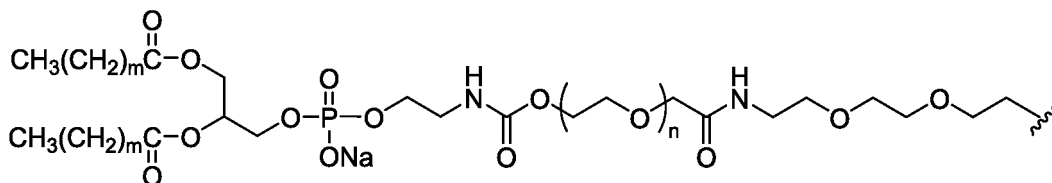


o



La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77.

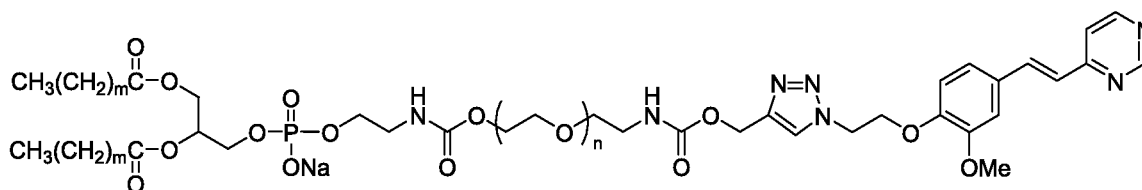
En varias realizaciones, el resto fosfolípido-polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:

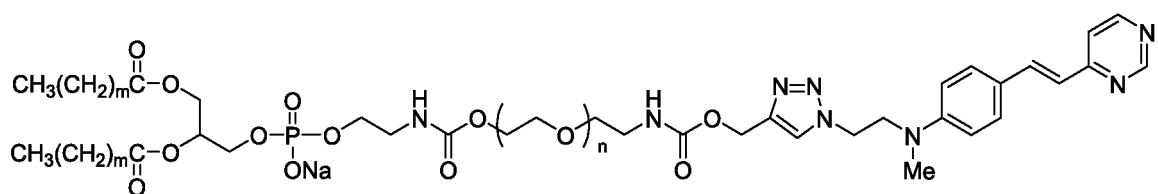
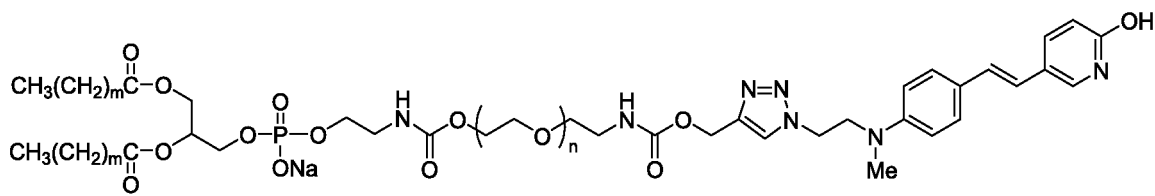
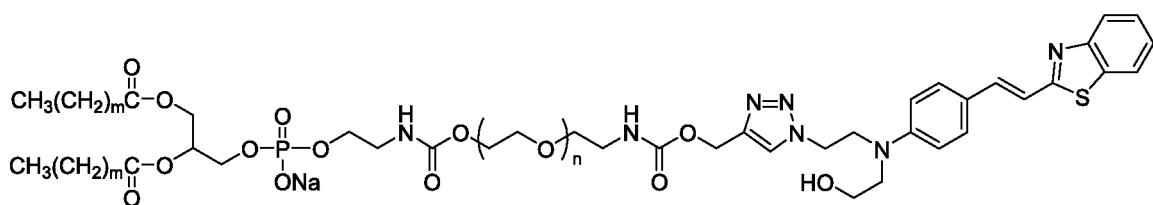


- 5
o
- 10 La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.
- 15 En diversas realizaciones, la composición liposomal puede incluir además un agente potenciador de contraste para representación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo que puede estar al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana. Por ejemplo, el agente potenciador de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) puede estar tanto encapsulado por como unido a la membrana, por ejemplo,
- 20 para proporcionar un liposoma de agente de contraste dual. La composición liposomal puede estar caracterizada por una relajividad por partícula en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ de al menos aproximadamente uno o más de aproximadamente: 100.000, 125.000, 150.000, 165.000, 180.000, 190.000, y 200.000. La detección de la formulación liposomal puede incluir detección usando formación de imágenes por resonancia magnética, por ejemplo, en un intervalo de campo magnético de entre aproximadamente 1 T a aproximadamente 3,5 T o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 T. El agente potenciador de contraste de MRI no radiactivo puede incluir gadolinio. Por ejemplo, el agente potenciador de
- 25 contraste de MRI no radiactivo puede incluir (ácido dietilenotriaminapentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio (GdDTPA-BSA). Los quelatos paramagnéticos de gadolinio tales como GdDTPA, GdDOTA, GdHPDO3A, GdDTPA-BMA y GdDTPA-BSA son conocidos como agentes de contraste de MRI. Véase la patente de Estados Unidos n.º 5.676.928 concedida a Klaveness *et al.*
- 30 En algunas realizaciones, la membrana puede incluir uno o más excipientes estabilizantes. El uno o más excipientes estabilizantes puede incluir un esteroide, por ejemplo, colesterol o un ácido graso.

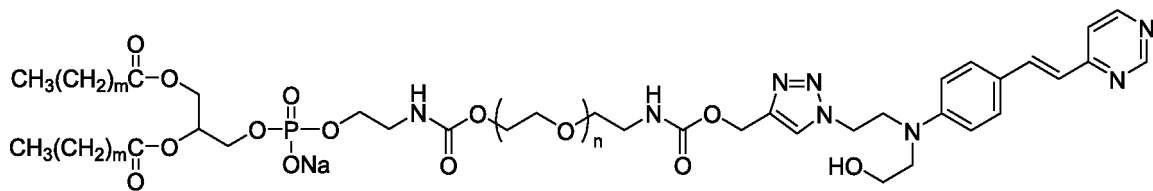
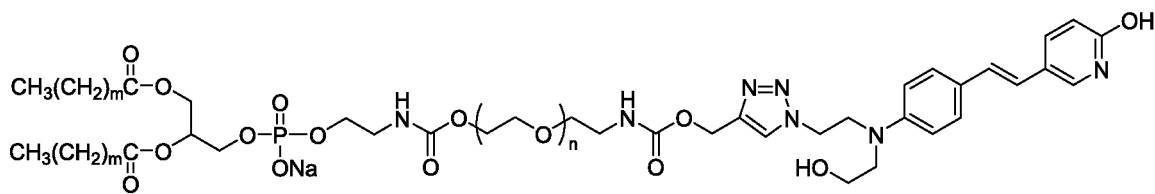
En varias realizaciones, la membrana puede incluir un primer fosfolípido. La membrana puede incluir un segundo fosfolípido. El segundo fosfolípido puede derivatizarse con un polímero hidrófilo que puede incluir, por ejemplo, un poli(óxido de alquileo) hidrófilo. El poli(óxido de alquileo) hidrófilo puede incluir entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 unidades de repetición. El poli(óxido de alquileo) puede incluir, por ejemplo, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y similares. Como se usa en la presente memoria, los restos fosfolípido en cada uno del "primer fosfolípido", el "segundo fosfolípido", y en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático se seleccionan independientemente.

En diversas realizaciones, la membrana de la composición liposomal puede incluir: DPPC; colesterol; ácido dietilenotriamina pentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio y 1,2-diesterail-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] ("DSPE-mPEG-2000"; n.º CAS 147867-65-0). El conjugado fosfolípidopolímero-aromático puede estar representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:

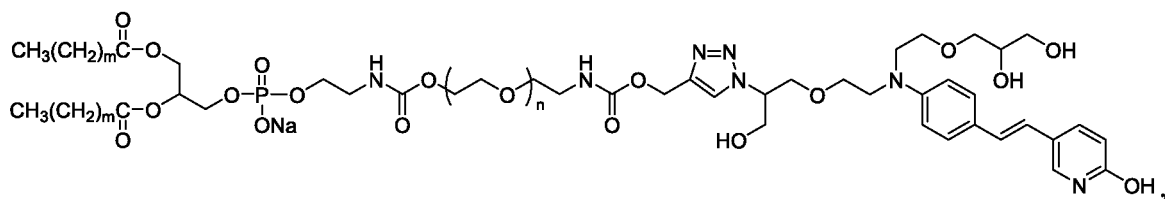
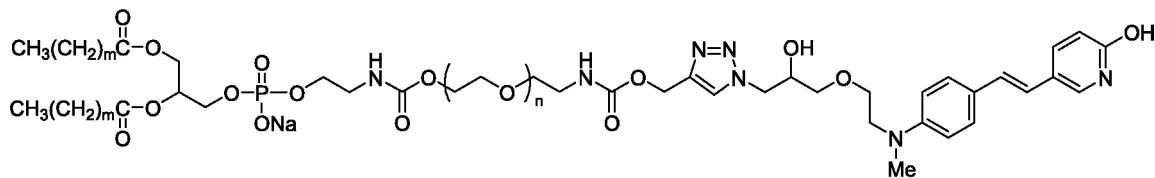
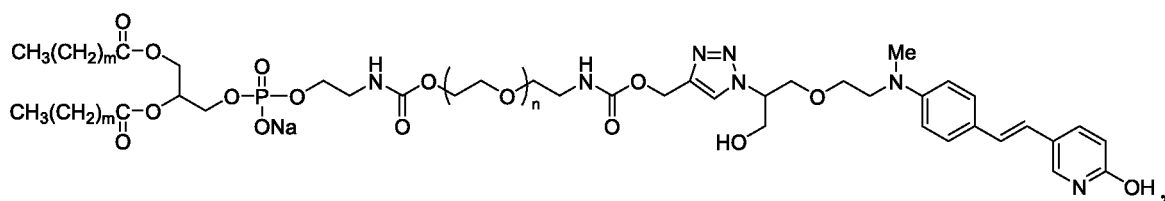




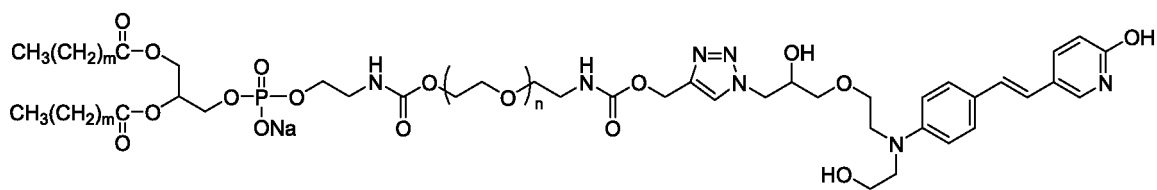
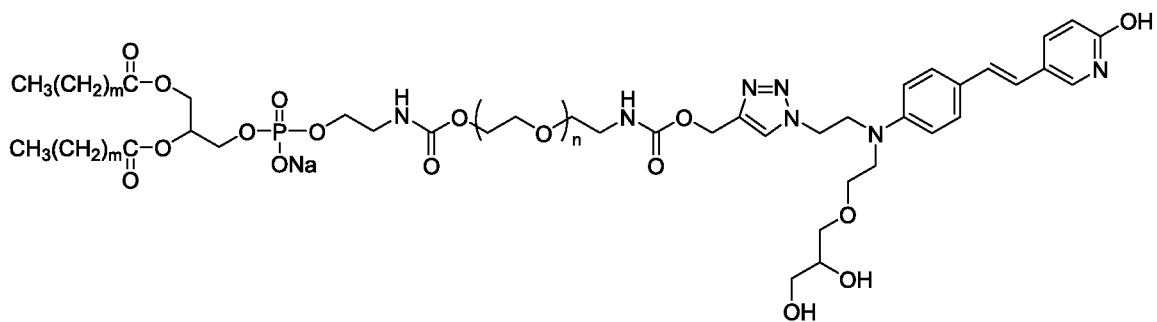
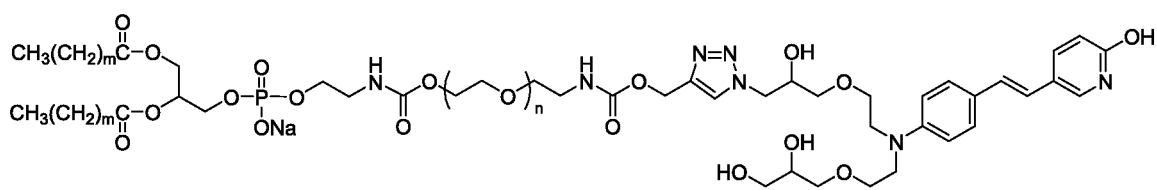
5



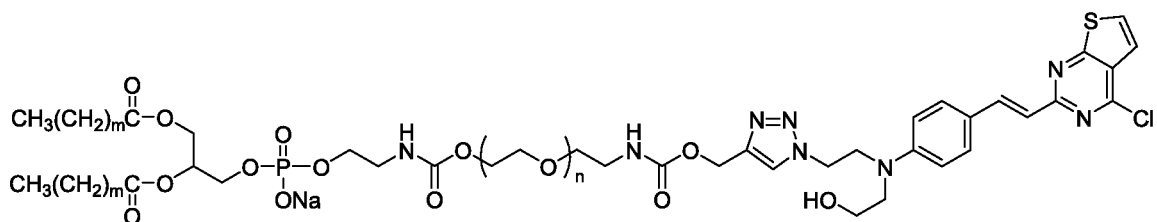
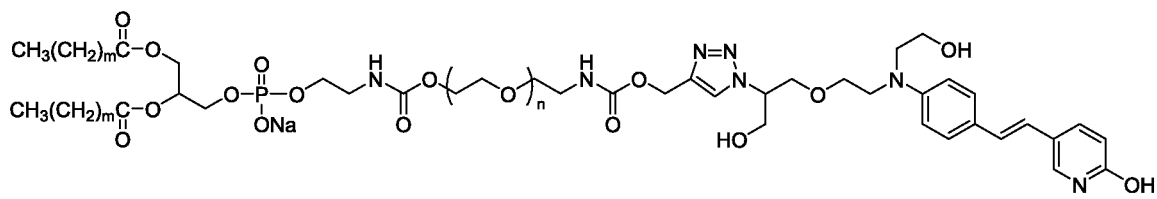
10



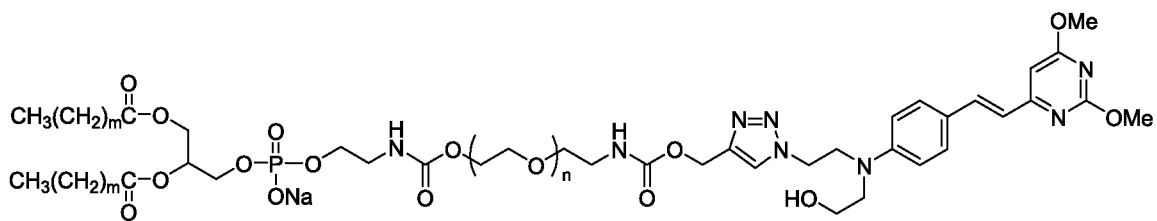
15

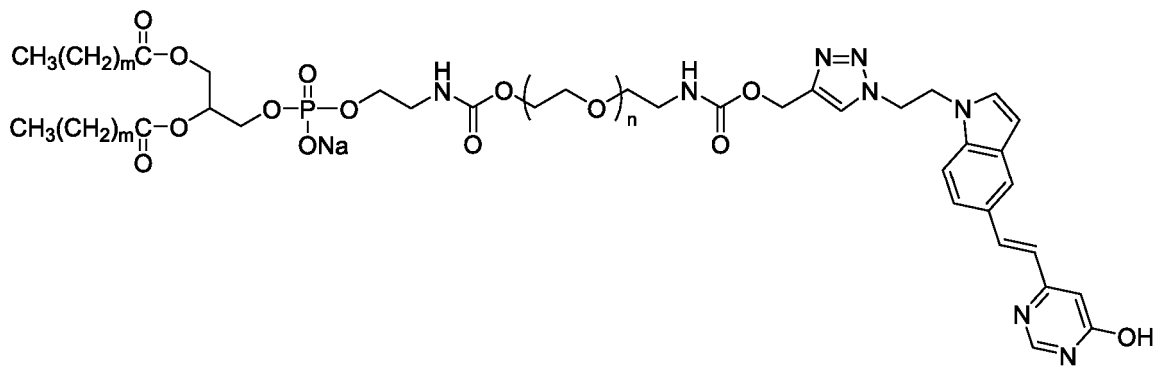


5

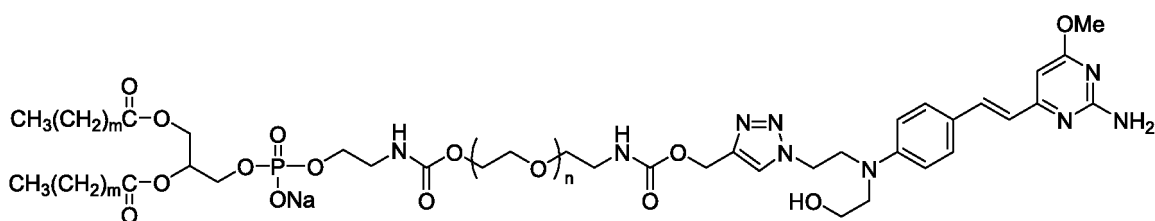


10





o



5

La variable n puede ser cualquier número entero de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 100, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90, de aproximadamente 75 a aproximadamente 85 o aproximadamente 77. La variable m puede ser una de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 14. En otro ejemplo, n puede ser 77 y m puede ser 16.

10

En diversas realizaciones, uno o más ligandos amiloides alternativos además de los restos y compuestos aromáticos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, rojo Congo y sus derivados, tioflavina T y sus derivados y crisamina G y sus derivados. Dichos ligandos amiloides alternativos pueden estar conjugados con un polímero hidrófilo, por ejemplo, PEG (que tiene, por ejemplo, un peso molecular que varía de 500 a 10,000 Da) y similares y un lípido, por ejemplo, DPPC, DSPE, DSPC, DPPE y similares, para formar un conjugado lípido-polímero hidrófilo-ligando amiloide. Por ejemplo, el conjugado lípido-polímero-ligando amiloide puede incorporarse en la composición liposomal descrita en el presente documento.

15

En la presente divulgación se proporciona una composición liposomal para su uso en un método para formación de imágenes de depósitos amiloides en un sujeto.

20

El método puede incluir introducir dentro del sujeto una cantidad detectable de una composición liposomal. El método puede incluir permitir tiempo suficiente para que la composición liposomal se asocie con uno o más depósitos amiloides. El método puede incluir detectar la composición amiloide asociada con el uno o más depósitos amiloides. La composición liposomal del método puede incluir una membrana. Un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo puede estar al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula I;

25

30



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático del conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser $-R^2-O-$ o $-R^2-N(R^3)-$. R^1 puede ser alquilo o alqueno C_2-C_6 . R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alqueno o alcoialqueno. R^3 puede ser hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoialquilo C_1-C_6 . Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo C_1-C_6 e hidroalquilo C_1-C_6 . Ar, Het, R^1 y R^3 distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; $-OH$; alquilo, arilo, $-O$ -arilo u $-(O$ -alquilo) $_1$ - $_6$ opcionalmente sustituido con $-OH$ o halógeno; $-NH_2$; $-NH$ -alquilo; $-N$ -dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamilo y glicosilo.

35

40

En diversas realizaciones, la composición liposomal y el conjugado fosfolípido-polímero-aromático usados en el método pueden incluir cualquier valor descrito en el presente documento para la composición liposomal

45

y el conjugado fosfolípido-polímero-aromático.

En algunas realizaciones, la detección puede incluir detección usando formación de imágenes por resonancia magnética. En otro ejemplo, la detección puede incluir detección por formación de imágenes por fluorescencia (FI). La detección puede incluir detección por formación de imágenes por SPECT y/o detección de imágenes por PET y el agente potenciador de contraste no radiactivo puede reemplazarse con un agente potenciador de contraste radiactivo. En agente potenciador de contraste radiactivo puede incluir, por ejemplo, aquellos agentes que se consideran apropiados para su uso con formación de imágenes por SPECT y/o formación de imágenes por PET en el National Institute of Health's Molecular Imaging and Contrast Agent Database ("MICAD"). Cualquier otro tipo adecuado de metodología de formación de imágenes conocida por los expertos en la técnica está contemplado, incluyendo, pero sin limitación, formación de imágenes por PET.

En diversas realizaciones, el método puede incluir diagnosticar al paciente con enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposómica asociada con uno o más depósitos amiloides.

En algunas realizaciones, el método puede incluir identificar al paciente como potencialmente enfermo de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides. El método puede incluir someter al paciente a un análisis de ovillos neurofibrilares tau, por ejemplo, un análisis por TEP de los ovillos neurofibrilares tau. El método puede incluir, al determinar la presencia de ovillos neurofibrilares tau junto con la detección de la composición liposómica asociada con uno o más depósitos amiloides, diagnosticar al paciente con la enfermedad de Alzheimer.

En diversas realizaciones, la composición liposomal y el conjugado fosfolípido-polímero-aromático usados en el método pueden incluir cualquier valor descrito en el presente documento para la composición liposomal y el conjugado fosfolípido-polímero-aromático.

En la presente divulgación se proporciona un kit para representación de imágenes de depósitos amiloides en un sujeto. El kit puede incluir cualquier composición liposomal descrita en el presente documento. Las instrucciones pueden dirigir a un usuario para introducir dentro del sujeto una cantidad detectable de la composición liposomal. Las instrucciones pueden dirigir al usuario para permitir tiempo suficiente para que la composición se asocie con uno o más depósitos amiloides. Las instrucciones pueden dirigir al usuario para detectar la composición liposomal asociada con el uno o más depósitos amiloides. La composición liposomal del kit puede incluir una membrana. Un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo puede estar al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana. La membrana puede incluir un conjugado fosfolípido-polímero-aromático. El resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático puede estar representado por la fórmula estructural I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula estructural I, X puede ser $\text{-R}^2\text{-O-}$ o $\text{-R}^2\text{-N(R}^3\text{)-}$. R^1 puede ser alquilo o alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$. R^2 puede ser un grupo de unión que incluye de 1 a 6 átomos de carbono. R^2 pueden incluir uno de: alqueno o alcóxialqueno. R^3 puede ser hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o alcóxialquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$. Ar puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Ar pueden incluir al menos un anillo aromático o heteroaromático. Het puede ser un grupo monocíclico o policíclico. Het pueden incluir al menos un anillo heteroaromático. Adicionalmente, el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por la fórmula I estar sustituido. Por ejemplo, R^2 puede estar sustituido con cero, uno o más de: hidroxilo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ e hidroxialquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$. Ar, Het, R^1 y R^3 distintos de hidrógeno pueden estar independientemente sustituidos con cero, uno o más de: halógeno; -OH; alquilo, -O-alquilo, arilo, -O-arilo u -(O-alquilo)₁₋₆ opcionalmente sustituido con -OH o halógeno; -NH₂; -NH-alquilo; -N-dialquilo; carboxilo; sulfonilo; carbamoilo y glicosilo.

En diversas realizaciones, las instrucciones pueden dirigir a un usuario para llevar a cabo cualquiera de las etapas del método descritas en el presente documento. Por ejemplo, las instrucciones pueden dirigir a un usuario para diagnosticar al paciente con la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposomal asociada con el uno o más depósitos amiloides.

En algunas realizaciones, las instrucciones pueden indicar a un usuario que identifique al paciente que potencialmente tiene la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposómica asociada con uno o más depósitos amiloides. Las instrucciones pueden indicar al usuario que someta al paciente a un análisis de los ovillos neurofibrilares tau, por ejemplo, un análisis por TEP de los ovillos neurofibrilares tau. Las instrucciones pueden indicar al usuario que diagnostique al paciente con la enfermedad de Alzheimer al determinar la presencia de ovillos neurofibrilares tau junto con la detección de la composición liposómica asociada con uno o más depósitos amiloides.

Ejemplos

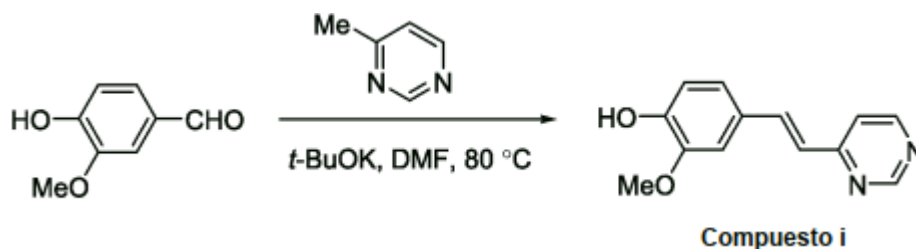
A continuación se describen ciertas realizaciones en forma de ejemplos. En los ejemplos siguientes, Los compuestos

i, iv-x y xii son ejemplos de referencia para ayudar a la comprensión de la invención.

General: Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se usaron sin purificación adicional. Los espectros de las resonancias magnéticas nucleares de protón (RMN ^1H) se registraron en un espectrómetro NMR Bruker 600 de 600 MHz (Bruker, Billerica, MA). Los espectros de las resonancias magnéticas nucleares de carbono (RMN ^{13}C) se registraron en un espectrómetro NMR Bruker 600 de 150 MHz. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) a partir de un patrón interno de acetona (2,05 ppm), cloroformo (7,26 ppm) o dimetilsulfóxido (2,50 ppm) para RMN ^1H ; y a partir de un patrón interno de acetona residual (206,26 ppm), cloroformo (77,00 ppm), o dimetilsulfóxido (39,52 ppm) para RMN ^{13}C . Las multiplicidades pico de la RMN se indican como sigue: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), sa (singlete ancho), dd (doblete de dobletes), tt (triplete de triplete), ddd (doblete de doblete de dobletes) y m (multiplete). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en hercios (Hz). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron de The Ohio State University Mass Spectrometry and Proteomics Facility, Columbus OH; Los espectros de HRMS y de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) también de la BioScience Research Collaborative at Rice University, Houston, Texas. Se realizó cromatografía de capa fina (TLC) se realizó sobre placas de gel de sílice 60 F254 (EMD Chemical Inc., Gibbstown, Nueva York) y los componentes se visualizaron con luz ultravioleta (254 nm) y/o ácido fosfomolibdico, solución en etanol al 20 % en peso. Se usó gel de sílice SiliFlash (230-400 mesh) para toda la cromatografía en columna.

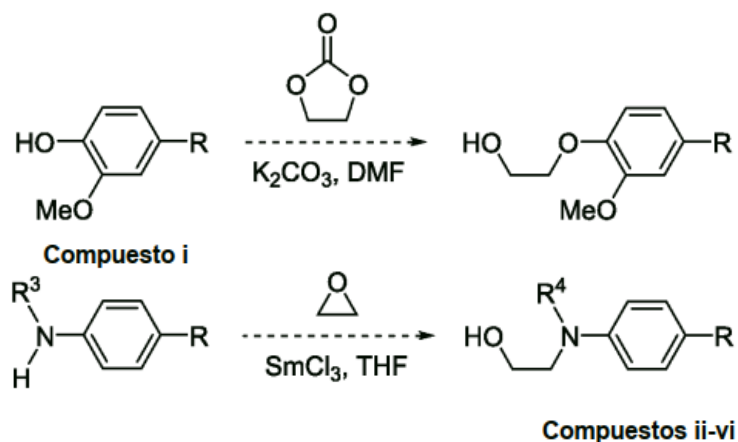
Los métodos siguientes pueden usarse o adaptarse para sintetizar los compuestos i-xiii tal como se representa en las FIGS. 1A, 1B y 1C.

EJEMPLO 1A: Preparación del compuesto i



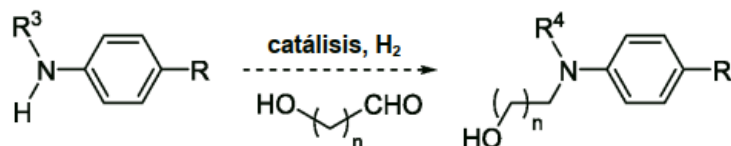
El compuesto i se preparó haciendo reaccionar 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (466 mg, 3,06 mmol) con 4-metilpirimidina (140 μl , 1,53 mmol) y *tert*-butoxido de potasio (687 mg, 6,12 mmol) en N,N dimetilformamida (24 ml). La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se aisló el compuesto i por cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla de acetato de etilo/metanol/hexano. (E)-2-metoxi-4-[2-(pirimidin-4-il)vinil]fenol (Compuesto i): RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 9,51 (s a, OH), 9,08 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 8,70 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 5,4, 1,2 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 162,16, 158,38, 157,39, 148,46, 147,93, 137,25, 126,98, 122,53, 122,21, 118,48, 115,60, 110,71, 55,62; HRMS calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 + m/z$ (M+H) $^+$ 229,0972, encontrado 229,0981.

EJEMPLO PREDICTIVO 1B: Preparación de derivados alcoxilados



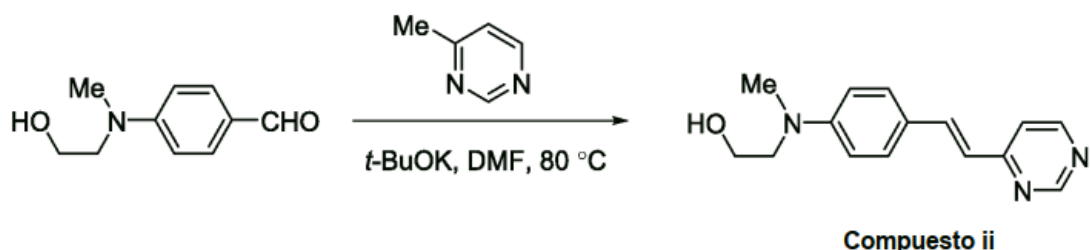
Se pueden preparar diversos compuestos y derivados de O- y N-hidroxietilo como sigue. Por ejemplo, Puede tratarse el compuesto i con carbonato de etileno para producir el derivado alcoxilado correspondiente. Además, por ejemplo, los compuestos ii, iv y v pueden prepararse haciendo reaccionar el derivado de anilina correspondiente con óxido de etileno, en donde $\text{R}^3 = \text{R}^4 =$ alquilo, por ejemplo, metilo. La reacción puede incluir la adición de un ácido o ácido de

Lewis. La reacción puede incluir temperaturas de reacción por encima de la temperatura ambiente. La preparación de compuestos dialcoxilados, tales como los compuestos iii y vi puede incluir 2 equiv. de epóxido, donde, por ejemplo, $R^3 = H$ y R^4 puede ser un segundo grupo hidroxietilo (CH_2CH_2OH). Como alternativa, tanto los compuestos o derivados de O- como de N-hidroxietilo se pueden preparar mediante una alquilación con un β -hidroxialhuro, tal como 2-bromoetanol (no ilustrado). Los compuestos de O- y N-hidroxietilo se pueden usar como sustratos para los derivados de glicerol correspondientes tal como se describe en el ejemplo 7.



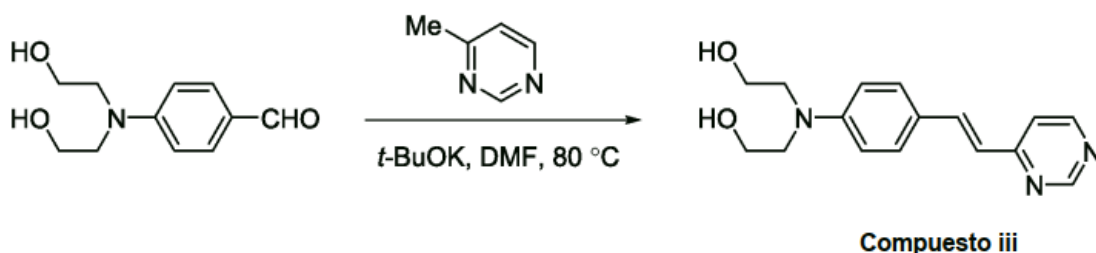
- 10 Como alternativa, los compuestos de N-hidroxietilo ii-vi pueden prepararse mediante aminación reductiva con 2-hidroxietanol (glicolaldehído) en presencia de hidrógeno y un catalizador, tal como Pd/C. Los derivados homologados pueden prepararse fácilmente en condiciones similares con un hidroxialdehído apropiado, tal como 3-hidroxipropanal ($n=2$), 4-hidroxilbutanal ($n=3$), 5-hidroxipentanal ($n=4$) o 6-hidroxihexanal ($n=5$).

15 EJEMPLO 2: Preparación del compuesto ii



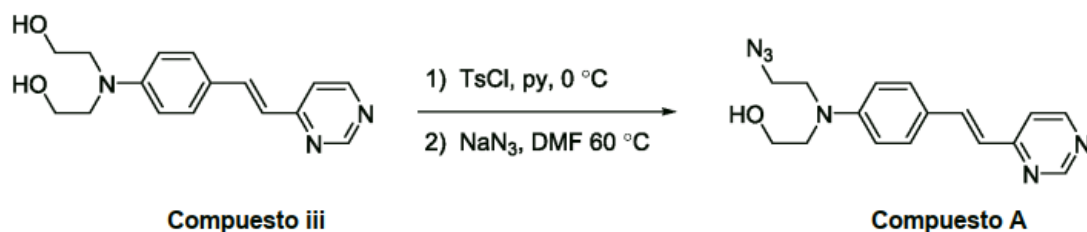
- 20 En un ejemplo, se preparó el compuesto ii haciendo reaccionar N-metil-N-(2-hidroxietil)-4-aminobenzaldehído (200 mg, 1,12 mmol) con 4-metilpirimidina (112 μ l, 1,23 mmol) y *terc*-butóxido de potasio (376 mg, 3,35 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10 ml) durante 4 horas a 80 °C. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de celite y se concentró. La cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de disolvente de acetato de etilo/metanol/hexano proporcionó el compuesto ii (isómero *E*) (184 mg, 0,72 mmol, 64 %), isómero *Z* (18 mg, 0,07 mmol, 6 %) y mezcla de isómeros *E/Z* (39 mg, 0,15 mmol, 14 %). (E)-2-[[4-(2-(pirimidin-4-il)vinil)fenil]amino]etanol (Compuesto ii): RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 8,91 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 8,45 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 7,41 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 7,26 (dd, $J = 6,6, 1,2$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,69 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,46 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,98 (s, 3H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 163,80, 157,60, 155,80, 150,59, 139,19, 129,54, 123,21, 119,48, 117,83, 115,13, 111,91, 59,13, 54,35, 38,82; HRMS calc. para $C_{15}H_{17}N_3O + m/z$ ($M+H$) $^+$ 256,1444, encontrado 256,1372.

30 EJEMPLO 3: Preparación del compuesto iii



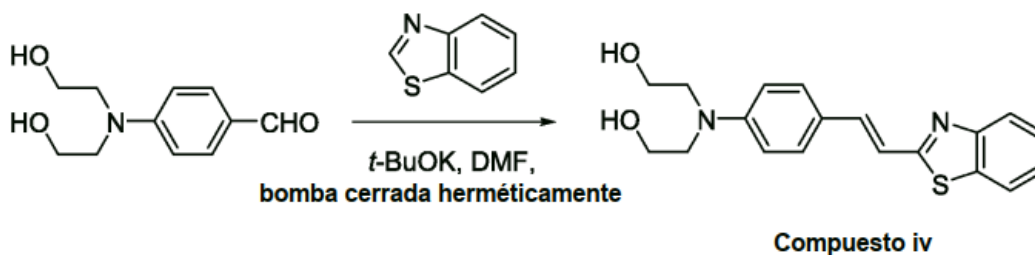
- 35 En un ejemplo, se preparó el compuesto iii haciendo reaccionar 4-(bis(hidroxietil)amino)benzalaldehído (234 mg, 1,12 mmol) con 4-metilpirimidina (112 μ l, 1,23 mmol) y *terc*-butóxido de potasio (376 mg, 3,35 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10 ml) durante 12 horas a 80 °C. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celite y se concentró. Se aisló el compuesto iii como el componente principal de una mezcla mediante cromatografía sobre gel de sílice usando un sistema disolvente de acetato de etilo/metanol/ hexano. (E)-2,2'-[[4-(2-(pirimidin-4-il)vinil)fenil]azanedil]dietanol (Compuesto iii): RMN 1H (MeOD, 600 MHz) δ 9,02 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 8,61 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,53 (dd, $J = 6,0, 1,2$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 3,71 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H), 3,57 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 165,23, 159,17, 157,76, 149,72, 139,99, 130,84, 125,87, 121,64, 119,42, 113,66, 51,36, 50,08; HRMS calc. para $C_{16}H_{19}N_3O_2 + m/z$ ($M+H$) $^+$ 286,1550, encontrado 286,1546.

45 EJEMPLO 4: Preparación de azidas: Compuesto A



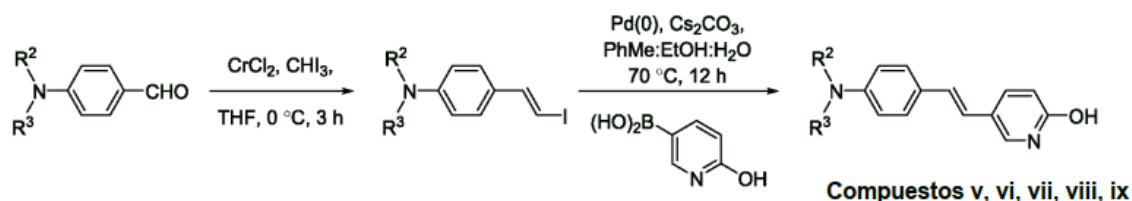
Se preparó el compuesto A añadiendo cloruro de 4-toluenosulfonilo (301 mg, 1,58 mmol) a una solución del compuesto iii (300 mg, 1,05 mmol) en piridina (10 ml) a 0 °C y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche. La piridina se eliminó a presión reducida y se añadió *N,N*-dimetilformamida (15 ml) al residuo de tosilato en bruto. Se añadió azida de sodio (410 mg, 6,31 mmol) a la solución y la mezcla resultante se calentó a 60 °C durante una noche. Se eliminó el disolvente de *N,N*-dimetilformamida a presión reducida y la suspensión resultante se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera (15 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. El compuesto A (122 mg, 0,40 mmol, 38 %) y el producto di-azido no deseado (123 mg, 0,37 mmol, 35 %) se aislaron mediante cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla de disolvente de acetato de etilo/metanol/hexano (9,5:9,5:1). Los procedimientos descritos en los ejemplos 4A y 4B pueden aplicarse a otros compuestos hidroxialquilo tales como los compuestos ii, iv, v o vi, para producir las azidas correspondientes.

EJEMPLO 5: Preparación del compuesto iv



En un ejemplo, Se preparó el compuesto iv haciendo reaccionar 4-(bis(hidroxi)etil)amino)benzaldehído (250 mg, 1,20 mmol) con benzotriazol (178 mg, 1,32 mmol) y *tert*-butóxido de potasio (404 mg, 3,6 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10 ml) durante 5 horas en una bomba cerrada herméticamente. La mezcla de reacción se filtró a través de celite. Se aisló el compuesto iv (89 mg, 0,26 mmol, 22 %) mediante cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla de disolventes de acetato de etilo/metanol/hexano.

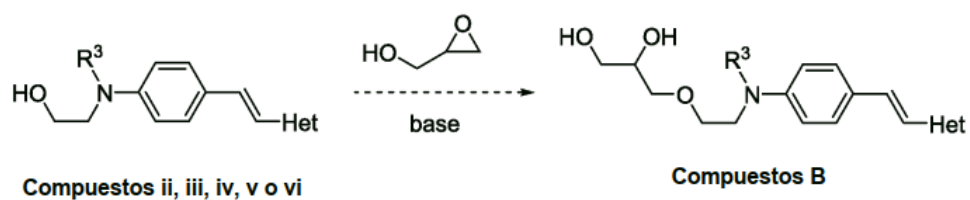
EJEMPLO 6: Preparación de los compuestos v, vi, vii, viii y ix



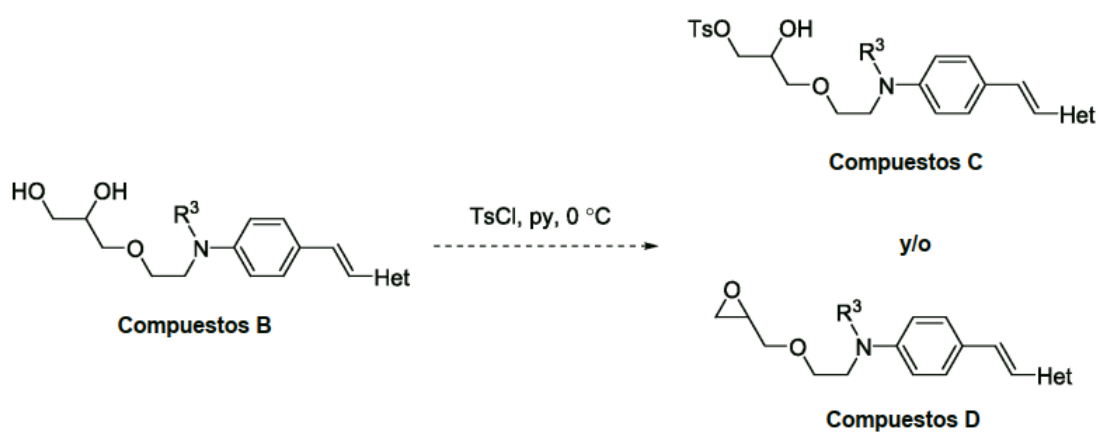
Los compuestos v, vi, vii y viii puede prepararse fácilmente haciendo reaccionar primero el 4-aminobenzaldehído correspondiente en condiciones estándar de Takai (por ejemplo, triyodometano (yodoformo), dicloruro de cromo, en tetrahidrofurano durante 3 h a 0 °C) para proporcionar el yoduro de vinilo correspondiente. La reacción del yoduro de vinilo con ácido (6-hidroxipiridin-3-il)borónico en condiciones de Suzuki (por ejemplo, catalizador de Pd(0), carbonato de cesio, tolueno/etanol/agua(4: 4: 1), 12 h, 70 °C), seguid de cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla de disolventes de acetato de etilo/metanol/hexano puede producir los compuestos v, vi, vii y viii.

EJEMPLO PREDICTIVO 7: Síntesis de derivados de glicerol

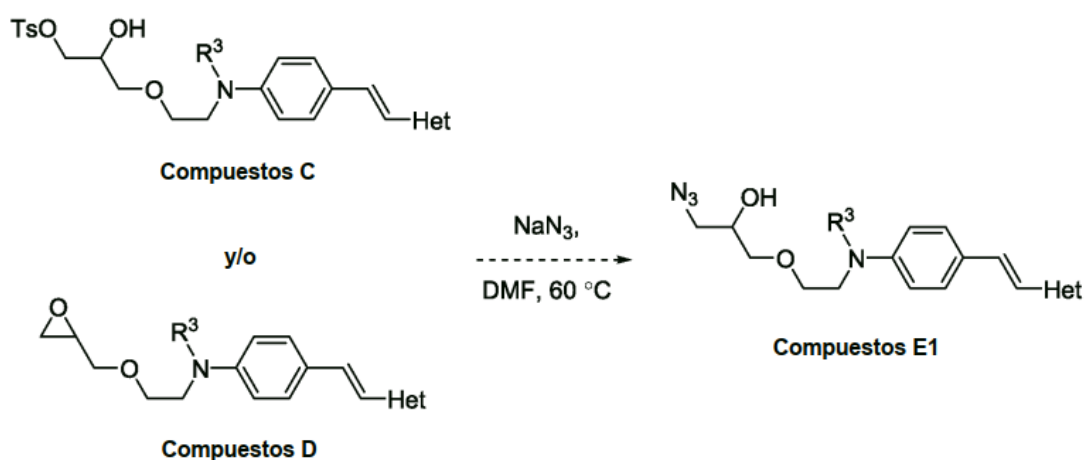
a)



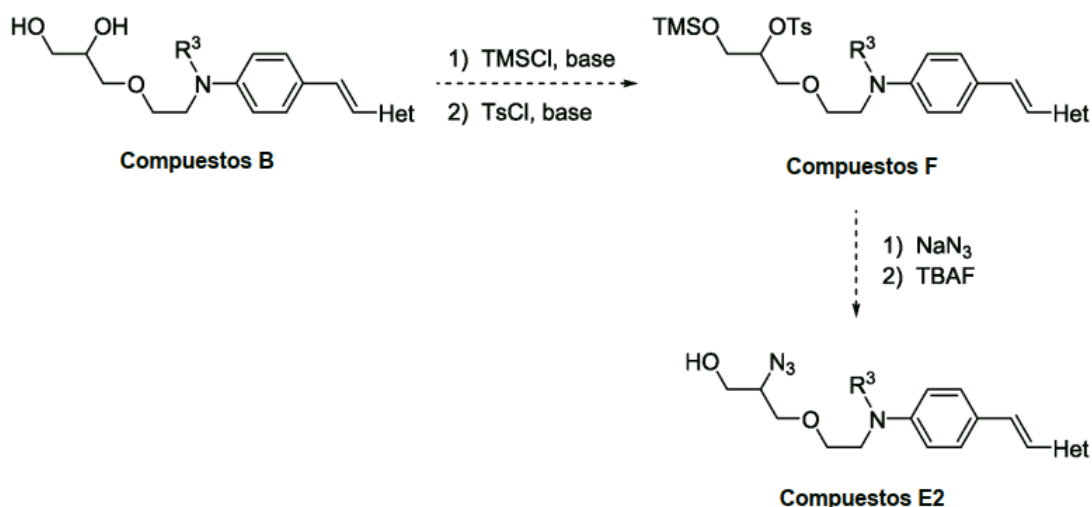
b)



c)

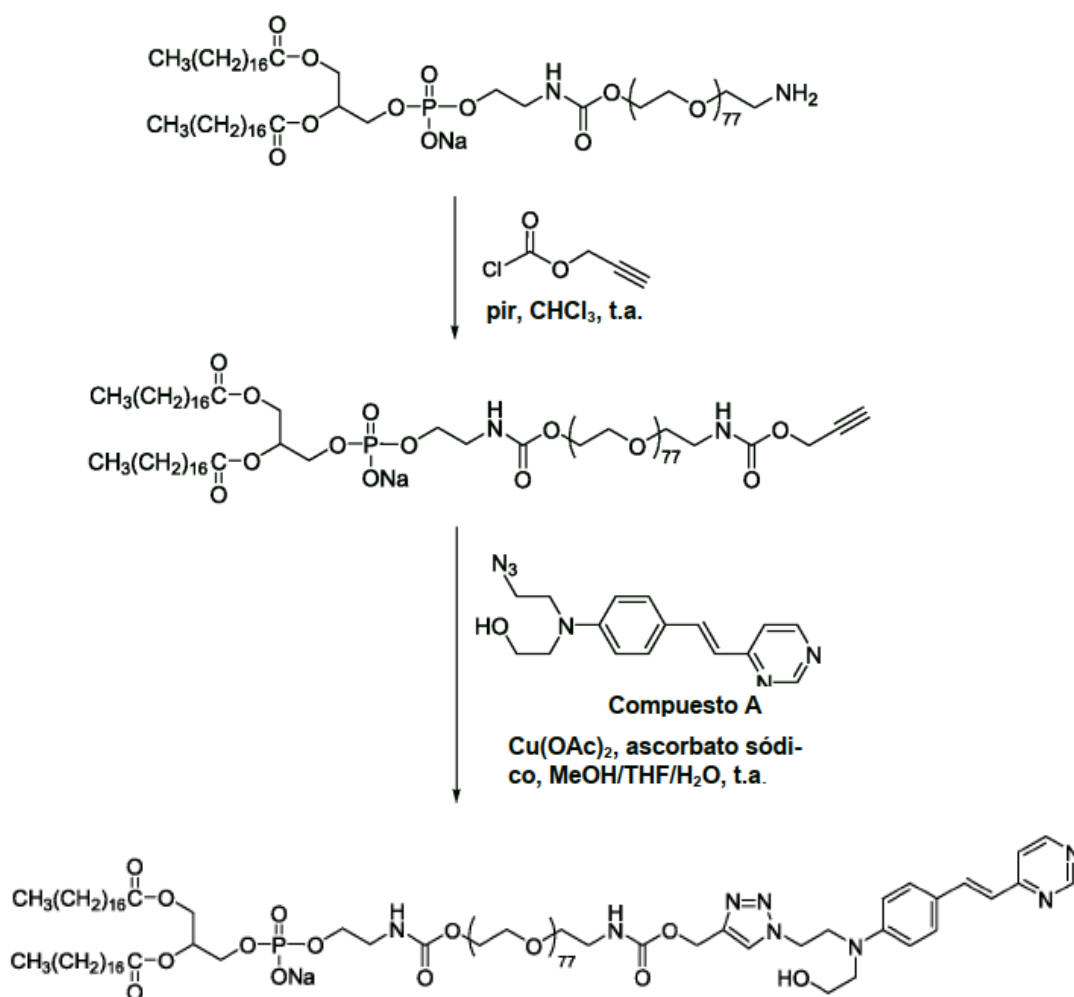


d)



Los compuestos de azida E1 y E2 pueden prepararse convirtiendo el alcohol correspondiente, tal como uno de los compuestos ii, iii, iv, v o vi en un grupo saliente adecuado, tal como un tosilato, mesilato, triflato o haluro. La reacción con glicerol puede desplazar el grupo saliente adecuado para generar los compuestos B sustituidos con glicerol. Como alternativa, el compuesto B se puede preparar directamente por reacción de los compuestos ii, iii, iv, v o vi con 2-oxiranometanol. La funcionalización quimioselectiva del alcohol primario más reactivo en los compuestos B, por ejemplo, mediante tosilación, mesilación, triflación o halogenación, puede proporcionar los compuestos C y/o compuestos de epóxido D. El tratamiento de los compuestos C o D con una fuente de azida tal como azida sódica puede proporcionar compuestos de azida primaria E1. Los compuestos E2 pueden prepararse mediante una secuencia de reacciones que comienzan con una protección quimioselectiva de un alcohol primario en el compuesto B, tal como un éter de sililo. La posterior conversión del alcohol secundario libre en un grupo saliente adecuado, tal como un tosilato, seguido de sustitución con azida sódica, puede dar el compuesto E2 después de desprotección. Como alternativa, se puede eliminar el grupo protector después de conjugación, por ejemplo, después de conjugación mediante la reacción de ciclación [3+2], tal como se ilustra en el ejemplo 8.

EJEMPLO 8: Preparación de conjugado usando química "click" 3+2



5 A una solución de DSPE-PEG_{34K}-NH₂ (1,0 g, 0,24 mmol), piridina (5 ml, 62,1 mmol) y cloroformo (5 ml) se le añadió cloroformiato de propargilo (50 µl, 0,51 mmol). La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Se eliminó el cloroformo a presión reducida y el residuo resultante se diluyó con una solución 1:4 de EtOH:H₂O (20 ml). La solución que contenía el carbamato en bruto se cargó en una bolsa de diálisis 2000 MWCO y se dializó contra tampón MES (50 mM, 5 l) durante 12 h y dos veces contra agua (5 l) durante 12 h cada una. La solución se liofilizó y se obtuvo el producto (1,08 g, cuant.) en forma de un polvo de color gris, cuyo peso molecular se confirmó por MALDI.

15 Posteriormente, el producto (600 mg, 0,14 mmol) se añadió al compuesto A (84 mg, 0,27 mmol) en metanol (10 ml) seguido de la adición de THF (3 ml) y agua (2 ml). Posteriormente se añadieron ascorbato de sodio (27 mg, 0,14 mmol) y acetato de cobre (II) (2,7 mg, 0,014 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y el residuo resultante se diluyó con una solución 1:4 de EtOH:H₂O (20 ml). La solución que contenía el triazol en bruto se cargó en una bolsa de diálisis 2000 MWCO y se dializó contra tampón MES (50 mM, 5 l) y dos veces contra agua (5 l) durante 12 h cada una. La solución se liofilizó y se obtuvo el conjugado correspondiente (565 mg, 0,12 mmol, 87 %) en forma de un polvo incoloro.

20 **EJEMPLO 9:** Los compuestos i-xiii son hidrófilos en comparación con los compuestos anteriores

Las FIG. 1A, 1B, y 1C muestran valores y estructuras de CLogP para varios compuestos en forma de tabla, incluyendo los Compuestos i-xiii, y los compuestos conocidos de MeXO4, SB-13 y Florbetapir. CLogP es el logaritmo del coeficiente de partición para concentraciones relativas del compuesto en octanol frente a agua como Log[Conc., octanol/Conc. Agua]. Los valores más bajos de CLogP se corresponden con una mayor hidrofilia. Mientras que MeXO4 presenta alta afinidad por las placas amiloides, los presentes inventores razonaron que las estructuras de estilbenos en SB-13 y el Florbetapir clínicamente utilizado pueden proporcionar sensibilidad y especificidad en la unión. Además, los presentes inventores razonaron que los restos de benzotiazol o pirimidilo pueden generar análogos con CLogP más bajos y un mayor potencial de enlaces de H, en comparación con los compuestos conocidos. Además, el recubrimiento del nitrógeno con grupo(s) hidroxietilo podría aumentar aún más la hidrofilia y aumentar el potencial para que el ligando permanezca flotando en un medio acuoso externo al liposoma en lugar de insertarse en la bicapa lipídica

del liposoma. Por consiguiente, los compuestos tales como i-xiii por lo tanto, se idearon con modificaciones en la cadena lateral que generalmente se esperaba que aumentasen la hidrofilia del núcleo de estilbeno para mejorar la capacidad de un ligando para presentarse en una superficie de liposoma sin desestabilizar la bicapa. Los Compuestos i-xiii son cada uno más hidrofílicos que el compuesto anterior MeXO4 por varios órdenes de magnitud. Sin pretender

- 5 quedar ligados a teoría alguna, se cree que una mayor hidrofilia puede facilitar la interacción y la unión con las fibrillas beta amiloides, por ejemplo, aumentando la presencia de los compuestos correspondientes en el entorno hidrofílico fuera de los liposomas en una configuración disponible para la unión, aumentando las interacciones de unión con las fibrillas beta amiloides y similares.
- 10 Se seleccionaron grupos no iónicos como hidroxilo y metoxi para promover la hidrofilia sin aumentar el carácter iónico, debido a la preocupación de que un mayor carácter iónico puede reducir la permeabilidad de la BHE. Los compuestos i, ii, y iii tenían los tres valores más bajos de CLogP (1,56, 1,80 y 1,06, respectivamente). Las pruebas espectrofluorométricas mostraron que los compuestos ii y iii ambos tenían máximos de absorción y emisión a 404 nm y 550 nm, mientras que el compuesto i presentó un máximo de absorción a 346 nm sin un máximo de emisión visible.
- 15 Los Compuestos ii y iii pueden usarse para facilitar la detección por fluorescencia y valores CLogP relativamente bajos.

EJEMPLO 10: Síntesis de fibrillas A β

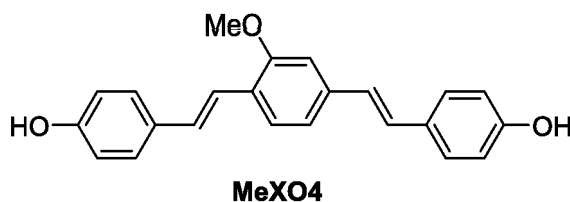
- Las fibrillas de A β se sintetizaron de acuerdo con el método de Klunk et al. Ann Neurol, 2004; 55: 306-19. En resumen,
- 20 el péptido A β (1-40) (péptido r, Bogart, GA) se disolvió en solución salina tamponada con fosfato, a pH 7,4 a una concentración final de 433 μ g/ml (100 μ M). La solución se agitó usando una barra de agitación magnética a 700 rpm durante 4 h a temperatura ambiente para impulsar la formación de fibrillas. La solución madre se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C para su futuro uso. Las soluciones madre se agitaron completamente antes de retirar alícuotas para ensayos de unión para mantener una suspensión homogénea de fibrillas. Las soluciones madre se agitaron
- 25 completamente antes de retirar alícuotas para ensayos de unión, para asegurar una suspensión homogénea de fibrillas.

EJEMPLO 11: Ensayos de unión del Compuesto ii, del Compuesto iii y del conjugado de DSPE-PEG-Compuesto iii

- 30 Ensayo de unión: La afinidad de unión de los compuestos o liposomas marcados con compuestos con las fibrillas amiloides se midió mediante los siguientes métodos. Liposomas marcados con ligando, las soluciones madre de ligando y la crisamina G para ensayos de competición se diluyeron con Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 a 500 nM. La solución madre de fibrillas se mezcló con una solución madre del compuesto o los liposomas marcados con el compuesto en una mezcla de reacción de 200 μ l para dar una concentración final de fibrillas (20 μ M) con compuestos de prueba que
- 35 varían de 0,0625 a 2,0 μ M. La mezcla de unión se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla de unión incubada se centrifugó durante 20 minutos a 16.400 rpm para separar las fibrillas. El precipitado de fibrillas se lavó dos veces con Tris-HCl. Luego se midió la fluorescencia en un lector de placas multimodal FilterMax F-5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), utilizando longitudes de onda de excitación y de emisión de 405 nm y 535 nm, respectivamente. Los ensayos de unión competitiva utilizaron 20 μ M de fibrillas, 1,0 μ M de compuestos de ensayo y cantidades variables del competidor no fluorescente, Crisamina G y se incubó durante 1 h.
- 40

- La FIG. 2 es un perfil de unión que muestra el enlace del Compuesto ii a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a la concentración en μ M. La FIG. 3 es un perfil de unión que muestra el enlace del Compuesto iii a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente
- 45 a la concentración en μ M.

- La FIG. 4 es un perfil de unión que muestra el enlace de MeXO4 (un compuesto anterior) a las fibrillas, representada gráficamente como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a la concentración en μ M. La síntesis, conjugación, formulación liposómica, y unión usando el compuesto anterior MeXO4 y otros compuestos relacionados, qué procedimientos pueden usarse con los presentes compuestos, conjugados y composiciones de liposomas, se describe
- 50 en Annapragada, et al., Solic. de Pat. de EE.UU. de Núm. de Ser. 13/441.816.



- 55 Tal como se muestra en las FIG. 2-4, los Compuestos ii y iii presentaron una unión mucho mayor en comparación con el compuesto anterior MeXO4. Por ejemplo, a una concentración de 1 μ M, el Compuesto ii se une a 35m de UFR, el Compuesto iii se une a 400k de UFR, mientras que el compuesto anterior MeXO4 se une a menos de 100k UFR.

- Las FIG. 5A-D ilustran aspectos de la unión de los Compuestos ii y iii. La FIG. 5A es un gráfico que muestra que
- 60 Compuestos ii y iii se unen a las fibrillas amiloides representado como unidad de fluorescencia relativa (UFR) frente a

concentración en μM . La FIG. 5B es un perfil de unión competitiva que muestra el enlace de los Compuestos ii y iii, cada uno unido de manera estable a las fibrillas en suspensión en competencia con Crisamina-G, representada como % unido frente a la concentración de crisamina-G en μM , coherente con la especificidad del sitio de unión a tioflavina. Esto demuestra que los Compuestos ii y iii de hecho son capaces de unirse a las placas amiloides, incluso siendo

5

relativamente hidrofílicos.

La FIG. 5C es una imagen de microscopía fluorescente que muestra que el Compuesto iii tiñe de manera específica las placas amiloides en una sección de tejido cerebral humano de la corteza frontal de un caso de autopsia de EA.

10 La FIG. 5D es una imagen de microscopía fluorescente que muestra que el Compuesto iii marca la angiopatía amiloide cerebral en tejido cerebral de perro anciano. Las imágenes se recogieron en un microscopio epifluorescente Olympus BX-51 utilizando el filtro de paso ancho. El marcaje verde representa el Compuesto iii mientras que el amarillo representa la autofluorescencia inespecífica. Las barras de escala representan 50 μm de longitud.

15 Las soluciones de Compuesto iii en PBS se incubaron con tejido de corteza frontal obtenido de la autopsia de un paciente de 88 años de edad con EA (la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Kentucky aprobó el uso de tejido humano para el estudio; se obtuvo el consentimiento informado antes de la autopsia) y un perro de 12,3 años de edad. Tanto los tejidos humanos como los caninos tenían patología amiloide de Alzheimer confirmada por estudios previos. Se montaron secciones de criostato de 50 μm de espesor en portaobjetos y se dejaron secar durante la noche.

20 Los portaobjetos se lavaron con PBS (3x5 min) y se incubaron en solución de Compuesto iii (1 mM) durante 2 horas y después se lavó de nuevo 3x5min en PBS, y se cubrió con un cubreobjetos en medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se obtuvieron imágenes de las secciones en un microscopio Olympus BX-51 con un filtro de paso ancho (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA).

25 La FIG. 6 es un perfil de unión competitiva que muestra el enlace del compuesto anterior MeXO4 y MeXO4 liposomal, cada uno a fibrillas en competencia con crisamina-G, representada como % unido frente a la concentración de crisamina-G en μM . Tal como se muestra en las FIG. 5A, 5B, y 6, los Compuestos ii y iii muestran una unión competitiva mucho mayor frente a la crisamina-G en comparación con el compuesto anterior MeXO4 o MeXO4 liposomal. Por ejemplo, a una concentración final de crisamina-G de 1 μM , el Compuesto ii estaba unido en un 45 % y el Compuesto iii estaba unido en un 55 %. Por el contrario, el compuesto anterior MeXO4 estaba unido un 20 % y el MeXO4 liposomal estaba unido aproximadamente un 5 %.

30

La FIG. 7A es un gráfico de perfiles de unión a liposomas marcados con compuesto, que muestra la cantidad del conjugado de DSPE-PEG-Compuesto iii unida a 20 μM de fibrillas, representada gráficamente frente a la concentración de DSPE-PEG-Compuesto iii en las composiciones de liposomas.

35

La FIG. 7B es un gráfico que muestra datos de unión de fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la constante de unión para el Compuesto ii a las fibrillas a $K_d = 5,0 \mu\text{M}$. La FIG. 7C es un gráfico que muestra datos de unión de fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la constante de unión para el Compuesto iii a las fibrillas a $K_d = 5,0 \mu\text{M}$. La FIG. 7D es un gráfico que muestra los datos de unión a fibrillas y un ajuste calculado para la estimación de la constante de unión para liposomas que llevan DSPE-PEG-Compuesto iii a fibrillas a $K_d = 3,3 \mu\text{M}$. La unión a las fibrillas se cuantificó midiendo la fluorescencia del respectivo agente de unión a las fibrillas lavadas. Los datos se ajustaron a una ecuación de unión de monócapa; $K_d = 1/K_b$.

40

45 EJEMPLO 12: Los ligandos hidrofílicos facilitan los liposomas estables

Para medir el tamaño de partícula, las muestras periódicas del proceso de extrusión y una muestra final después de la diafiltración se diluyeron en PBS y se midieron en un sistema de dispersión de luz dinámico basado en goniómetro (BI-90, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) conectado a un sistema de autocorrelación. Se usó un láser de estado sólido de 532 nm como fuente de luz, y la concentración de la muestra se ajustó hasta que la detección discriminada con un tubo fotomultiplicador a 90 ° produjo -100 k cuentas por segundo (kcps). Las funciones de correlación se midieron utilizando un conjunto de contenedores correlacionadores exponencialmente espaciados, asegurando al menos 10 canales que capturan la caída exponencial inicial de la función de correlación, y 10 canales que capturan la disminución a largo plazo. Las funciones de correlación se promediaron durante 2 minutos para cada muestra, utilizando un algoritmo de discriminación de polvo que eliminó los segmentos de la función de correlación que mostraron funciones de correlación a largo plazo significativamente más altas que la línea de base, lo que indica contaminación con partículas de gran tamaño características del polvo. Las funciones de correlación promediadas resultantes se analizaron usando el algoritmo CONTIN, y las distribuciones promediadas de volumen se usaron para estimar un tamaño medio y una desviación estándar. Todas las distribuciones fueron prácticamente unimodales (≥ 99 % del volumen en el pico principal).

55

60

La estabilidad de las preparaciones se midió en PBS y plasma bovino reconstituido (RBP). Una alícuota de la preparación se diluyó a 10x con PBS o RBP y se colocaron 200 μl del material diluido en una bolsa de diálisis, que a su vez se colocó en 200 ml de PBS y se agitó lentamente durante 24 horas. Se tomaron muestras del tampón externo periódicamente durante el período de 24 horas y se analizó el contenido de Gd por ICP-AES. La pérdida en plasma bovino fue <5 % tanto en tampón como en plasma bovino.

65

La FIG. 8 es una tabla que muestra los diámetros medios y los índices de polidispersidad de los liposomas preparados con uno de ligando de direccionamiento MeXO4, Compuesto iii, o liposomas PEGilados sin ligando. Todos los liposomas incluyeron bis-estearilamida-DTPA-Gd en la bicapa, Gd-BOPTA (gadobenato de dimeglumina) en el interior del núcleo del liposoma, DPPC (55 %) y colesterol (40 %). Los liposomas se prepararon por extrusión a través de membranas de grabado en pista, incluyendo 5 pasadas de extrusión a través de membranas de 400/200 nm y 5 pasadas de extrusión a través de membranas de 100 nm destinadas a dar un diámetro medio de alrededor de 100-150 nm y un bajo índice de polidispersidad, por ejemplo, como lo demuestran los liposomas PEGilados sin ligando.

Los liposomas de MeXO4 sin embargo, presentan un mayor diámetro y polidispersidad, consistente con la interferencia del ligando MeXO4 con la bicapa confirmada por microscopía electrónica de tinción negativa (véase también la FIG. 9A). La sustitución del ligando XO4 con Compuesto iii dio como resultado liposomas de menos de aproximadamente 150 nm de diámetro, con baja polidispersidad. En incubación con plasma bovino reconstituido a 37 °C durante 24 horas (prueba de pérdida de plasma), el Gd permaneció prácticamente asociado al 100 % con las partículas, lo que confirma que el ligando modificado produjo una bicapa estable. Se cree que los ligandos hidrófobos como MeXO4 vuelven a entrar en la bicapa y comprometen su integridad, tal como se refleja en el mayor diámetro de las partículas resultantes. Un ligando más hidrofílico como Compuesto iii mantiene mejor la integridad de la bicapa y el tamaño de las partículas después de la extrusión.

Preparación de liposomas: se compró 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y colesterol se compraron de Lipoid Inc., Newark NJ, EE.UU. El DSPE-PEG3400-Compuesto iii se preparó tal como se describió anteriormente. El 1,2-diesterail-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-MPEG2000) se adquirió de Corden Pharma, Liestahl, Suiza. El DPPC, el colesterol, el DSPE-MPEG2000, el bis-estearilamina-DTPA-Gd (BSA-DTPA-Gd) y el DSPE-PEG3400-Compuesto iii en proporciones molares DPPC:BSA-DTPA-Gd:colesterol:DSPE-MPEG2000:DSPE-PEG3400-Compuesto iii: 31:25:40:2:2 se disolvieron en etanol para alcanzar una concentración total de 150 mM. Se preparó una solución de ICG 65 µM en 500 mM de gadobenato de dimeglumina. La solución etanólica de lípidos se hidrató con un exceso de diez veces de la solución de ICG/gadobenato de dimeglumina a 65 °C durante 30 minutos, permitiendo que se formen liposomas multilamelares. La mezcla se extruyó luego en una extrusora Lipex de 10 ml (Northern Lipids Inc., Burnaby, Canadá) utilizando un filtro de grabado de policarbonato de 200 nm (10 pasadas) seguido de un filtro de policarbonato de 100 nm (10 pasadas). La suspensión se diafiltró luego usando un cartucho de diafiltración de flujo cruzado (umbral de 500 kD) MICROKROS® (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA), intercambiando el tampón externo por solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) para 15 intercambios de volumen.

El contenido de ICG se midió por fluorescencia de IR cercano (excitación de 780 nm/ emisión de 820 nm) en el diafiltrado en cada intercambio de volumen, y después del primer intercambio de volumen, prácticamente no se detectó ICG. La gran mayoría del ICG perdido por el retenido estaba presente en el primer intercambio de volumen. Del ICG inicial, se estimó que aproximadamente el 95 % permanecía asociado con los liposomas.

El contenido de fósforo y Gd del producto diafiltrado se midió usando espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Del Gd inicial, prácticamente el 100 % permaneció asociado con los liposomas.

La interferencia del ligando MeXO4 con la bicapa se confirmó por microscopía electrónica de tinción negativa. La FIG. 9A muestra imágenes del MET de tinción negativa de liposomas con DSPE-PEG-XO4 en la bicapa. La FIG. 9B muestra imágenes del MET de tinción negativa de liposomas con liposomas no dirigidos (estructura de bicapa idéntica, sin MeXO4). La tinción negativa utilizada fue acetato de uranilo al 1 %. Téngase en cuenta los esferoides involucrados e incompletos en la imagen de la izquierda, consistente con el ligando MeXO4 que interfiere e interrumpe la bicapa. Por el contrario, la ausencia de MeXO4 y la presencia de Compuesto iii lleva a estructuras esferoidales consistentes típicas de los liposomas.

La sustitución del ligando MeXO4 con Compuesto iii dio como resultado liposomas que una vez más estuvieron cerca de 100 nm de diámetro, con baja polidispersidad. Además, después de la incubación con plasma bovino reconstituido a 37 °C durante 24 horas, el Gd permaneció prácticamente asociado al 100 % con las partículas, lo que confirma que el ligando modificado produjo una bicapa estable.

EJEMPLO 13: Los liposomas del ejemplo demuestran una alta relaxividad molar de Gd a bajas intensidades de campo

Se prepararon liposomas junto con quelatos de Gd superficiales en la superficie de la bicapa lipídica (quelatos de Gd conjugados con un anclaje lipídico BSA-DTPA-Gd de manera que las cadenas de bis-estearilo se insertasen en la bicapa de los liposomas). Estos liposomas demostraron una alta relaxividad molar de Gd a intensidades de campo bajas como se muestra en la FIG. 10A. En la FIG. 10A, los liposomas del ejemplo se comparan con un quelato de Gd libre (gadobenato de dimeglumina, MULTIHANCE™, Bracco Imaging, Monroe Township, NJ) a intensidades de campo más bajas, pero la diferencia se reduce con intensidades de campo más altas hasta el punto en que a 9,4 T, el quelato libre es más relajante que la presentación superficial.

Sin embargo, a intensidades de campo más altas, esta mejora de la relaxividad se reduce, y a la mayor intensidad de campo probada (9,4 T), el Gd de superficie es menos relajante que el quelato libre. Aprovechando la mejora de la

relaxividad a bajas intensidades de campo, los presentes inventores probaron formulaciones con hasta un 25 % de la bicapa de liposomas que consiste en BSA-DTPA-Gd. Los liposomas eran estables, sin presentar una pérdida medible de Gd tras el almacenamiento en condiciones refrigeradas durante hasta 8 semanas. Las partículas resultantes tienen una relaxividad extremadamente alta por partícula, tal como se muestra en la FIG. 10B. Sobre una base de partículas, una relaxividad de $-190.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ se logró a 1 T.

Se realizaron mediciones de 1,5, 3, 4,7, 7 y 9,4 T en instrumentos de IRM individuales. La medida de 1,4 T se realizó en un relaxómetro Bruker Minispec MQ60 (Bruker, Billerica MA). Las mediciones de 1 T se realizaron en un instrumento de IRM de imán permanente Aspect M2 (Aspect Imaging, Shoham Israel). Las mediciones de T1 en el relaxómetro se realizaron a 37 °C, mientras que las mediciones en instrumentos de IRM se realizaron a temperatura estándar (18-20 °C).

Todos los experimentos con animales realizados en el Baylor College of Medicine fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Baylor. Todos los experimentos con animales en el MD Anderson Cancer Center fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la MDA. Todos los estudios cumplieron con los criterios NC3RS-ARRIVE. Los ratones Tg2576 se compraron de Taconic Biosciences, Inc., Hudson, NY. Los ratones TetO/APP fueron un amable regalo de la Dra. Joanna Jankowsky en Baylor College of Medicine. Todos los animales de control de APP fueron compañeros de camada no transgénicos de animales APP+ de la misma edad en este estudio. Todos los ratones Tg2576 fueron fotografiados en un sistema Bruker Icon 1.0T (Bruker Instruments, Billerica, MA) en el MD Anderson Cancer Center. Todos los ratones TetO/APP fueron fotografiados en un sistema Aspect M2 1.0T (Aspect Imaging, Shoham, Israel). Téngase en cuenta que estos dos instrumentos de escáner están contruidos en hardware idéntico, ambos fabricados por Aspect Imaging. Solo la interfaz del software es diferente. Todos los parámetros de imagen fueron idénticos en los dos instrumentos.

La anestesia se indujo en una caja de inhalación de isoflurano usando 5% de isoflurano en el aire. Luego, los ratones se colocaron en un trineo fabricado a medida con cono de cara integral para la administración continua de anestesia por inhalación (1,5-3% de isoflurano en aire) y se transfirieron a la cavidad del imán. Se obtuvo una imagen de antes del contraste utilizando una secuencia de eco de giro de corte múltiple en 2D con los siguientes parámetros: TE = 32 ms, TR = 770 ms, espesor de corte = 1,2 mm, FOV = 30 x 30 mm, matriz = 156 x 156, 24 cortes A-P y NEX = 2. Luego se permitió que los ratones despertaran y regresaron a sus jaulas. 24 horas después de la imagen de antes del contraste, los ratones APP+ y APP- en el grupo de prueba fueron inyectados con liposomas dirigidos al Compuesto iii específicos (concentración total de lípidos 150 mM, concentración total de Gd 37,5 mM, volumen de inyección 4 µl/g de peso corporal, 0,15 mmol Gd/kg), mientras que a los ratones APP+ en el grupo de control se les inyectó liposomas no dirigidos (es decir, sin Compuesto iii presente) con parámetros idénticos. 4 días después de la inyección, los ratones fueron anestesiados y se obtuvieron imágenes nuevamente usando una secuencia idéntica. La vida media de los liposomas PEGilados preparados en este estudio fue de aproximadamente 18 a 24 horas, y se eligió el intervalo de 4 días para facilitar la eliminación del agente no unido del torrente sanguíneo, para reducir la señal de fondo.

Se prepararon muestras con concentraciones de Gd de 0,25 a 1,0 mM diluyendo preparaciones liposomales en PBS. Las medidas de relajación de T1 se realizaron luego en un relaxómetro de sobremesa Bruker minispec MQ de 60 Hz (Bruker Instruments, Billerica, MA). Los tiempos de relajación longitudinal (T1) se obtuvieron usando una secuencia de recuperación de inversión. Una gráfica de la tasa de relajación (1/T1) frente a la concentración de Gd produjo una línea recta con pendiente definida como la relaxividad de T1 (r1). Para mediciones de relaxividad a intensidades de campo más altas (1,5 T a 9,4 T), se tomaron imágenes de las mismas muestras en los instrumentos de IRM correspondientes utilizando la secuencia de eco de gradiente estropeado rápido ponderado en T1 (FSPGR). La pendiente de 1/T1 frente a la gráfica de concentración se utilizó para estimar la relaxividad en cada intensidad de campo.

EJEMPLO 14: Imagen de placas amiloides de liposomas del ejemplo por IRM en ratones

Los liposomas de doble Gd, dirigidos a placas amiloides utilizando el ligando de Compuesto iii, se evaluaron por tanto para determinar su capacidad de formar imágenes de placas amiloides en ratones. Los liposomas de doble Gd/Compuesto iii se inyectaron por vía intravenosa en ratones y se escanearon 4 días después utilizando una secuencia de eco de giro potenciada en T1 (TE = 32 ms, TR = 770 ms) en un escáner de IRM de 1T. Los liposomas de doble Gd/Compuesto iii dieron como resultado una mejora de la señal, en patrones característicos de deposición amiloide, en dos cepas distintas de ratones portadores de amiloide (TetO/APPswe-ind de 15 meses y Tg2576 de 9 meses de vida). Los escaneos previos a la inyección de los mismos ratones y ratones amiloides negativos inyectados de manera similar, así como a los ratones amiloides positivos inyectados con una versión no dirigida de las mismas partículas (es decir, sin Compuesto iii) no produjeron señal en comparación. El retraso de 4 días se diseñó para permitir que los liposomas no unidos se eliminasen de la circulación. Los liposomas PEGilados tienen una vida media en circulación de aproximadamente 24 horas, y la experiencia previa sugirió que el retraso de 4 días era suficiente para la eliminación casi completa de los liposomas del grupo sanguíneo.

Histología: Inmediatamente después de que se adquirieron las imágenes de 4 días, los ratones fueron sacrificados por perfusión con solución salina seguido de formalina al 10%, se extirpó el cerebro y se sumergió en formol al 10 % durante 24 horas, luego se transfirió a sacarosa al 30 % y se refrigeró hasta que el cerebro se hundió (generalmente

unas 72 horas). La realización de imágenes de IRC (infrarrojo cercano) de todo el cerebro se realizó en esta etapa. El cerebro se embebió en solución de OCT y se almacenó a -80 °C antes del corte en serie. Las secciones se cortaron a 30 µm de grosor, se lavaron en solución salina tamponada con tris con tween al 0,2 %. Para la tinción de anticuerpos amiloides, las secciones se incubaron en suero de burro normal al 5 % durante 1 hora, seguido de la incubación con anticuerpo anti-amiloide β (4G8, de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en NDS al 3 % a 4 °C durante la noche. Después se lavaron las secciones, y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón dylight649 marcado con FITC o Cy5, se montaron y se cubrieron usando medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame CA) y se obtuvieron imágenes usando el conjunto de filtros apropiado.

Las imágenes ejemplares de este estudio se muestran en las FIG. 11A-F. La obtención de imágenes de RM ponderada en T1 de placas amiloides en modelos de ratón, antes y 4 días después de la inyección iv de un agente de nanopartículas de RM. Una secuencia 2D Spin-echo, (TE = 32 ms, TR = 770 ms, espesor de corte = 1,2 mm, FOV = 30 x 30 mm, matriz = 156 x 156, y NEX = 2) se utilizó. Se muestran cortes coronal en 2D del cerebro a través de la corteza y el hipocampo. La FIG. 11A representa los resultados para un ratón TetO/APPswe-ind, de 15 meses de vida, en donde la producción de APP fue suprimida hasta las 6 semanas de vida por doxiciclina en la dieta. La FIG. 11B representa los resultados de un escaneo previo a la inyección del ratón de la FIG. 11A. Las FIG. el 11C, D representan los resultados de un ratón Tg2576 (APPswe) de 9 meses de vida y un escaneo previo a la inyección del mismo ratón, respectivamente. La FIG. 11E representa los resultados para un ratón Tg2576 inyectado con partículas no dirigidas (sin unión a amiloide). La FIG. 11F representa los resultados para un hermano no transgénico del ratón de la FIG. 11E, inyectado con partículas direccionadas al amiloide. La señal total se asignó a un mapa de color "arcoiris" utilizando el programa informático Osirix (disponible en internet en <http://www.osirix-viewer.com/>). El rango del fondo azul predominante al primer plano verde representa un aumento de señal > 2x. El rango de verde a amarillo indica un aumento adicional de 2x. Los ratones Tg2576 de 9 meses de vida mostraron un patrón de marcado muy diferente (pial, hipocampo y alguna señal en los ventrículos) en comparación con los ratones TetO/APP más viejos, (señal cortical extensa y del hipocampo sin señal ventricular) lo que sugiere una eliminación lenta del LCR en el ejemplo de Tg2576. 6/6 animales en cada grupo fueron coherentes con estas imágenes, con la excepción de los animales Tg2576 APP+, de los cuales 2/6 mostraron este patrón de mejora. Los 4/6 restantes no mostraron mejora, y no se distinguió de los animales hermanos no transgénicos. La inmunohistoquímica usando el anticuerpo 4G8 contra Aβ, sin embargo, reveló que los 4 animales que no mostraron mejora tampoco tenían una patología amiloidea significativa en el cerebro.

Por lo tanto, hubo una correspondencia completa entre la presencia de depósitos de amiloide y la señal de IRM positiva, como se resume en forma de tabla en la FIG. 12. La FIG. 12 muestra la puntuación de la patología amiloide por inmunohistoquímica usando el anticuerpo 4G8, el agente de imagen utilizado (Compuesto iii direccionado o control no direccionado) y medidas individuales de presencia de nanopartículas en el cerebro del ratón. La puntuación semicuantitativa de las placas Aβ se realizó en una escala de cuatro niveles de 0 (ninguna), 1 (escaso), 2 (moderado) y 3 (grave/frecuente). La presencia de señal positiva para ICG, ligando, e IRM fue denotada por un "X" y la ausencia por un "-". Hubo una correlación cercana al 100 % entre los resultados de inmunohistoquímica y cada una de las medidas de presencia de nanopartículas. Los ratones APP+ de cualquiera de las cepas (TetO/APPswe o Tg2576) tratados con el agente direccionado mostraron una señal positiva en IRM, inmunohistoquímica y marcadores fluorescentes de presencia de nanopartículas, mientras que los ratones APP+ de cualquiera de las cepas tratadas con agente no dirigido no mostraron señal, y los ratones APP- no mostraron señal independientemente del tratamiento. Los datos son consistentes con el agente dirigido que puede acceder y unir las placas amiloides, mientras se elimina en ausencia de unión, y sin unión que se produce en ausencia del ligando de direccionamiento.

Las FIG. 13A-13Z representan 13 pares de imágenes de IRM representativas de los datos resumidos en la FIG. 12. Para cada par de imágenes, la imagen de la derecha es de antes del contraste y la imagen de la izquierda es de 3-4 días después del contraste. Todos los pares de imágenes se organizaron en el mismo nivel y ancho de ventana para proporcionar mapas de colores similares o idénticos. Cada par de imágenes se identifica con un ratón (cepa (TetO/APP o Tg2576), genotipo (APP+ o APP-) y el tratamiento (partículas direccionadas al Compuesto iii, o partículas no direccionadas).

EJEMPLO 15: Imagen de placas amiloides de liposomas del ejemplo por fluorescencia IR en ratones

Los liposomas también contenían ~ 0,6 % de moles de verde de indocianina (ICG) en la bicapa, para la obtención de imágenes de infrarrojo cercano. Las FIG. 14A-H4 muestran los resultados de imágenes de infrarrojo cercano de cerebros de ratones postmortem. Las imágenes confocales de secciones cerebrales de ratones Tg2576 revelaron una señal ICG mejorada en la corteza y el hipocampo de los ratones transgénicos, lo que demuestra una mayor localización en el cerebro de los APP+ (FIG. 14A) en comparación con los controles no transgénicos (FIG. 14B). A gran aumento, la FIG. 14E reveló la característica estructura puntiforme de los depósitos amiloides correspondientes a la FIG. 14A; la FIG. 14F se corresponde con los controles de la FIG. 14B.

Los cerebros completos de los ratones TetO/APP+ mostraron una mayor fluorescencia del infrarrojo cercano (FIG. 14C) que sus controles de hermanos de APP (FIG. 14D). Aumentó de manera uniforme la señal ICG localizada en el cerebro APP positivo (FIG. 14C), en comparación con la señal general más baja en el cerebro APP negativo (FIG. 14D) con puntos de acceso ocasionales correspondientes a ubicaciones de fuga vascular.

Usando un anticuerpo 4G8 marcado con fluorescencia contra la placa amiloide, la colocalización del anticuerpo (verde, FIG. 14G1), ICG (rojo) y Compuesto iii (azul) se demostró para un grupo de 3 placas (FIG. 13G1-G4) y para una placa individual (FIG. 13H1-H4). Como en el caso de la señal de IRM, la señal de fluorescencia también fue consistente con la medida inmunohistoquímica de la presencia de patología amiloide, tal como se resume en la FIG. 12. Estos resultados confirman que los liposomas de doble Gd dirigidos al Compuesto iii pueden penetrar la BHE, buscar las placas amiloides y generar suficiente potencia de señal para la detección utilizando resonancia magnética en la intensidad del campo clínico.

DISCUSIÓN

Los esfuerzos sintéticos se centraron en los tres compuestos en las FIG. 1A-1B con los valores más bajos de CLogP (Compuesto ii, Compuesto i y Compuesto iii). La síntesis y la purificación fueron eficaces, con rendimientos generales de alrededor del 90 %. El Compuesto ii y el Compuesto iii se analizaron para determinar la unión y especificidad de fibrillas amiloides, y arrojaron resultados muy similares, lo que sugiere que la capacidad de unión al amiloide no se ve afectada significativamente por la hidrofilia relativamente alta de estas moléculas. De hecho, en comparación con estudios similares realizados con MeXO4 las moléculas actuales parecen unirse a las fibrillas amiloides con mucha más fuerza que MeXO4, con solo alrededor del 60 % de las especies unidas desplazadas por crisamina G, en comparación con > 80 % para MeXO4. El Compuesto iii fue elegido como el candidato principal en función de su valor CLogP más bajo y su capacidad de unión amiloide marginalmente más alta.

La hidrofilia del Compuesto iii llevó a la formación de liposomas estables, sin comprometer la bicapa, como se indica en la FIG. 8. Los liposomas con lípidos saturados y colesterol en la bicapa, cuando se extruyen a través de membranas de 100 nm, dan como resultado liposomas con un diámetro de alrededor de 100 nm. Los tamaños de partícula considerablemente mayores que 100 nm están asociados con la desestabilización de la bicapa, la fusión de vesículas y la formación de estructuras multilamelares, tal como se demuestra con los liposomas de MeXO4 en la FIG. 8 y la FIG. 9. El ligando MeXO4 relativamente hidrófobo, cuando está unido a la superficie de un liposoma por un enlace de PEG flexible, se cree que puede dividir la bicapa, teniendo en cuenta el compromiso en la estabilidad de la bicapa demostrado con los liposomas de MeXO4 en la FIG. 8 y la FIG. 9A. Al reemplazar el ligando MeXO4 con el ligando más hidrofílico del Compuesto iii, se eliminó o redujo cualquier propensión a que el ligando se dividiera en la bicapa, teniendo en cuenta la integridad de la bicapa retenida demostrada por los datos en la FIG. 8 observada para liposomas específicos del Compuesto iii.

La capacidad de Compuesto iii para unirse a la patología amiloide se probó utilizando tejido cerebral humano obtenido de la autopsia de un paciente humano de 88 años de edad con EA. El Compuesto iii tiñe claramente el tejido humano en un patrón focal consistente con la tinción de las placas amiloides (FIG. 5C). Los perros ancianos son un modelo natural de deposición beta-amiloide e incubación de una sección de la corteza frontal de un beagle de 12,3 años en Compuesto iii también mostró marcaje de CAA (FIG. 5D).

Para construir una nanopartícula con suficiente señal T1 para permitir la visualización de placas amiloides, los presentes inventores adoptaron la presentación de doble Gd demostrada previamente para inducir una mayor relaxividad de Gd. La conjugación de quelatos de Gd con un anclaje de bis-estearilamida insertado en la bicapa puede retrasar la correlación rotacional del átomo de Gd, aumentando así el tiempo de correlación rotacional T_R . El aumento de los tiempos de correlación rotacional de los quelatos de Gd puede llevar a un pico en la relaxividad de T1 a bajas intensidades de campo, alrededor de 1T, mientras que esta mejora puede reducirse en gran medida, y eventualmente puede revertirse a intensidades de campo mayores > 7T. Esto es consistente con el comportamiento observado (FIG. 10A). La relaxividad de T1 de la superficie liposómica de Gd (sobre una base molar de Gd) fue de 2,5 veces mayor que la de un quelato molecular libre a 1,4T y 1,5T, pero en campos más altos, el quelato molecular libre presentó una mayor relaxividad. Por consiguiente, se analizó la relaxividad y la generación de imágenes *in vivo*. Las imágenes se probaron con una intensidad de campo baja (1T).

Cuando un liposoma dirigido (como el liposoma dirigido al Compuesto iii considerado en el presente documento) puede unirse a una diana molecular (como la estructura de la lámina beta de una placa amiloide), cada diana molecular puede estar asociada con un liposoma completo, y la señal correspondiente en la imagen de RM puede ser atribuible a todo el liposoma. Por lo tanto, la relaxividad en una base molar de liposoma puede estar relacionada linealmente con la señal asociada con la diana molecular. La relaxividad de los liposomas de Gd de superficie se midió, por lo tanto, sobre una base molar de liposoma, en función del aumento de la concentración de quelatos de Gd en la bicapa de liposomas. Los resultados en la FIG. 10B muestran una dependencia lineal esperada de la relaxividad en el número de quelatos de Gd en la bicapa. Al 25 % de las moléculas de bicapa que llevan un quelato de Gd, se estimó que la relaxividad de T1 por partícula era de alrededor de 190.000 mM⁻¹s⁻¹. Para partículas de ~120 nm de diámetro, esto puede corresponder a aproximadamente 48.000 quelatos de Gd por partícula, de los cuales la mitad puede estar en la lámina externa de la bicapa de liposomas, y la mitad puede estar en la lámina interna. Suponiendo que el Gd de la lámina interna no es sustancialmente activo para la relaxividad de T1 mientras que los quelatos externos lo son, esto sugiere una relaxividad molar por Gd de aproximadamente 8 mM⁻¹s⁻¹, del mismo orden que la medida con el relaxómetro a 1,4T (FIG. 10A).

Tras la administración por inyección en el torrente sanguíneo, los liposomas dirigidos al Compuesto iii parecían cruzar

con avidez la barrera hematoencefálica y unirse a las placas amiloides (FIG. 11A-F). Tal permeabilidad de la barrera hematoencefálica fue consistente con observaciones pasadas de la capacidad de los liposomas dirigidos a MeXO4 para cruzar la BHE y marcar las placas amiloides en el modelo de EA en ratón APP/PSEN1. Asimismo, las observaciones anteriores demostraron la capacidad de los liposomas no dirigidos para cruzar la BHE en el modelo de EA en TetO/APP, y demostraron una pérdida significativa a través de la BHE de forma dependiente de la edad y dependiente del amiloide. Si bien todos los ratones probados mostraron pérdidas en el plexo coroideo, los ratones mayores (> 14 meses de vida) mostraron una pérdida significativamente mayor a lo largo de los principales vasos sanguíneos, mientras que los ratones APP+ mostraron una mayor pérdida en la corteza cerebral. Los ratones TetO/APP en el presente estudio tenían > 14 meses de vida y mostraron una señal más extendida en el cerebro, mientras que los ratones Tg2576 tenían todos 9-10 meses de vida y mostraron menos señal, concentrados alrededor de los vasos piales y corticales. Además, mientras que 6/6 ratones TetO/APP mostraron una señal clara en el cerebro, consistente con la localización del agente direccionado, solo 2/6 animales Tg2576 mostraron una clara señal cerebral. Inmunohistoquímicamente, sin embargo, los mismos 2/6 animales Tg2576 presentaron patología amiloide, mientras que el 4/6 restante no lo hizo.

La confirmación de la localización de las partículas en las placas amiloides proviene de los datos en las FIG. 14A-H4. Las imágenes de IR cercano del cerebro completo que visualizan el marcador de Indocianina (FIG. 14C-D) fueron consistentes con una mayor localización en los cerebros APP+ en comparación con los cerebros APP-. Los cortes a través de la corteza y el hipocampo de los ratones APP+ y APP- (FIG. 14A-B) mostraron una localización significativa en el cerebro APP+, con la máxima intensidad observada en la corteza cerebral y partes del hipocampo. También se observó una tinción significativa en el tálamo, y fue consistente con la señal talámica en la imagen de RM (FIG. 14C) del mismo ratón. Bajo gran aumento (FIG. 14E-F) de la corteza cerebral, se vio que la señal ICG en el cerebro del ratón APP+ era puntiaguda, consistente con el marcaje de las placas focales, y a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos, consistente con el marcaje de CAA.

El examen histológico detallado de placas focales individuales (FIG. 14G1-H4) en la corteza cerebral revelan que las partículas direccionadas al ligando parecían marcar las secciones densas y difusas de la placa. En las FIG. 14G1-H4, el anticuerpo 4G8, visualizado con FITC está marcado en verde, el ICG está marcado en rojo, mientras que el ligando de Compuesto iii está marcado en azul. Las FIG. 14G1-G4 muestra un campo con 3 placas focales visibles. También en el campo hay un patrón de deposición amiloide circundante más difuso. El anticuerpo 4G8 marca estas dos entidades. Las placas focales parecían tener una densidad amiloide relativamente uniforme en el centro y una densidad más alta en la periferia, consistente con numerosas otras observaciones de placas en ratones usando anticuerpos y tinción con tioflavina-S. Los marcadores de ICG y Compuesto iii (rojo y azul, respectivamente) están bien correlacionados entre sí y con el marcador del anticuerpo, lo que demuestra una baja densidad de unión en el centro de las placas y nódulos de alta densidad en la periferia, dejando pocas dudas de que las partículas liposomales se unen intactas a las placas y marcan tanto las placas focales de alta densidad como las placas difusas de menor densidad.

Se observaron algunas diferencias en los patrones de señal de IRM entre los ratones TetO/APP y Tg2576, con el primero mostrando señal en la corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado, consistente con el depósito de amiloide preferencial en estas áreas debido a la actividad heterogénea del promotor CaMKII α . Se observó un patrón de deposición más completo en los ratones Tg2576, consistente con una deposición de placa más uniforme. Los ratones Tg2576 también mostraron una fuerte señal ventricular que puede deberse a la presencia continua del agente en el líquido cefalorraquídeo, el medio de transporte probable para los liposomas extravasados.

Los liposomas penetran en la BHE en modelos de ratones de deposición amiloide y enfermedad de Alzheimer como se demostró colectivamente anteriormente y en el presente documento en 3 modelos diferentes de ratones, APP/PSEN1, TetO/APP y Tg2576. Esta penetración en la BHE no requiere ningún mecanismo de transporte activo porque el trabajo previo demostró que los liposomas PEGilados simples se transportan fácilmente a través de la BHE. La retención de liposomas en los sitios de deposición amiloide, durante períodos prolongados de tiempo, sin embargo, depende de la unión a un objetivo molecular. El uso de MeXO4 como el ligando de unión en el trabajo anterior de los presentes investigadores demostró la unión a las placas amiloides y la visualización *ex vivo* por microscopía. Como se demostró usando Compuesto iii en el presente documento, el uso de nuevos ligandos dirigidos lleva a liposomas con integridad de bicapa mejorada, y la consecuente encapsulación de grandes cantidades de quelatos de Gd. Estos quelatos de Gd, presentados en la superficie del liposoma, fueron hiperrelaxivos a intensidades de campo bajas (~ 1T), y proporcionaron una relaxividad por partícula de -190.000 mM⁻¹.s⁻¹, suficiente para permitir su visualización *in vivo* utilizando IRM ponderada en T1. Por tanto, se visualizaron placas amiloides en dos modelos diferentes de ratones (Tg2576 y TetO/APP).

Se cree que los presentes métodos, ligandos, conjugados y liposomas facilitan fácilmente el cruce de la BHE en humanos. Se sabe por los estudios de IRM realizados en pacientes con EA y DCL que la BHE realmente se compromete y el grado de compromiso es independiente de la carga amiloide. Asimismo, un estudio reciente con DCE-MRI confirmó que la BHE en el hipocampo humano envejecido se descompone y se vuelve permeable. La confirmación de que el agente se une a una patología amiloidea que no sea en un modelo de sobreexpresión de ratón se demuestra en el presente documento al probar la unión a depósitos amiloides en cortes de cerebro de perro y cerebro humano. *in vitro*. Por consiguiente, los presentes métodos, ligandos, conjugados y liposomas pueden funcionar

en humanos.

La presente solicitud demuestra la generación de imágenes de IRM de placas amiloides en modelos de roedores con intensidades de campo clínicamente aceptables, que se cree que se extiende al análisis de placas y al diagnóstico de EA en humanos. La generación de imágenes por IRM descrita puede ofrecer una serie de beneficios sustanciales sobre las tecnologías de imagen no invasivas actuales, tales como imágenes de TEP, incluyendo mayor disponibilidad, coste reducido y resolución mejorada. La disponibilidad de agentes de TEP conocidos aprobados para la obtención de imágenes de placas amiloides pueden estar limitados y restringidos a grandes centros médicos académicos. Por el contrario, el trabajo descrito en el presente documento puede ofrecer disponibilidad mundial. Además, los agentes de T1 pueden ser extremadamente atractivos debido a su señal positiva, que lleva a una mayor confianza en la interpretación de la señal. El trabajo descrito en el presente documento está destinado a su uso en escáneres de campo bajo (1-3T) consistentes con los escáneres de IRM de última generación para imágenes humanas.

Además de analizar la placa amiloide, el trabajo en el presente documento puede usarse junto con un marcador secundario, tal como la identificación de ovillos neurofibrilares de Tau, para diagnosticar la EA.

En la medida en que el término "incluye" o "que incluye" se usa en la memoria descriptiva o las reivindicaciones, se pretende que sea inclusivo de un modo similar al término "que comprende", ya que ese término se interpreta cuando se emplea como una palabra de transición en una reivindicación. Además, en la medida en que el término "o" se emplea (por ejemplo, A o B) este pretende indicar "A o B o ambos". Cuando se pretende "solamente A o B pero no ambos", entonces deberá emplearse la expresión "solamente A o B pero no ambos". Por lo tanto, el uso del término "o" en el presente documento es el uso inclusivo y no el uso exclusivo. Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen el plural. Finalmente, donde se usa el término "aproximadamente" junto con un número, este pretende incluir $\pm 10\%$ del número. Por ejemplo, "aproximadamente 10" puede significar de 9 a 11.

En general, "sustituido" se refiere a un grupo orgánico tal como se define a continuación (por ejemplo, un grupo alquilo) en el que uno o más enlaces a un átomo de hidrógeno contenidos en el mismo se reemplazan por un enlace a átomos que no son de hidrógeno o de carbono. Los grupos sustituidos también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a un átomo o átomos de carbono o hidrógeno se sustituyen por uno o más enlaces, incluyendo dobles o triples enlaces, a un heteroátomo. Por lo tanto, un grupo sustituido está sustituido con uno o más sustituyentes, a menos que se indique otra cosa. En algunas realizaciones, un grupo sustituido está sustituido con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituyentes. Los ejemplos de grupos sustituyentes incluyen: halógenos (es decir, F, Cl, Br y I); hidroxilos; grupos alcoxi, alquenoxi, ariloxi, aralquiloxi, heterociclioxi y heterociclilalcoxi; carbonilos (oxo); carboxilos; ésteres; uretanos; oximas; hidroxilaminas; alcoxiaminas; aralcoxiaminas; tioles; sulfuros; sulfóxidos; sulfonas; sulfonilos; sulfonamidas; aminas; N-óxidos; hidrazinas; hidrazonas; azidas; amidas; ureas; amidinas; guanidinas; enamidas; imidas; isocianatos; isotiocianatos; cianatos; tiocianatos; iminas; grupos nitro; nitrilos (es decir, CN) y similares.

Los grupos de anillo sustituido tales como grupos cicloalquilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo sustituido también incluyen anillos y sistemas de anillos en los que un enlace a un átomo de hidrógeno se sustituye con un enlace a un átomo de carbono. Por lo tanto, los grupos cicloalquilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo sustituidos también pueden estar sustituidos con grupos alquilo, alqueno y alquino sustituidos o sin sustituir tal como se define a continuación.

Los grupos alquilo incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono y típicamente de 1 a 10 carbonos o, en algunas realizaciones, de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal incluyen grupos tales como grupo metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo. Los ejemplos de grupos alquilo ramificado incluyen, pero sin limitación, grupos isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, neopentilo, isopentilo y 2,2-dimetilpropilo. Los grupos alquilo sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente e incluyen, sin limitación, haloalquilo (por ejemplo, trifluorometilo), hidroxialquilo, tioalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, alcoxialquilo, carboxialquilo y similares.

Los grupos cicloalquilo incluyen grupos alquilo mono, bi o tricíclicos que tienen de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo o anillos o, en algunas realizaciones, de 3 a 10, de 3 a 8 o de 3 a 4, 5 o 6 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo monocíclicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo tiene de 3 a 8 miembros en el anillo, mientras que en otras realizaciones, el número de átomos de carbono en el anillo varía de 3 a 5, de 3 a 6 o de 3 a 7. Los sistemas de anillo bi y tricíclicos incluyen grupos cicloalquilo tanto grupos cicloalquilo puenteados como anillos condensados, tales como, pero sin limitación, biciclo[2.1.1]hexano, adamantilo, decalinilo y similares. Los grupos cicloalquilo sustituidos pueden estar sustituidos una o más veces con grupos que no son de hidrógeno o de carbono, tal como se ha definido anteriormente. Sin embargo, los grupos cicloalquilo sustituidos también incluyen anillos que están sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal o ramificada tal como se ha definido anteriormente. Los grupos cicloalquilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tal como, pero sin limitación, grupos ciclohexilo 2,2-, 2,3-, 2,4-, 2,5- o 2,6-disustituidos, que pueden estar sustituidos con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos arilo son hidrocarburos aromáticos cíclicos que no contienen heteroátomos. Los grupos arilo del presente documento incluyen sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Por lo tanto, los grupos arilo incluyen, pero sin limitación, grupos fenilo, azuleno, heptaleno, bifenilo, fluoreno, fenantreno, antraceno, indeno, indano, pentaleno y naftilo. En algunas realizaciones, los grupos arilo contienen de 6 a 14 carbonos y en otros de 6 a 12 o incluso de 6 a 10 átomos de carbono en las porciones de anillo de los grupos. En algunas realizaciones, los grupos arilo son fenilo o naftilo. Aunque la frase "grupos arilo" incluye grupos que contienen anillos condensados, dichos sistemas de anillo aromático-alifático condensados (por ejemplo, indano, tetrahidronaftilo y similares), no incluyen grupos arilo que tengan otros grupos, tales como grupos alquilo o halo, unidos a uno de los miembros del anillo. Más bien, grupos tales como tolo se denominan grupos arilo sustituidos. Los grupos arilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez. Por ejemplo, los grupos arilo monosustituidos incluyen, pero sin limitación, grupos fenilo o naftilo sustituidos en 2, 3, 4, 5 o 6, que pueden estar sustituidos con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos aralquilo son grupos alquilo tal como se han definido anteriormente en los que un átomo de hidrógeno o carbono unido a un grupo alquilo se sustituye con un enlace a un grupo arilo como se ha definido anteriormente. En algunas realizaciones, los grupos aralquilo contienen de 7 a 16 átomos de carbono, de 7 a 14 átomos de carbono o de 7 a 10 átomos de carbono. Los grupos aralquilo sustituidos pueden estar sustituidos en las porciones alquilo, arilo o ambas alquilo y arilo del grupo. Los grupos aralquilo representativos incluyen, pero sin limitación, grupos bencilo y fenilo y grupos alquil(cicloalquil)condensados tales como 4-indaniletilo. Los grupos aralquilo sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos heterocíclicos incluyen compuestos de anillo aromáticos (también denominados heteroarilo) y no aromáticos, que contienen 3 o más miembros en el anillo de los que uno o más es un heteroátomo tal como, pero sin limitación, N, O y S. En algunas realizaciones, el grupo heterocíclico contiene 1, 2, 3 o 4 heteroátomos. En algunas realizaciones, los grupos heterocíclicos incluyen anillos mono, bi y tricíclicos que tienen de 3 a 16 miembros en el anillo, mientras que otros de dichos grupos tienen de 3 a 6, de 3 a 10, de 3 a 12 o de 3 a 14 miembros en el anillo. Los grupos heterocíclicos incluyen sistemas de anillos aromáticos, parcialmente insaturados y saturados, tales como, por ejemplo, grupos imidazolilo, imidazolinilo e imidazolidinilo. La expresión "grupo heterocíclico" incluye especies de anillos condensados que incluyen las que comprenden grupos condensados aromáticos y no aromáticos, tales como, por ejemplo, benzotriazolilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxinilo y benzo[1,3]dioxolilo. La expresión también incluye sistemas de anillos policíclicos puenteados que contienen un heteroátomo, tales como, pero sin limitación, quinuclidilo. Sin embargo, la frase no incluye grupos heterocíclicos que tienen otros grupos, tales como grupos alquilo, oxo o halo, unidos a uno de los miembros del anillo. Más bien, estos se denominan "grupos heterocíclicos sustituidos". Los grupos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, grupos aziridinilo, azetidino, pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrofuranilo, dioxolilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, pirazolilo, pirazolinilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiazolinilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, oxatiano, dioxilo, ditiano, piranilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, dihidropiridilo, dihidroditiinilo, dihidroditiinilo, homopiperazinilo, quinuclidilo, indolilo, indolinilo, isoindolilo, azaindolilo (pirrolopiridilo), indazolilo, indolizino, benzotriazolilo, benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo, benzoditiinilo, benzoxatiinilo, benzotiazinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[1,3]dioxolilo, pirazolopiridilo, imidazopiridilo (azabenzimidazolilo), triazolopiridilo, isoxazolopiridilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinolizino, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, pteridinilo, tianaftilo, dihidrobenzotiazinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidroindolilo, dihidrobenzodioxinilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroindazolilo, tetrahidrobenzoimidazolilo, tetrahidrobenzotriazolilo, tetrahidropirrolopiridilo, tetrahidropirazolopiridilo, tetrahidroimidazopiridilo, tetrahidrotriazolopiridilo y tetrahidroquinolinilo. Los grupos heterocíclicos sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, pero sin limitación, los grupos piridilo o morfolinilo, que están sustituidos en 2, 3, 4, 5 o 6 o disustituidos con diversos sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos heteroarilo son compuestos de anillo aromático que contienen 5 o más miembros en el anillo, de los cuales uno o más es un heteroátomo tal como, pero sin limitación, N, O y S. Los grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, grupos tales como grupos pirrolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, tiofenilo, benzotiofenilo, furanilo, benzofuranilo, indolilo, azaindolilo (pirrolopiridinilo), indazolilo, benzoimidazolilo, imidazopiridinilo (azabenzimidazolilo), pirazolopiridinilo, triazolopiridinilo, benzotriazolilo, benzoxazolilo, benzotiadiazolilo, imidazopiridinilo, isoxazolopiridinilo, tianaftilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, quinoxalinilo y quinazolinilo. Los grupos heteroarilo incluyen compuestos de anillos condensados en los cuales todos los anillos son aromáticos tales como los grupos indolilo e incluyen compuestos de anillos condensados en los cuales solamente uno de los anillos es aromático, tales como los grupos 2,3-dihidroindolilo. Aunque la frase "grupos heteroarilo" incluye compuestos de anillos condensados, la frase no incluye grupos heteroarilo que tengan otros grupos unidos a uno de los miembros del anillo, tal como grupos alquilo. Más bien, los grupos heteroarilo con dicha sustitución se denominan "grupos heteroarilo sustituidos". Los grupos heteroarilo sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con diversos sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos heteroaralquilo son grupos alquilo tal como se han definido anteriormente en los que un enlace de hidrógeno o carbono de un grupo alquilo se sustituye con un enlace a un grupo heteroarilo tal como se ha definido anteriormente. Los grupos heteroaralquilo sustituidos pueden estar sustituidos en las porciones alquilo, heteroarilo o ambas alquilo y heteroarilo del grupo. Los grupos heteroaralquilo sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

Los grupos descritos en el presente documento que tienen dos o más puntos de unión (es decir, divalentes, trivalentes o polivalentes) dentro del compuesto de la tecnología, se denominan mediante el uso de un sufijo, "eno". Por ejemplo, los grupos alquilo divalentes son grupos alquilenos, los grupos arilo divalentes son grupos arilenos, los grupos heteroarilo divalentes son grupos heteroarilenos, etc. Los grupos sustituidos que tienen un único punto de unión al compuesto de la tecnología no se denominan usando la designación "eno". Por lo tanto, por ejemplo, cloroetilo no se denomina en el presente documento como cloroetileno.

Los grupos alcoxi son grupos hidroxilo (-OH) en los que la unión al átomo de hidrógeno está sustituida por un enlace a un átomo de carbono de un grupo alquilo sustituido o sin sustituir tal como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos alcoxi lineales incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentoxi, hexoxi y similares. Los ejemplos de grupos alcoxi ramificados incluyen, pero sin limitación, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, isopentoxi, isohexoxi y similares. Los ejemplos de grupos cicloalcoxi incluyen, pero sin limitación, ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, ciclohexiloxi y similares. Los grupos alcoxi sustituidos representativos pueden estar sustituidos una o más veces con sustituyentes tales como los enumerados anteriormente.

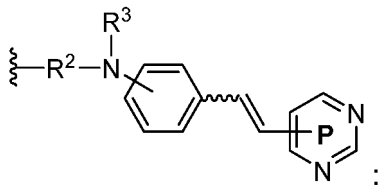
El término "amina" (o "amino"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos NR^aR^b , en donde R^a y R^b son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilalquilo o heterociclilo sustituido o sin sustituir tal como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, la amina es alquilamino, dialquilamino, arilamino o alquilarilamino. En otras realizaciones, la amina es NH_2 , metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, propilamino, isopropilamino, fenilamino o bencilamino. El término "alquilamino" se define como NR^cR^d , en donde al menos uno de R^c y R^d es alquilo y el otro es alquilo o hidrógeno. El término "arilamino" se define como NR^eR^f , en donde al menos uno de R^e y R^f es arilo y el otro es arilo o hidrógeno.

El término "halógeno" o "halo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo. En algunas realizaciones, el halógeno es flúor. En otras realizaciones, el halógeno es cloro o bromo.

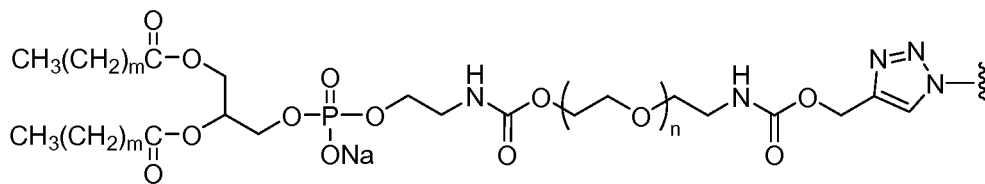
REIVINDICACIONES

1. Una composición liposomal que comprende:
una membrana, que comprende:

un conjugado fosfolípido-polímero-aromático,
estando el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



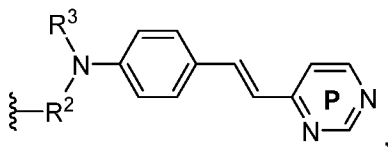
y
estando el resto fosfolípido-polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



en donde:

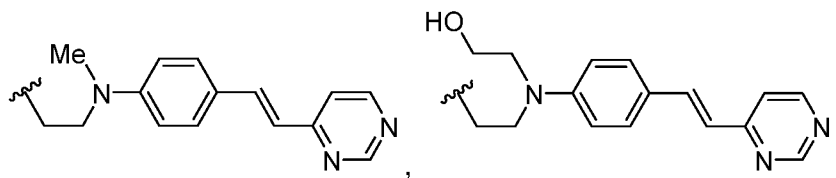
R^2 es un grupo de unión que comprende de 1 a 6 átomos de carbono que es uno de: alquileo o alcoxialquileo;
 R^3 es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcoxialquilo C_1-C_6 y R^3 distinto de hidrógeno está sustituido con cero, uno o más -OH;
pirimidina P está sustituida con cero, uno o más de -OH, -O-alquilo y -NH₂;
n es un número entero de aproximadamente 60 a aproximadamente 100; y
m es uno de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

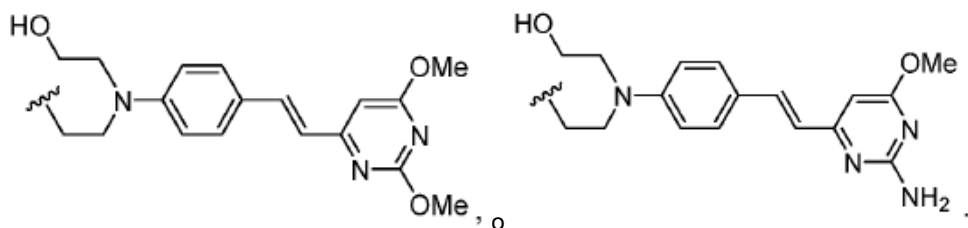
2. La composición liposomal de la reivindicación 1, estando el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



estando la pirimidina P sustituida con cero, uno o dos de -OH, -OMe o -NH₂.

3. La composición liposomal de la reivindicación 1, estando el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por uno de:



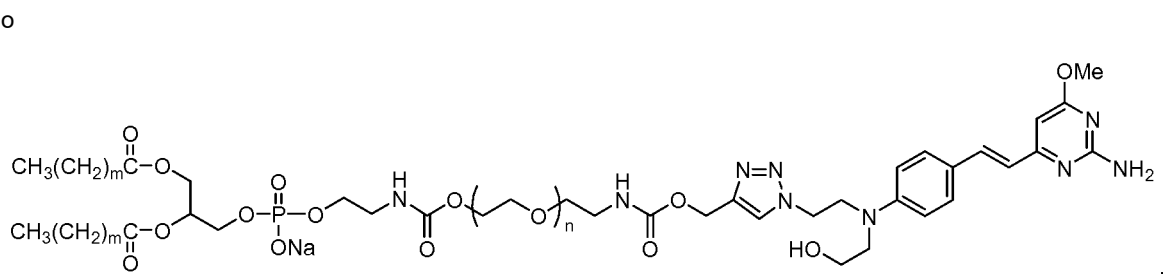
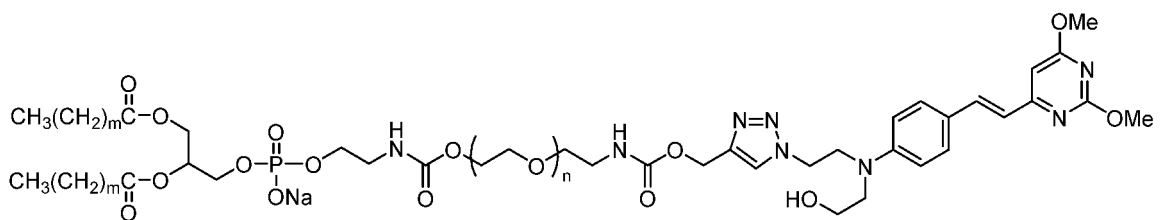
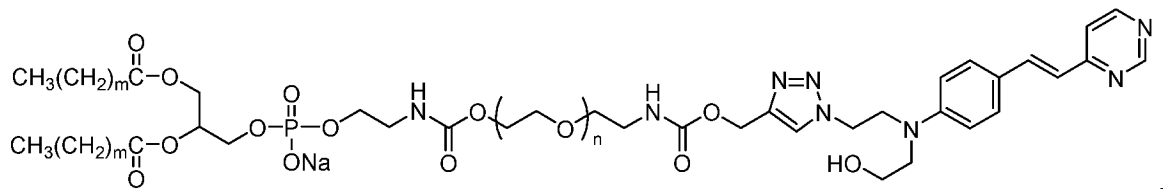
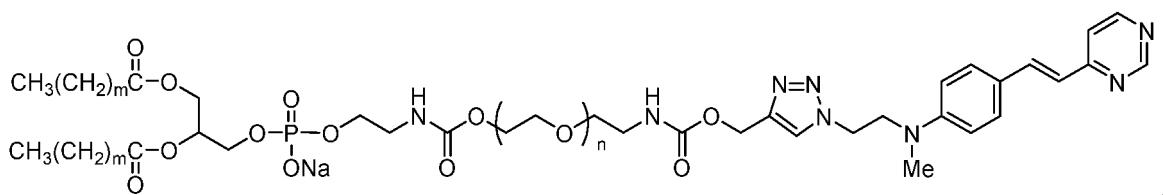


4. La composición liposomal de la reivindicación 1, que comprende además un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo que está al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana.

5. La composición liposomal de la reivindicación 1, comprendiendo además la membrana un primer fosfolípido y un segundo fosfolípido, estando el segundo fosfolípido derivatizado con un polímero hidrófilo.

6. La composición liposomal de la reivindicación 1, comprendiendo además la membrana:

DPPC;
colesterol;
ácido dietilnotriaminapentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio;
1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]; y
estando el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:



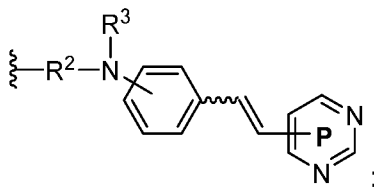
siendo n un número entero de aproximadamente 70 a aproximadamente 90; y
siendo m 14 o 16.

7. Una composición liposomal para su uso en un método para formación de imágenes de depósitos amiloides en un paciente, comprendiendo el método:

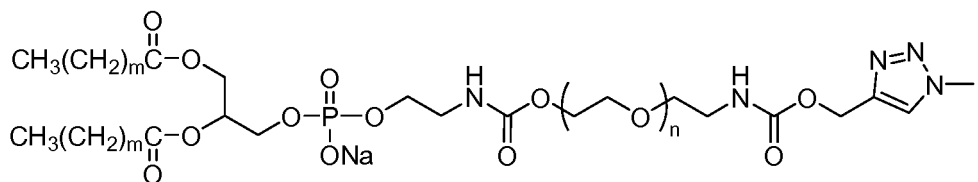
introducir en el paciente una cantidad detectable de composición liposomal, comprendiendo la composición liposomal:

una membrana, que comprende:

un conjugado fosfolípido-polímero-aromático, estando el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



y estando el resto fosfolípido-polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



en donde:

R^2 es un grupo de unión que comprende de 1 a 6 átomos de carbono que es uno de: alquileo o alcóxialquileo; R^3 es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o alcóxialquilo C_1-C_6 y R^3 distinto de hidrógeno está sustituido con cero, uno o más -OH; pirimidina P está sustituida con cero, uno o más de -OH, -O-alquilo y -NH₂; n es un número entero de aproximadamente 60 a aproximadamente 100; m es uno de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18;

un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana;

permitiendo tiempo suficiente para que la composición liposomal se asocie con el uno o más depósitos amiloideos; y detectando la composición liposomal asociada con el uno o más depósitos amiloideos.

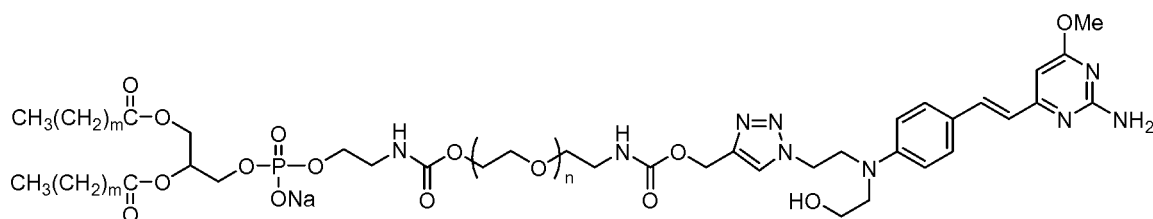
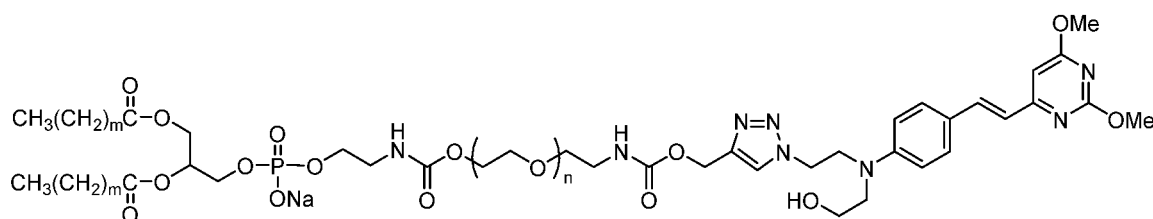
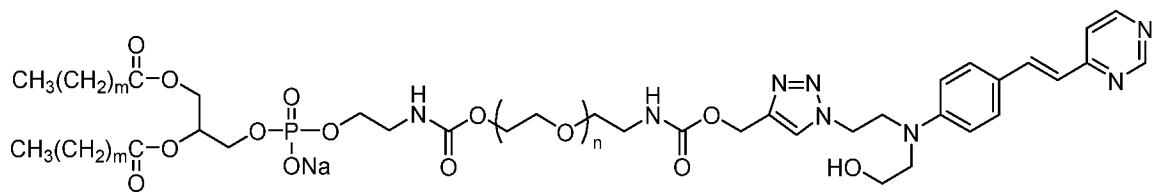
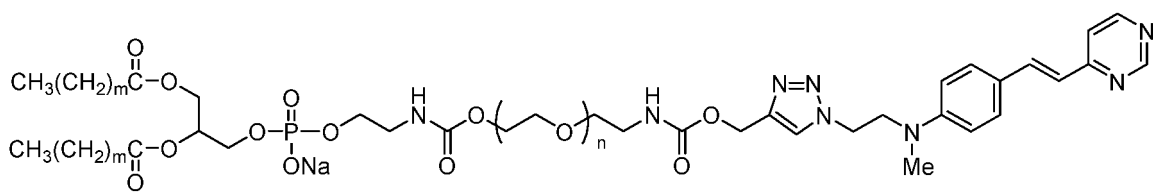
8. La composición liposomal para su uso en un método para la formación de imágenes de depósitos amiloideos de la reivindicación 7, comprendiendo la detección usando formación de imágenes por resonancia magnética.

9. La composición liposomal para su uso en un método para la formación de imágenes de depósitos amiloideos de la reivindicación 7, estando el agente potenciador de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) no radiactivo encapsulado por y unido a la membrana.

10. La composición liposomal para su uso en un método para obtener imágenes de depósitos amiloideos de la reivindicación 9, la composición liposomal caracterizada por la relaxividad por partícula en $mM^{-1}s^{-1}$ de al menos aproximadamente uno o más de aproximadamente: 100.000, 125.000, 150.000, 165.000, 180.000, 190.000 y 200.000.

11. La composición liposomal para su uso en un método para la formación de imágenes de depósitos amiloideos de la reivindicación 7, comprendiendo además la membrana:

DPPC;
colesterol;
ácido dietilenotriaminapentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio;
1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]; y
estando el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:



siendo n un número entero de aproximadamente 70 a aproximadamente 90; y
siendo m 14 o 16.

12. La composición liposomal para su uso en un método para obtener imágenes de depósitos amiloides de la reivindicación 7, comprendiendo el método además diagnosticar al paciente con enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides.

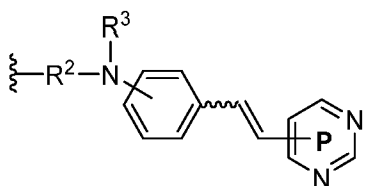
13. La composición liposomal para su uso en un método para obtener imágenes de depósitos amiloides de la reivindicación 7, comprendiendo el método además:

identificar al paciente como que potencialmente tiene la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la detección de la composición liposómica asociada con el uno o más depósitos amiloides;
someter al paciente a un análisis de ovillos neurofibrilares tau; y
al determinar la presencia de ovillos neurofibrilares tau junto con la detección de la composición liposómica asociada con uno o más depósitos amiloides, diagnosticar al paciente con la enfermedad de Alzheimer.

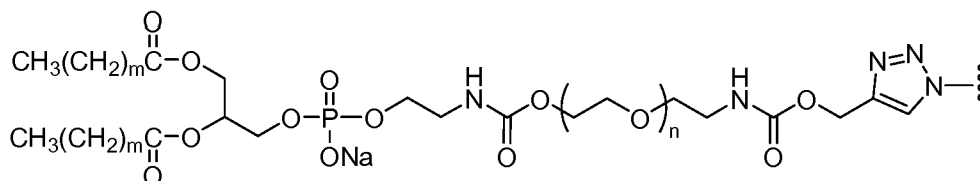
14. Un kit para la formación de imágenes de depósitos amiloideos, comprendiendo el kit:

una composición liposomal, comprendiendo la composición liposomal:
una membrana, que comprende:

un conjugado fosfolípido-polímero-aromático, estando el resto aromático en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



y estando el resto fosfolípido-polímero en el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por:



en donde:

R² es un grupo de unión que comprende de 1 a 6 átomos de carbono que es uno de: alquileo o alcóxialquileo;

R³ es hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o alcóxialquilo C₁-C₆ y R³ distinto de hidrógeno está sustituido con cero, uno o más -OH;

pirimidina P está sustituida con cero, uno o más de -OH, -O-alquilo y -NH₂;

siendo n un número entero de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 y
siendo m uno de: 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18; y

un agente potenciador de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) al menos uno de encapsulado por o unido a la membrana.

15. El kit de la reivindicación 14, comprendiendo además la membrana:

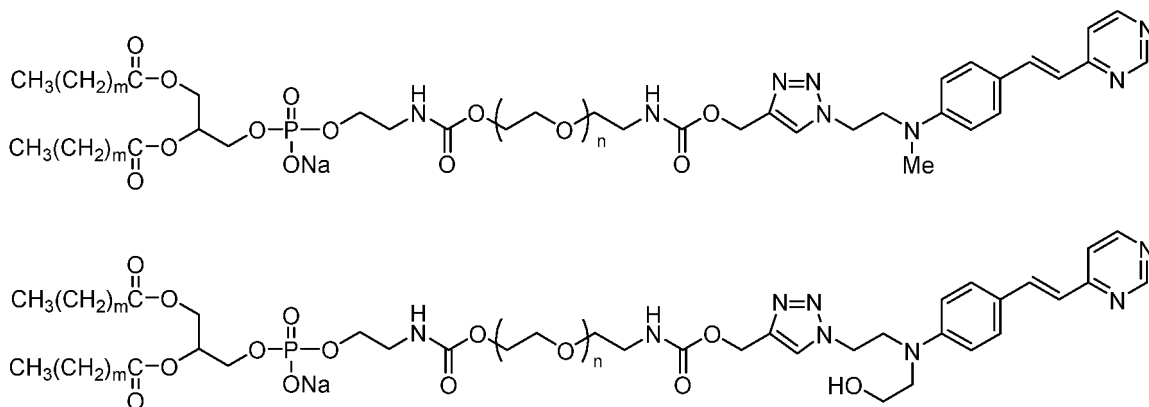
DPPC;

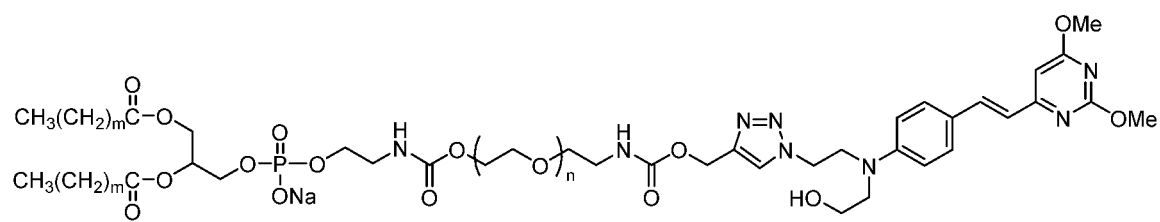
colesterol;

ácido dietilenotriaminapentaacético)-bis(estearilamida), sal de gadolinio;

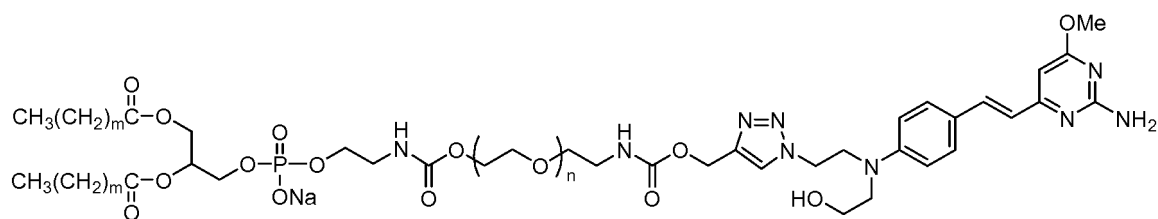
1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]; y

estando el conjugado fosfolípido-polímero-aromático representado por una de las fórmulas estructurales siguientes:





o



5

siendo n un número entero de aproximadamente 70 a aproximadamente 90; y
siendo m 14 o 16.

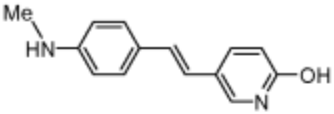
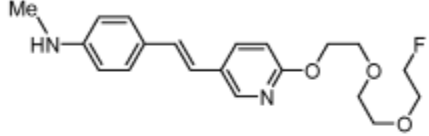
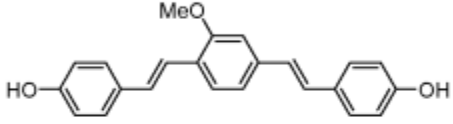
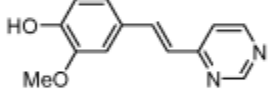
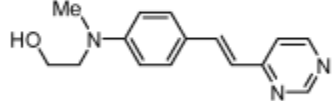
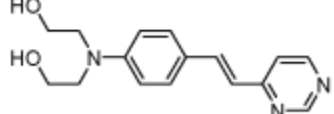
	<u>Valores de CLogP</u>
	3,12
 Florbetapir	3,52
 MeXO4	6,11
 Compuesto i	1,56
 Compuesto ii	1,80
 Compuesto iii	1,06

FIG. 1A

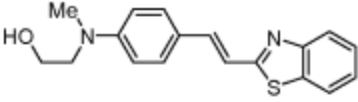
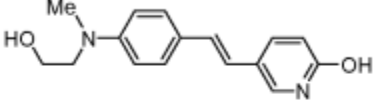
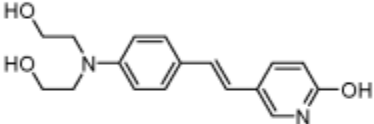
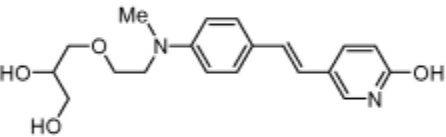
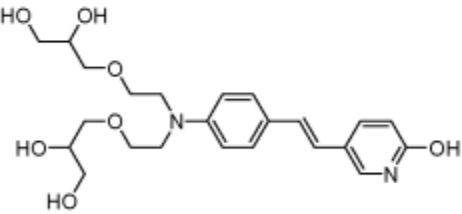
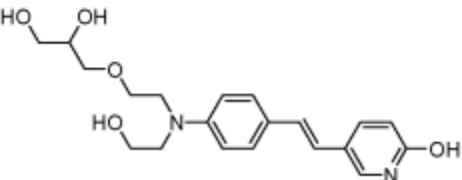
	<u>Valores de CLogP</u>
	4,20
Compuesto iv'	
	3,05
Compuesto v	
	2,31
Compuesto vi	
	2,29
Compuesto vii	
	0,79
Compuesto viii	
	1,55
Compuesto ix	

FIG. 1B

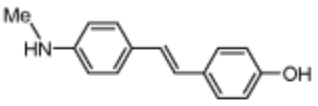
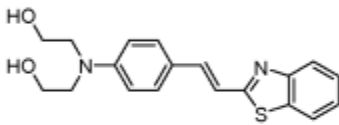
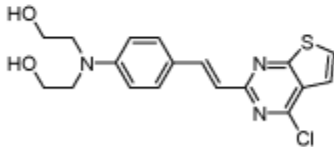
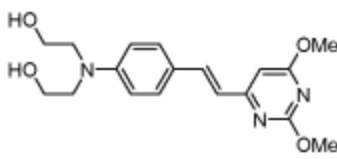
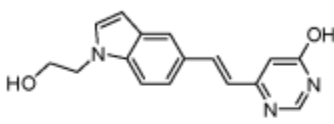
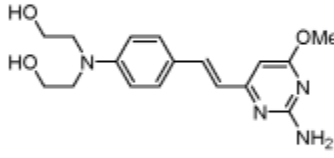
	<u>Valores de CLogP</u>
 SB-13	3,67
 Compuesto iv	3,46
 Compuesto x	2,99
 Compuesto xi	2,95
 Compuesto xii	2,63
 Compuesto xiii	2,01

FIG. 1C

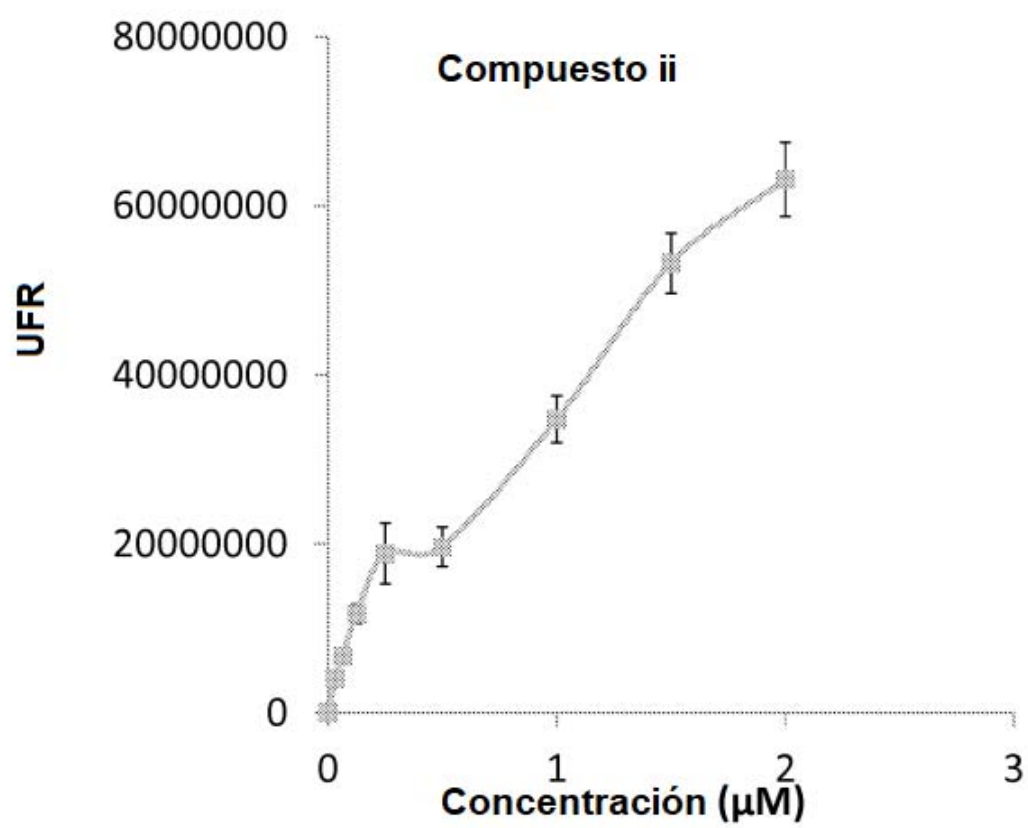


FIG. 2

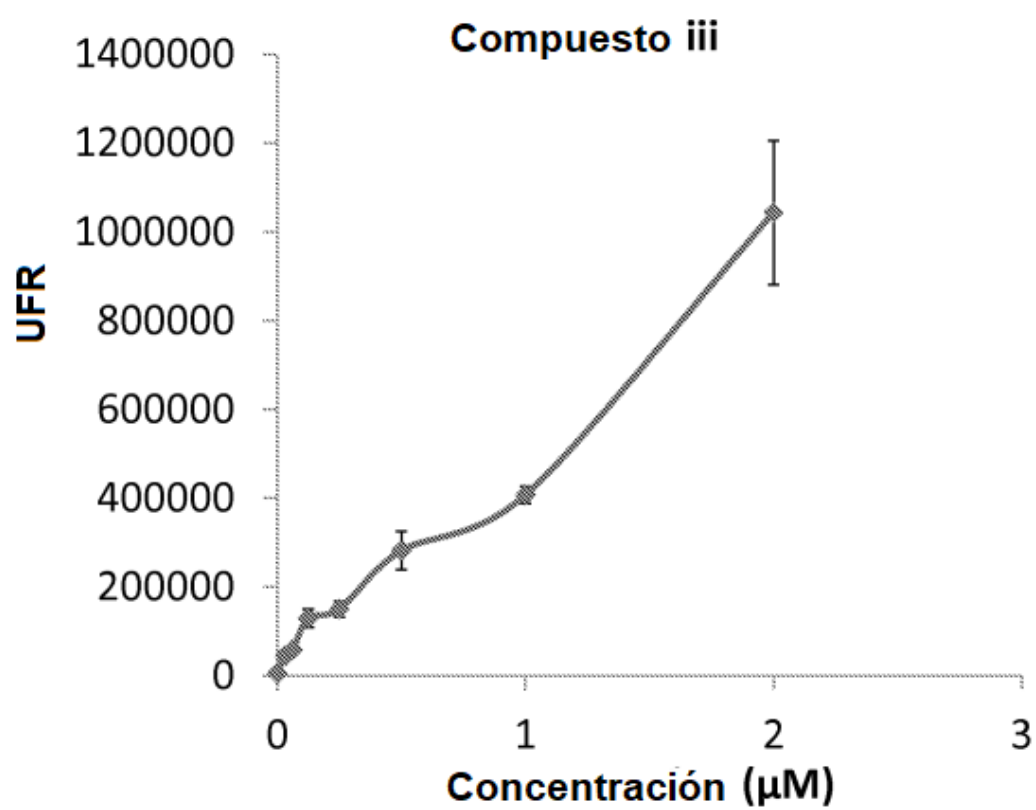
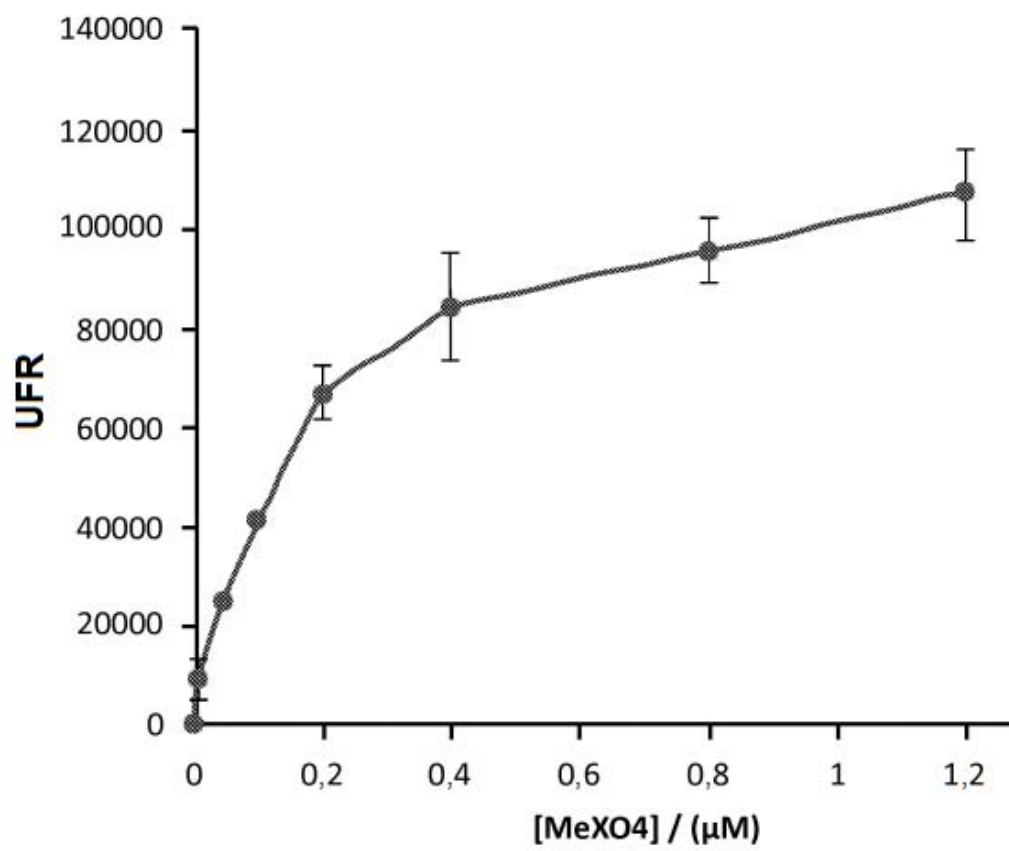


FIG. 3

**FIG. 4**

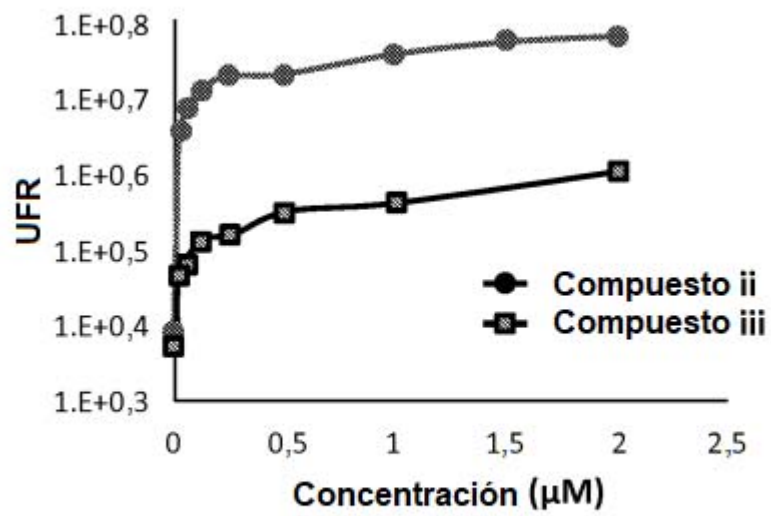


FIG. 5A

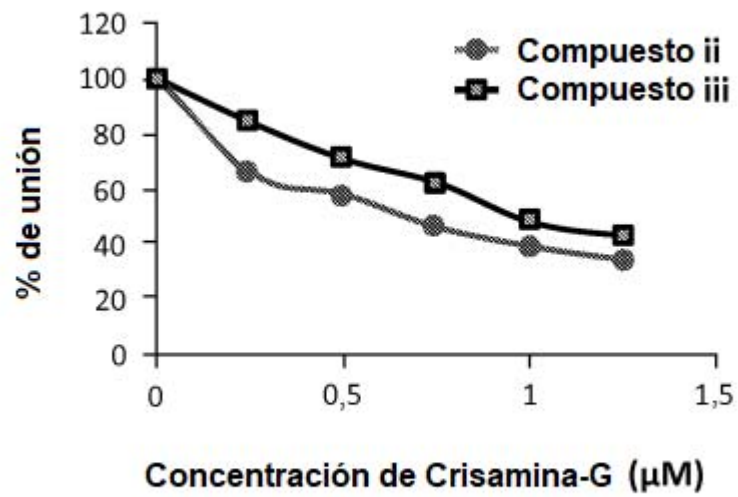


FIG. 5B

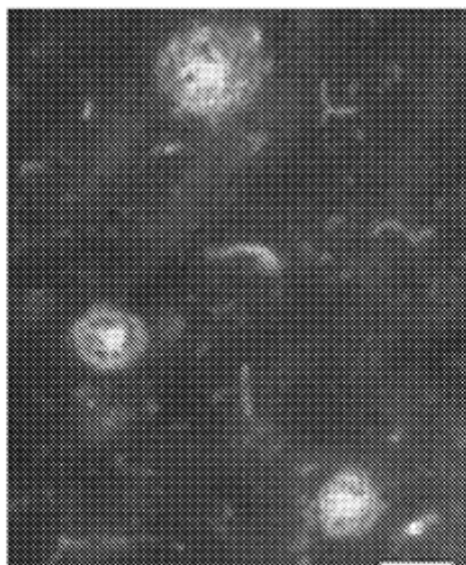


FIG. 5C

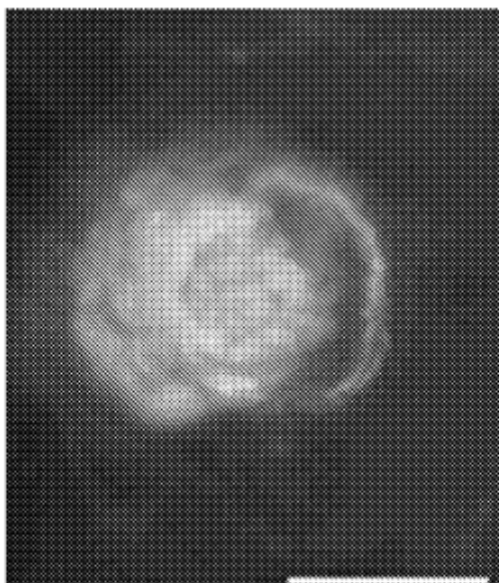


FIG. 5D

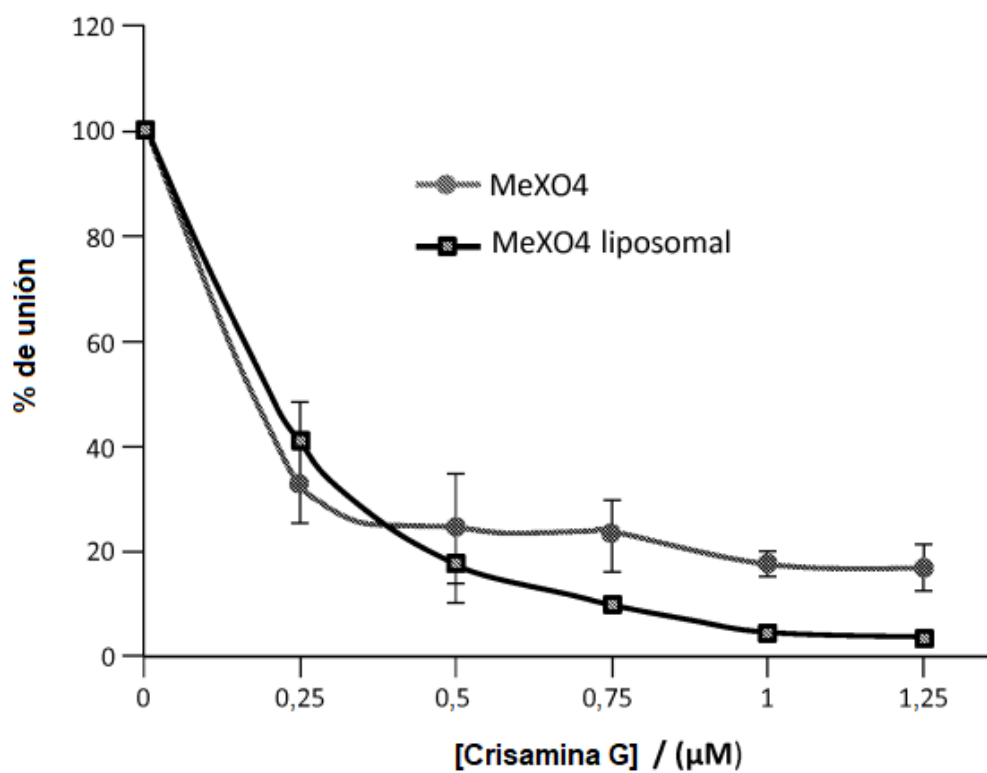


FIG. 6

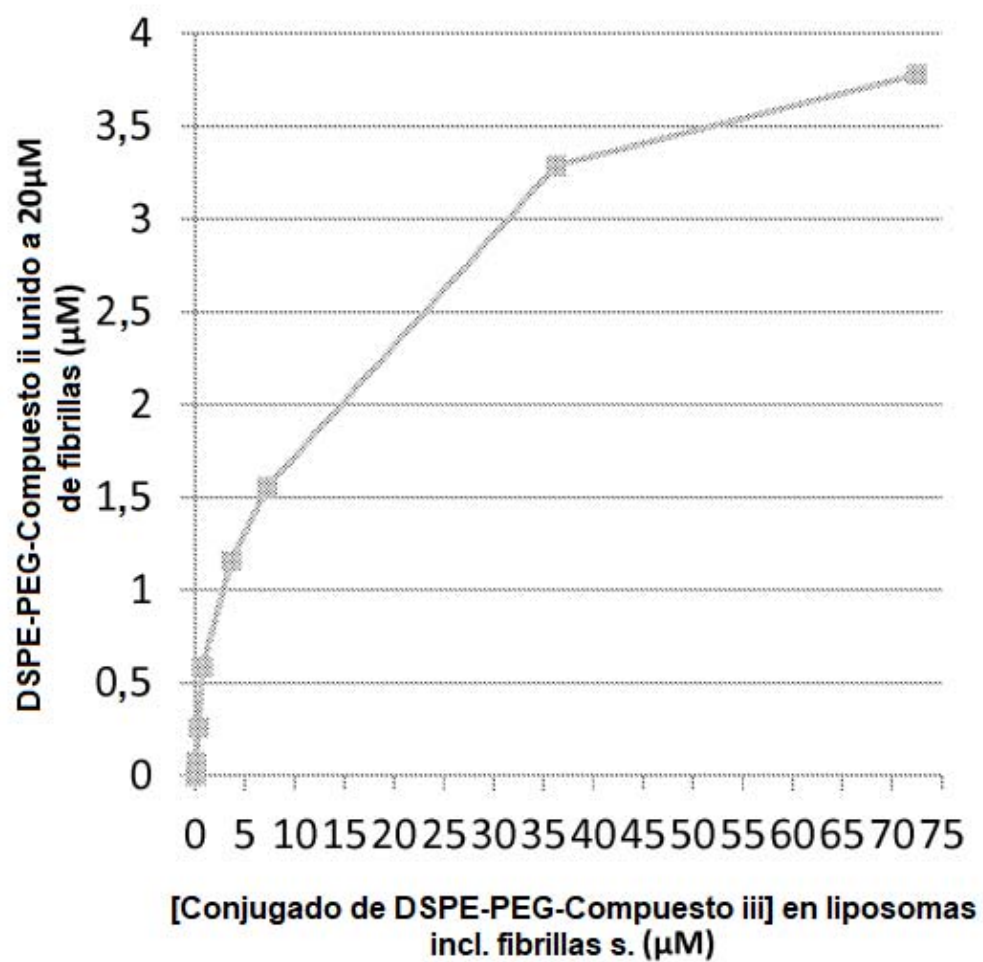
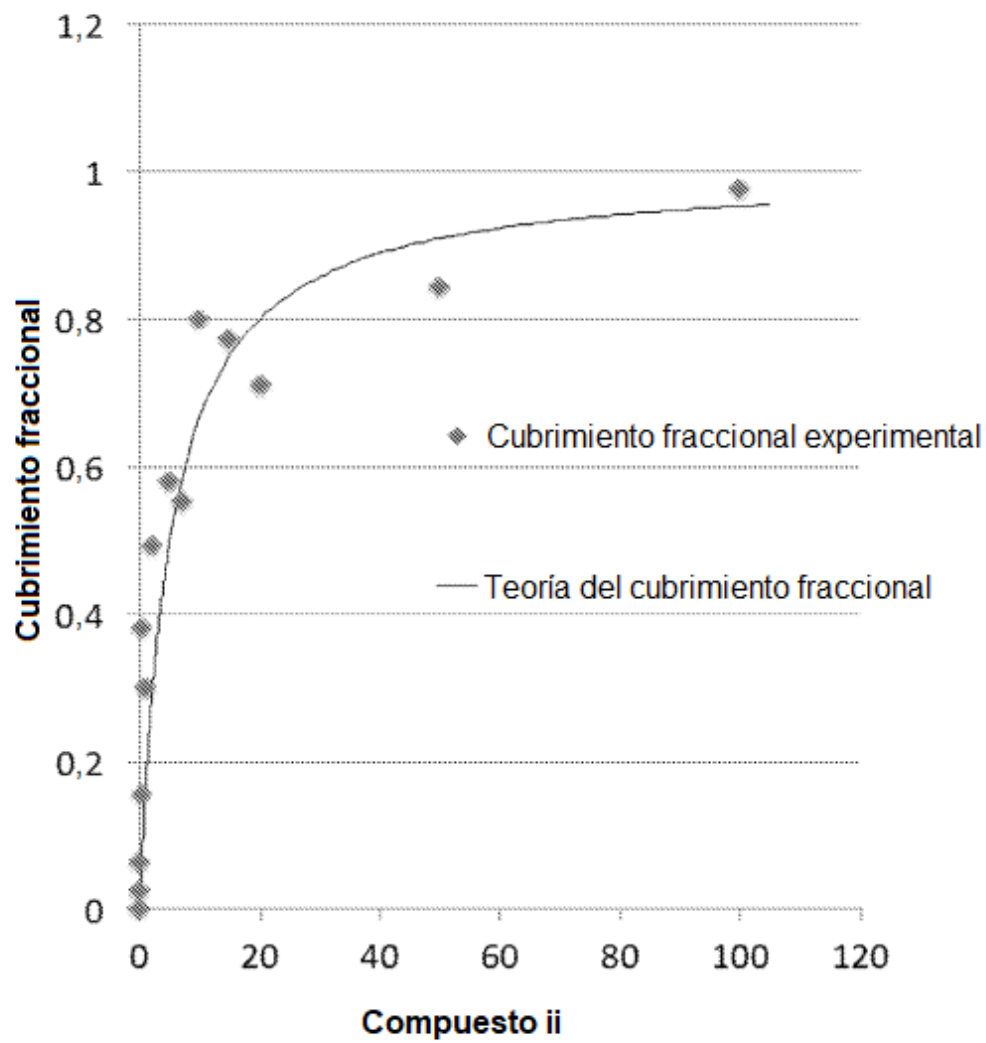
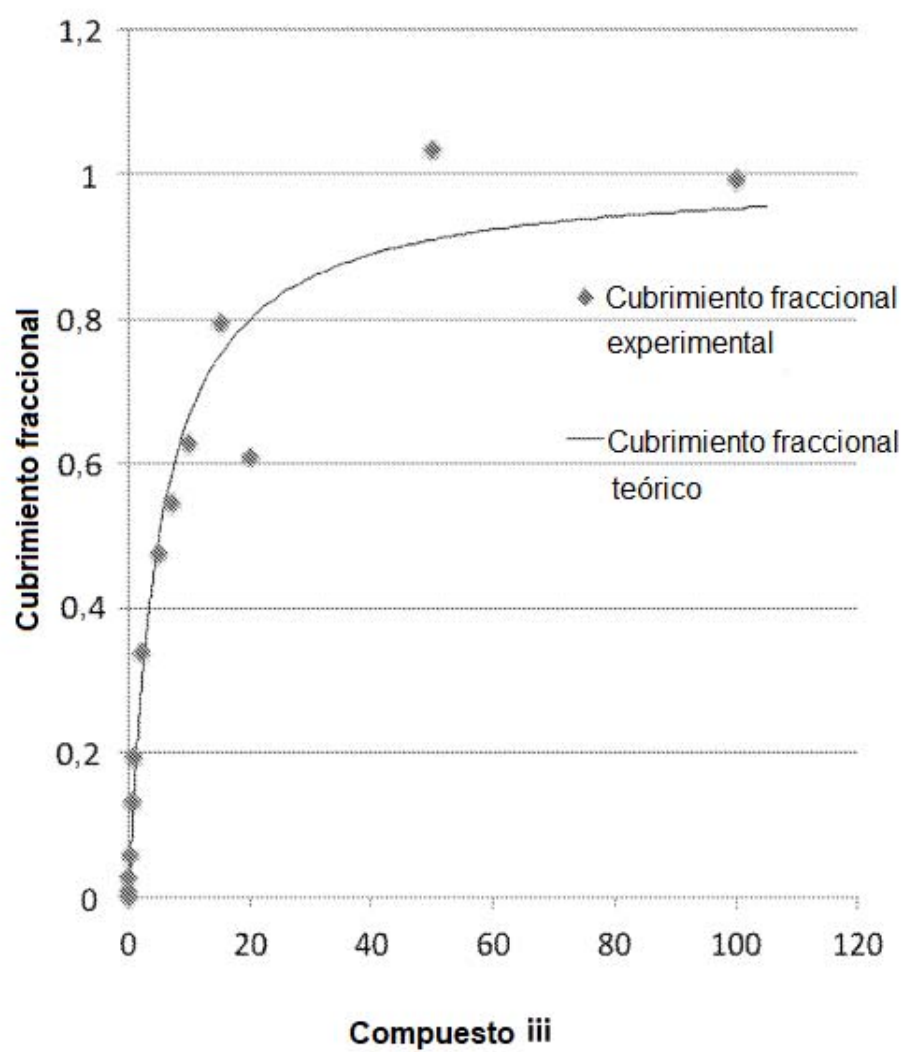
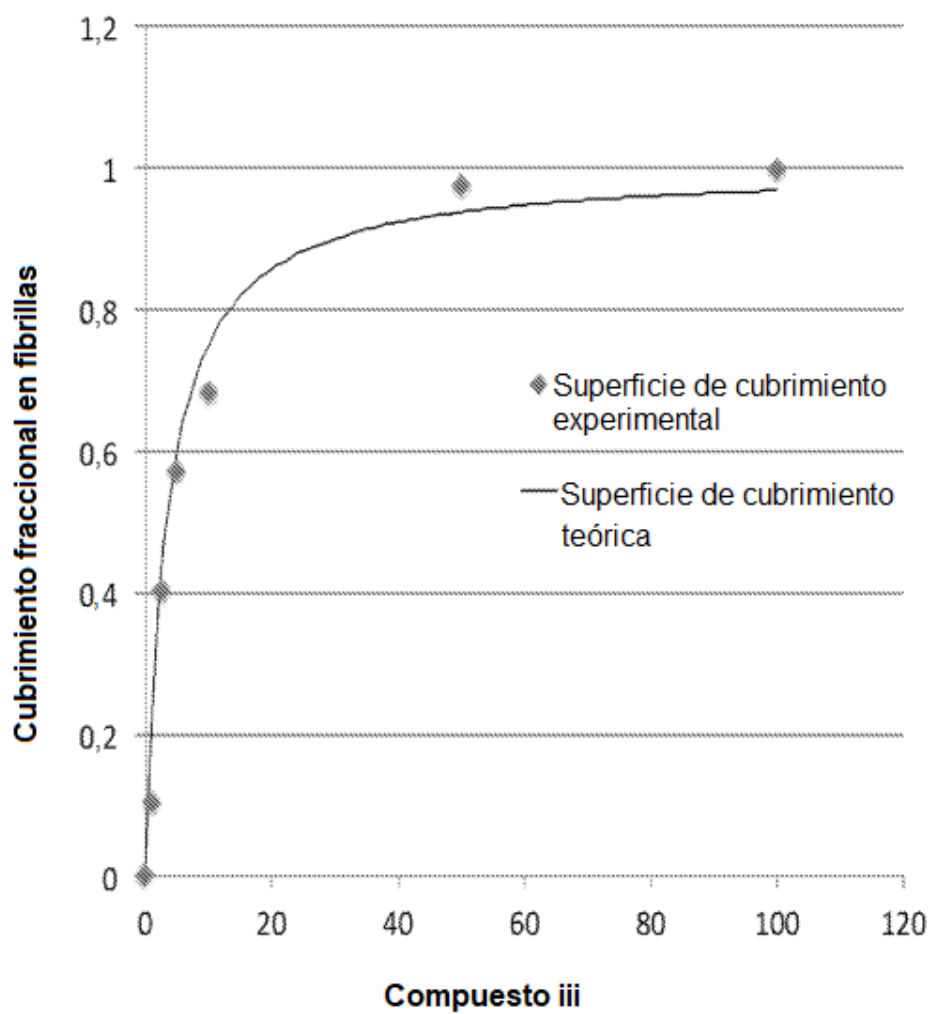


FIG. 7A

**FIG. 7B**

**FIG. 7C**

**FIG. 7D**

Formulación de la bicapa	Diámetro medio, nm	Índice de polidispersidad
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd, DSPE-PEG- MeXO4	231,6	0,08
DPPC, Colesterol, BSA-DTPA-Gd, DSPE-PEG- MeXO4	246,1	0,21
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd	100,8	0,05
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd, DSPE-PEG- Compuesto iii	122,5	0,07
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd, DSPE-PEG- MeXO4	223,5±12,6	0,08
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd	131,9±5,8	0,13±0,05
DPPC, Colesterol, DSPE-PEG, BSA-DTPA-Gd, DSPE-PEG- Compuesto iii	148,9±19,5	0,05±0,05

FIG. 8

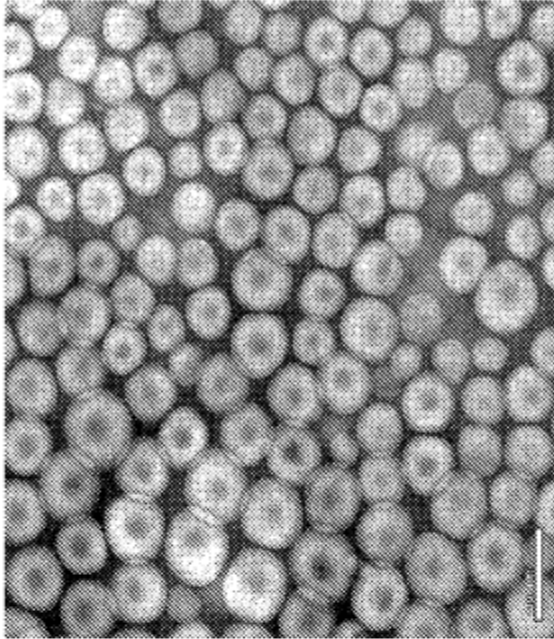


FIG. 9B

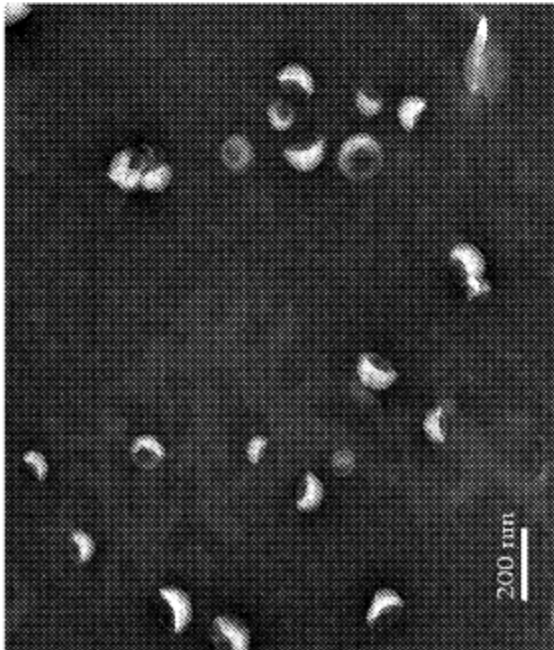


FIG. 9A

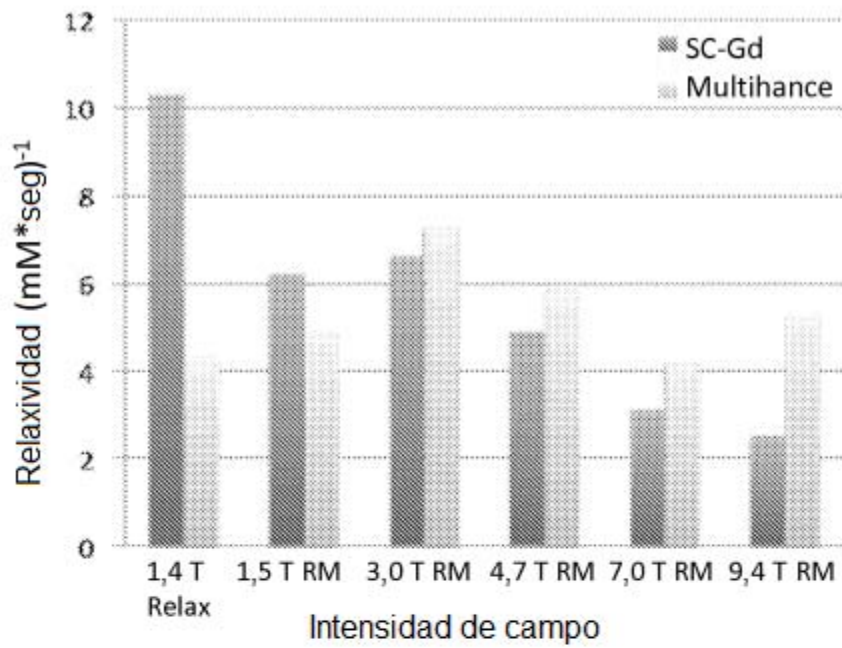


FIG. 10A

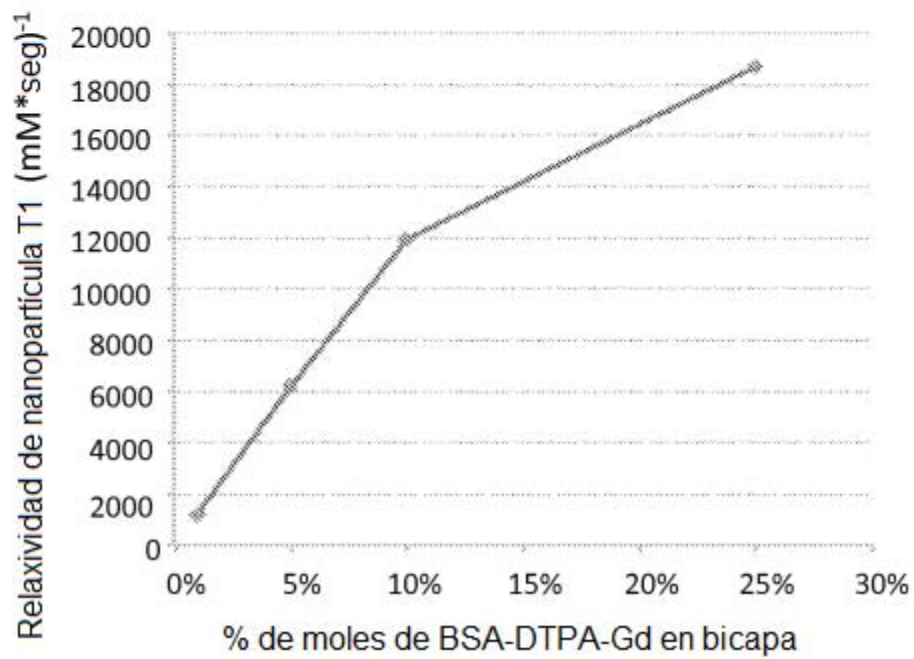


FIG. 10B



FIG. 11A

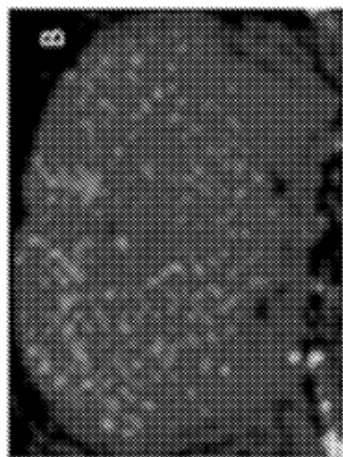


FIG. 11B



FIG. 11C

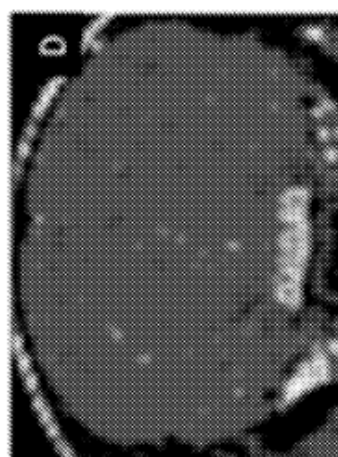


FIG. 11D

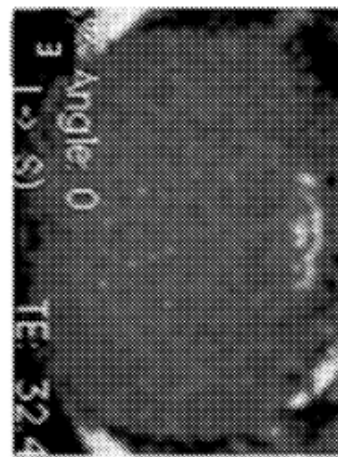


FIG. 11E

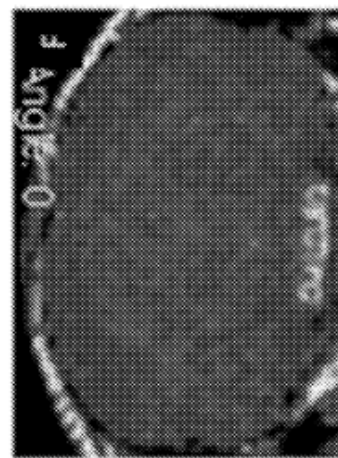


FIG. 11F

Modelo de ratón	Genotipo APP+	Tratamiento	Patología	ICG	Ligando	IRM
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Negativo	Direccionado	0	-	-	-
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Positivo	Direccionado	3	X	X	X
TetO/APP _{swe}	Negativo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Positivo	Direccionado	1	X	X	X
Tg2576	Positivo	Direccionado	1	X	X	X
Tg2576	Positivo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Positivo	Direccionado	0	-	-	-
TG2576	Positivo	No direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Positivo	No direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Positivo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Negativo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Negativo	No direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Negativo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Negativo	Direccionado	0	-	-	-
Tg2576	Negativo	Direccionado	0	-	-	-

FIG. 12

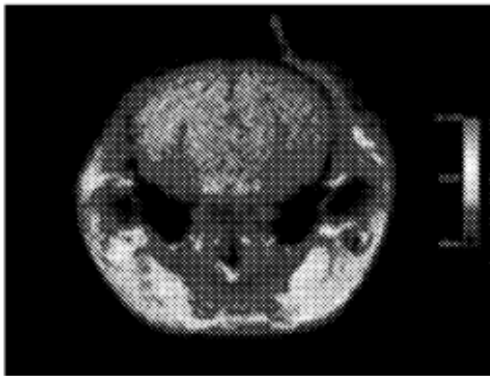


FIG. 13A

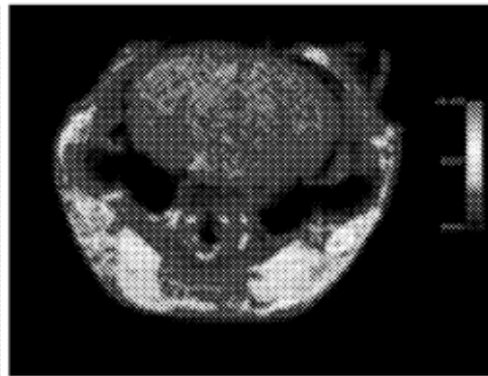


FIG. 13B

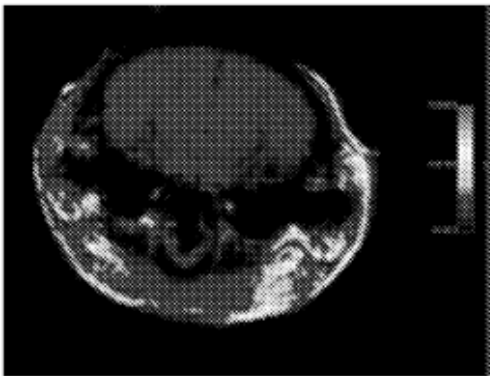


FIG. 13C

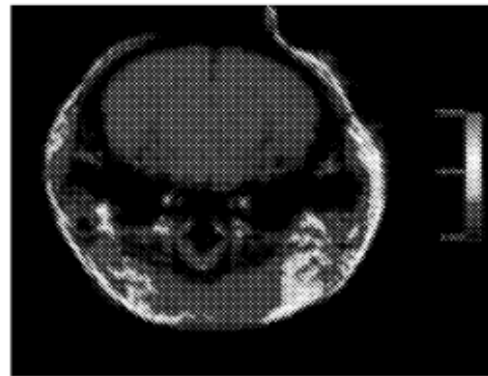


FIG. 13D

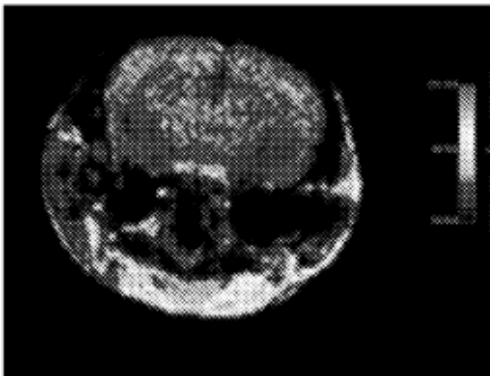


FIG. 13E

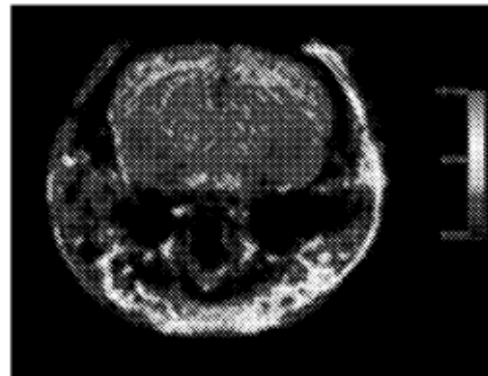


FIG. 13F

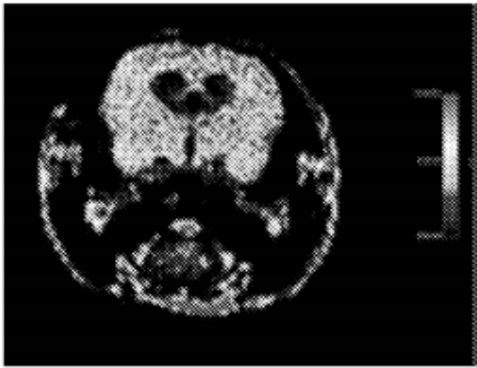


FIG. 13G

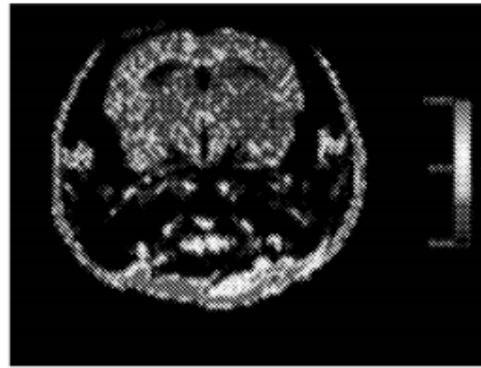


FIG. 13H

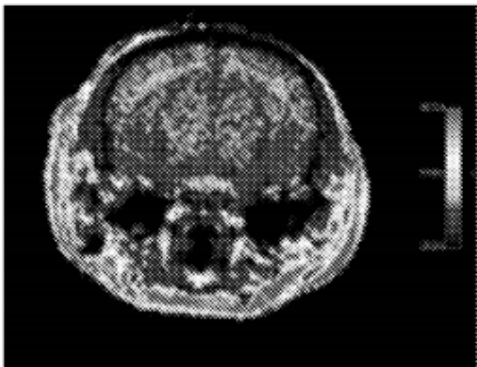


FIG. 13I

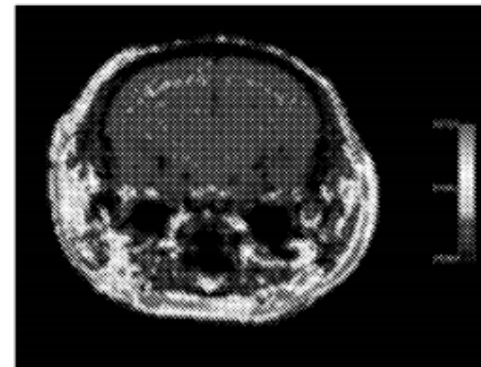


FIG. 13J

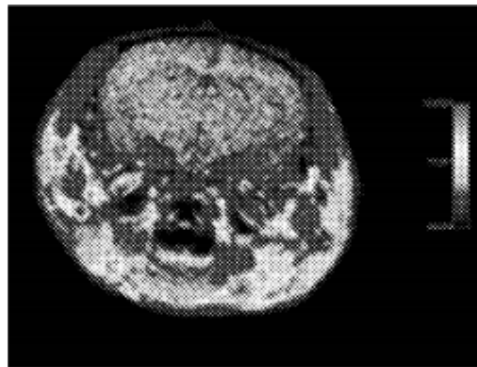


FIG. 13K

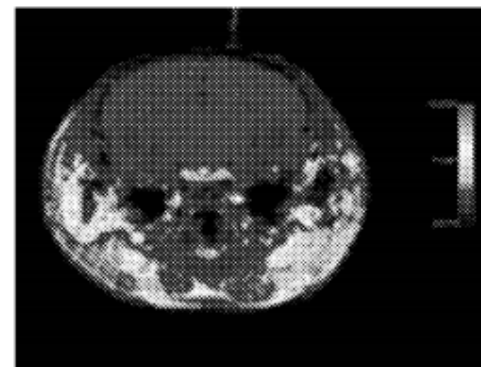


FIG. 13L

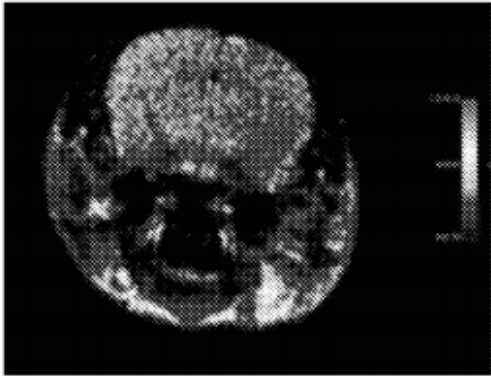


FIG. 13M

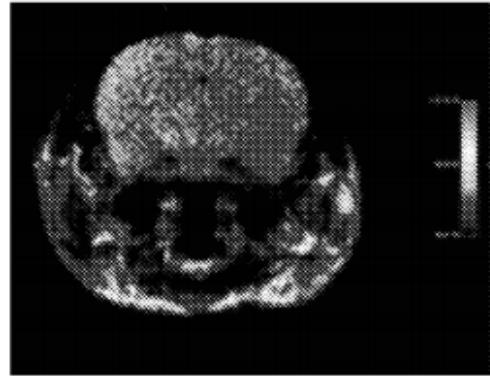


FIG. 13N

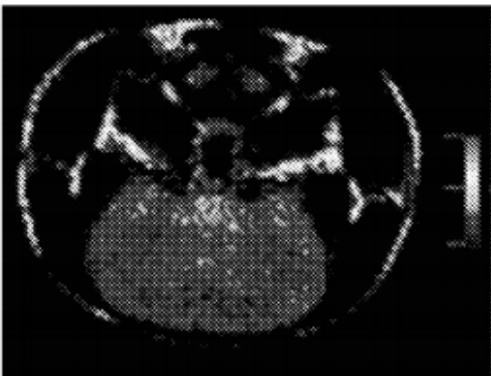


FIG. 13O

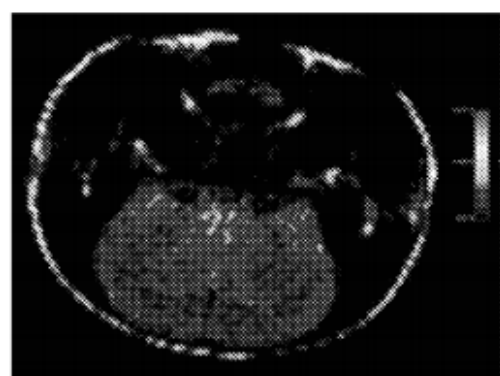


FIG. 13P

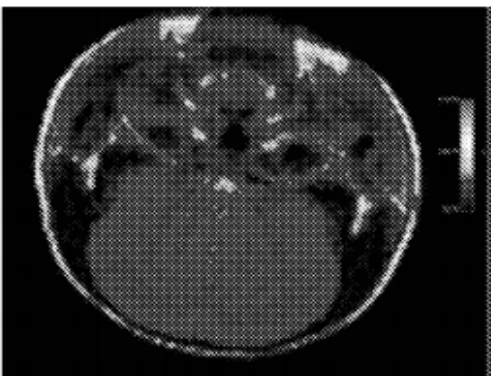


FIG. 13Q

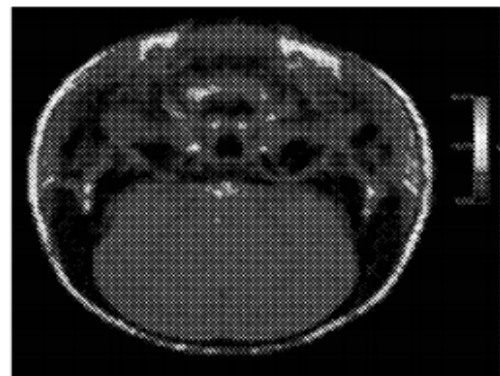


FIG. 13R

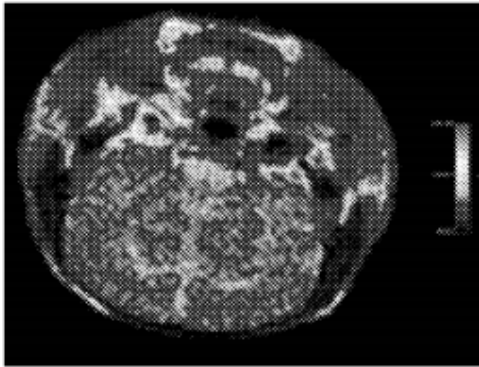


FIG. 13S

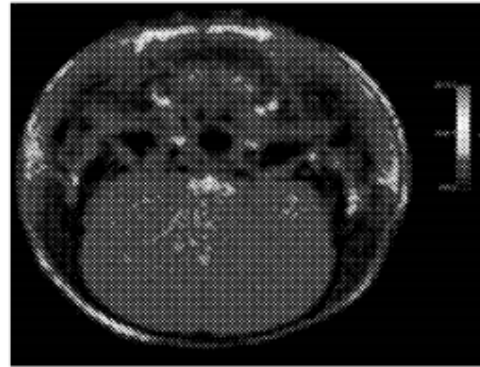


FIG. 13T

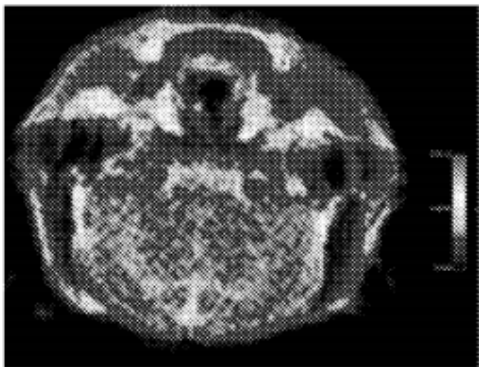


FIG. 13U

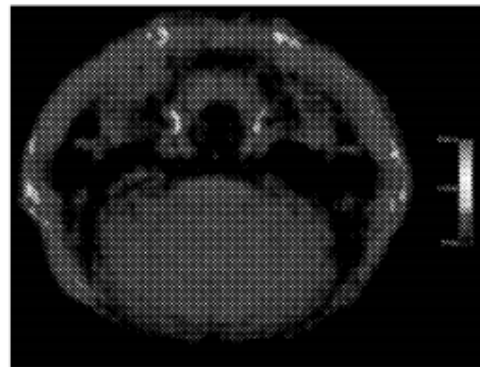


FIG. 13V

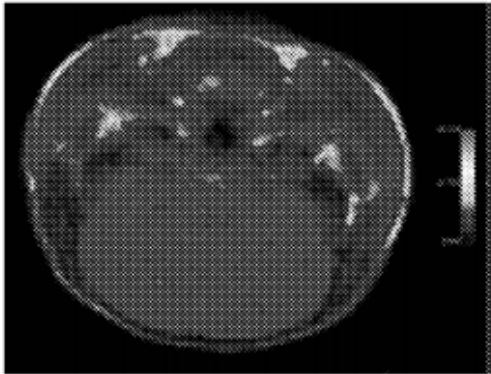


FIG. 13W

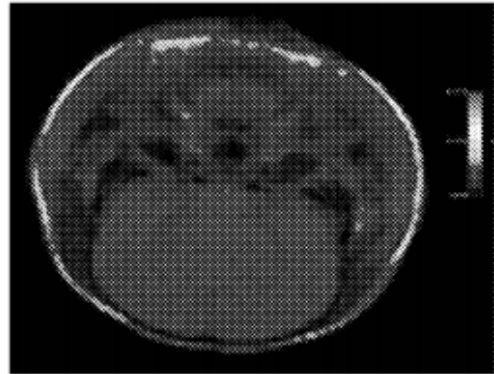


FIG. 13X

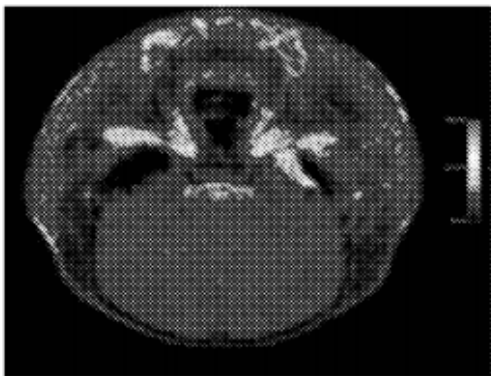


FIG. 13Y

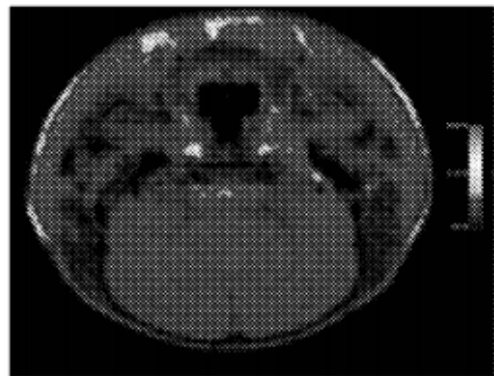


FIG. 13Z



FIG. 14A



FIG. 14B

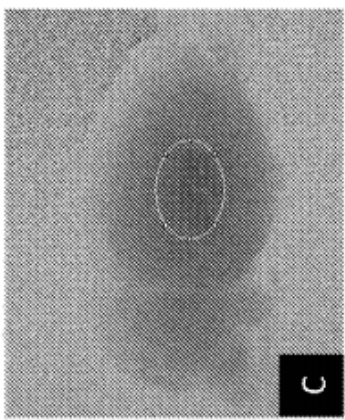


FIG. 14C

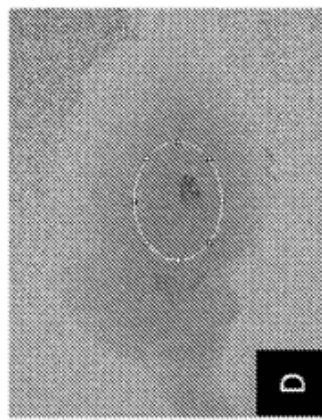


FIG. 14D

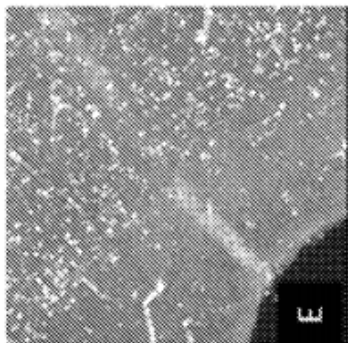


FIG. 14E

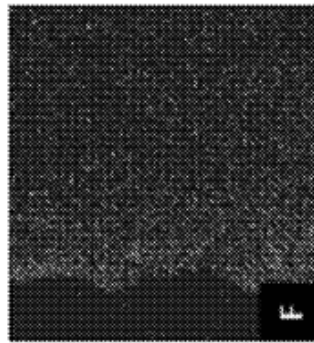


FIG. 14F

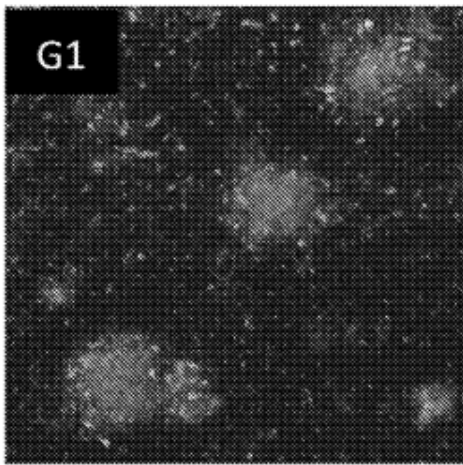


FIG. 14G1

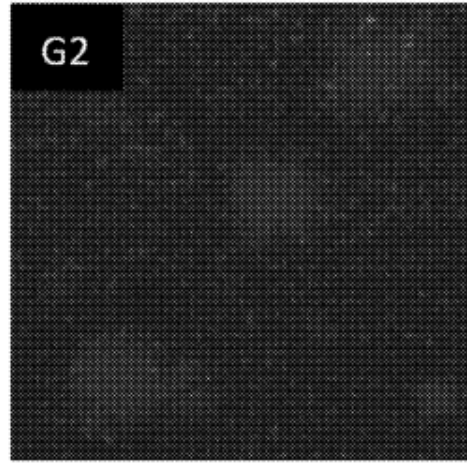


FIG. 14G2



FIG. 14G3

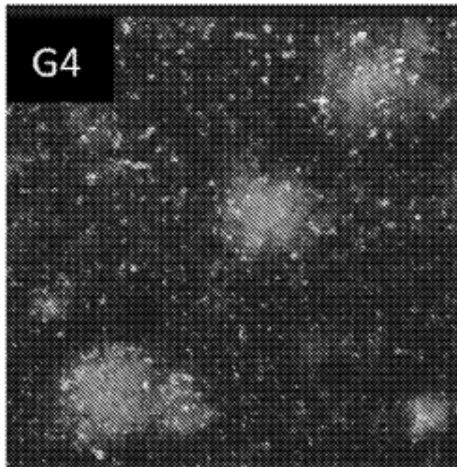


FIG. 14G4

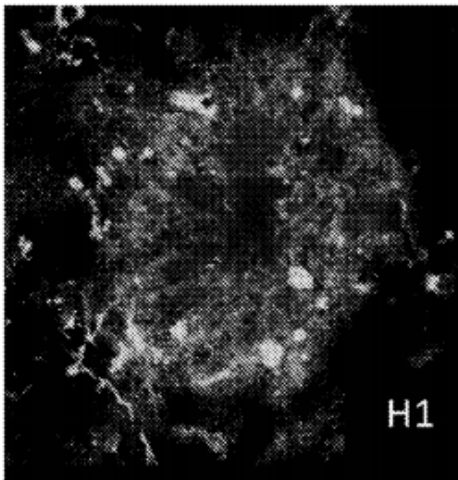


FIG. 14H1

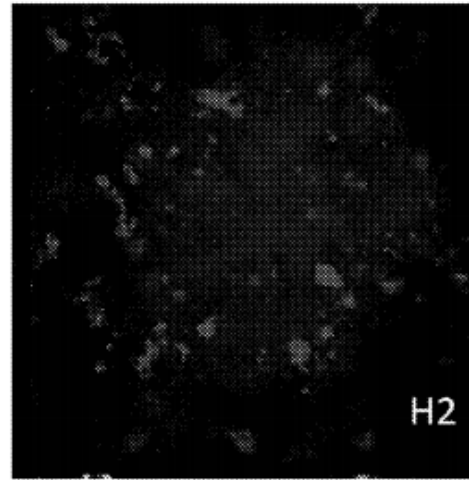


FIG. 14H2

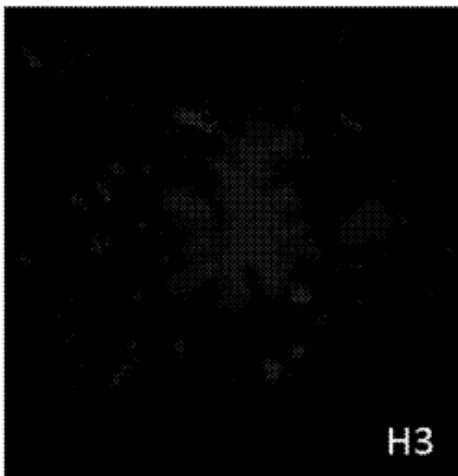


FIG. 14H3

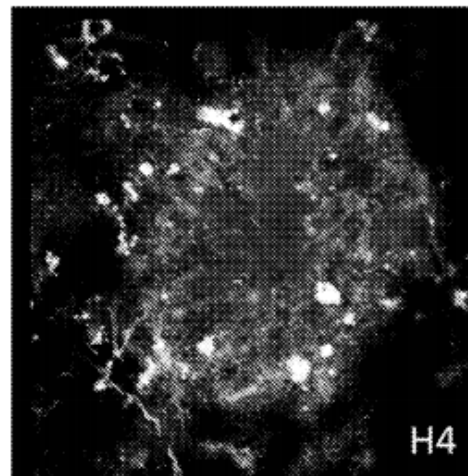


FIG. 14H4