



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 729**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02796368 .5**

96 Fecha de presentación : **25.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1420830**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Diagnóstico ocular de la enfermedad de alzheimer.**

30 Prioridad: **27.08.2001 US 287124 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.08.2011

73 Titular/es: **The General Hospital Corporation
Fruit Street
Boston, Massachusetts 02115, US
The Brigham and Women's Hospital, Inc.**

72 Inventor/es: **Goldstein, Lee, E. y
Chylack, Leo T., Jr.**

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 363 729 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

Diagnóstico ocular de la enfermedad de alzheimer

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a enfermedades neurodegenerativas.

5 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo del envejecimiento crónicamente progresivo y contribuye de manera importante a la morbilidad y la mortalidad en ancianos. Actualmente la EA representa aproximadamente el 70% de todos los casos de demencia y afecta a entre 2 y 4 millones de estadounidenses. Hasta 9 millones de estadounidenses podrían padecer la EA en el año 2050. Estudios epidemiológicos han estimado que si la EA pudiera retrasarse 5 años, su incidencia y prevalencia se reduciría a la mitad. El desarrollo y la puesta en práctica de futuras terapias para la EA se basarán en un diagnóstico sensible y precoz de la enfermedad. Aunque se sabe mucho de la enfermedad, no existen medios disponibles en la actualidad de diagnóstico precoz o de tratamiento eficaz.

10 Los medios actualmente disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer son post-mortem y se basan en la detección de proteínas amiloides en el tejido cerebral. El artículo de Klunk y col., Life Sciences, Pergamon Press, Oxford, GB, vol. 69, nº 13, 17 de agosto de 2001, páginas 1471-1484, se refiere a derivados de tioflavina sin carga de los que se ha demostrado se unen a proteínas amiloides en el tejido cerebral.

15 Skovronsky Daniel M. y col., Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, National Academy of Science, Washington, DC, US, vol. 97, nº 13, 30 junio de 2000, páginas 7609-7614, se refieren a un radioligando, BSB, que se ha demostrado se une a placas amiloides en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratones, demostrándose que se puede unir a depósitos de β -A en el tejido cerebral.

20 La US-B1-6.168.776 describe derivados no azo de Crisamina G que pueden unirse a proteínas amiloides en el parénquima cerebral.

La WO 99/08695 describe la agregación de péptidos β -A amiloides que se unen de forma covalente (por ejemplo en un residuo aminoácido de cisteína) a una etiqueta fluorescente.

25 La US-5.837.473 describe un péptido β -amiloide marcado o un fragmento activo marcado de un péptido β -amiloide y procedimientos de utilización de los péptidos marcados para detectar agentes que afectan a la deposición de los péptidos marcados en placas amiloides en muestras de tejido que evidencian presencia de una amiloidosis de Alzheimer.

Sumario de la invención

30 La invención proporciona compuestos para su utilización en un método no invasivo de detección precoz y fiable de la EA o de un estado neurodegenerativo pre-mórbido. El método de diagnóstico se lleva a cabo poniendo en contacto un tejido ocular de un mamífero, por ejemplo un sujeto humano, con un compuesto marcado de manera detectable que se une a una proteína amiloide, por ejemplo amiloide (A β). Por "proteína amiloide" se entiende una proteína o un péptido que está asociado con una placa senil neurítica EA. Preferentemente, la proteína amiloide es la proteína precursora amiloide (APP) o un producto de escisión proteolítica de origen natural. Los productos de escisión APP incluyen A β 1-40, A β 2-40, A β 1-42, así como A β oxidado o reticulado. Los compuestos se unen a variantes de origen natural de APP y A β , incluyendo variantes polimórficas nucleótidas individuales (SNP). Un aumento de la unión del compuesto a un tejido ocular, por ejemplo de un compartimento intracelular de una célula ocular, en comparación con un nivel de control normal de unión, indica que el mamífero padece o está en riesgo de desarrollar la EA. Preferentemente, el compuesto se une a A β 1-42 o a otro fragmento de una proteína precursora amiloide (APP). Los compuestos se unen preferentemente a proteínas amiloides si se compara con otras proteínas que contienen una hoja plegada β . Preferentemente, el compuesto marcado de manera detectable contiene una sonda fluorescente. Por ejemplo, la sonda fluorescente o fluoróforo es una Crisamina o un compuesto derivado de Crisamina tal como {(trans,trans)-1-bromo-2,5-bis(3-hidroxycarbonil-4-hidroxi)estirilbenceno (BSB)}.

45 Los compuestos son útiles en métodos para el screening de medicamentos *in vivo* a fin de identificar compuestos que inhiben la acumulación de A β en el ojo y cerebro, para el diagnóstico, pronóstico y gravedad de la EA en estado premórbido y para monitorizar las respuestas del paciente a la terapia con medicamentos para la EA. El grado de agregación de A β en la región cortical del ojo es directamente proporcional a los depósitos neuropatológicos de A β en el cerebro.

50 Un tejido ocular de un sujeto de estudio se pone en contacto con el compuesto, se deja que penetre en las células de la zona del cristalino del ojo y se mide la fluorescencia. La zona cortical del ojo se evalúa mediante escaneo fluorescente. Por otro lado, se escanea el humor acuoso, es decir el líquido claro entre la córnea y el cristalino del ojo.

Un aumento de al menos un 10% por encima de la fluorescencia del cristalino de un sujeto control normal (después de la administración de la sonda) indica EA o predisposición a la misma. Un valor de control normal corresponde generalmente a poca o ninguna unión de la sonda al tejido del cristalino. El nivel de fluorescencia normal del cristalino es el nivel de fluorescencia detectado después de poner en contacto el ojo de un sujeto normal sin EA (o de una población de sujetos) con un compuesto marcado de manera detectable de unión a A β . Opcionalmente, el valor se obtiene determinando la media de los valores obtenidos de un grupo de personas que se sabe que no padecen la EA (así como sin antecedentes familiares o sin predisposición genética conocida a la EA). Si la sonda utilizada emite luz en el rango de autofluorescencia del cristalino humano normal (rango azul-verde), el nivel de autofluorescencia se tiene en cuenta en la lectura. Por ejemplo, un aumento del 10% de fluorescencia (después de la administración de la sonda) en comparación con el nivel en ausencia de la sonda (autofluorescencia) indica un estado patológico o una predisposición a desarrollar un estado neuropatológico. Preferentemente se establece una línea base de autofluorescencia (antes de la administración de la sonda) para cada individuo.

Preferentemente el nivel de diagnóstico de fluorescencia es al menos un 25%, en especial al menos un 50%, en particular al menos un 100% mayor que el valor de control normal. Por ejemplo, una detección de fluorescencia de la sonda específica de A β 2 veces o más superior a un valor normal de control indica un estado patológico. Debido a que el tejido del cristalino humano normal emite luz fluorescente por sí mismo en el rango azul-verde (495 nm-520 nm), preferentemente la sonda emite una longitud de onda de luz fuera del espectro azul-verde. Por ejemplo, la sonda fluorescente emite en una longitud de onda de luz superior a 520 nm, por ejemplo fluorescencia en el tango del rojo, naranja-rojo o infrarrojo. Alternativamente, la sonda emite una longitud de onda inferior a 450 nm, por ejemplo en el rango violeta o ultravioleta (UV).

Un método para el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer comprende los pasos que consisten en (a) poner en contacto el tejido ocular de un mamífero con un compuesto que se une a un polipéptido amiloide; (b) cuantificar la unión del compuesto al tejido ocular y (c) comparar el nivel de unión con un nivel de control de unión normal. El aumento de los niveles de unión a medida que transcurre el tiempo indica un pronóstico desfavorable. La fluorescencia del cristalino de pacientes de ensayo tras la administración de la sonda se compara con la autofluorescencia endógena de un sujeto sin EA (o de una población de individuos) o con el nivel de fluorescencia de un sujeto sin EA (o de una población de sujetos sin EA) después de la administración de la sonda. Los métodos también se utilizan para establecer la gravedad de la enfermedad, monitorizar las respuestas al tratamiento farmacológico y cribar aquellos medicamentos que puedan inhibir la acumulación de A β . Un nivel de fluorescencia incrementado (indicativo de acumulación de A β en el cristalino cortical) indica una etapa más avanzada de la EA. Una nivel de fluorescencia (indicativo de acumulación de A β en el cristalino cortical) que disminuye a medida que transcurre el tiempo indica que un medicamento determinado inhibe la acumulación de A β e indica una respuesta clínica positiva al tratamiento farmacológico.

También entran dentro del alcance de la invención compuestos de unión a A β marcados de manera detectable que emiten luz fuera del rango azul-verde. Por ejemplo, los compuestos de unión son sondas fluorescentes que emiten luz en una longitud de onda de entre 550 a 700 nm. Los compuestos contienen Rojo de Texas o un derivado del mismo.

Los compuestos, por ejemplo ligandos polipéptidos, compuestos orgánicos o compuestos inorgánicos, se aíslan o purifican. Una composición "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la que se derivan, o está prácticamente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Preferentemente, una preparación de un compuesto, por ejemplo de un compuesto de unión a A β fluorescente, constituye al menos el 75%, en especial el 80%, en particular el 85%, con especial preferencia el 90%, con particular preferencia el 95%, más preferiblemente el 98% y con total preferencia el 99 ó el 100% del peso seco de la preparación.

"Fluorescencia" es el fenómeno donde la energía lumínica ("luz de excitación") es absorbida por una molécula, dando como resultado que la molécula se "excite". Después de un intervalo de tiempo predeterminado, tal como entre 1 minuto y 24 horas, la energía lumínica absorbida es emitida por la molécula excitada. La longitud de onda de la luz emitida tiene normalmente una longitud de onda mayor que la luz de excitación. Esta luz emitida se denomina luz fluorescente. Una molécula que presenta fluorescencia se denomina "fluoróforo." La relación entre las longitudes de onda de luz y el grado de excitación de un fluoróforo dado a esa longitud de onda se describe mediante el "espectro de excitación" del fluoróforo. El espectro de excitación también se conoce como el rango de longitudes de onda de excitación. La relación entre la longitud de onda de la luz y la intensidad de la emisión de fluorescencia a esa longitud de onda se describe mediante el espectro de emisión o espectro de fluorescencia del fluoróforo. El espectro de emisión también se conoce como el rango de longitudes de onda emitidas. El máximo de excitación es la longitud de onda de la luz de excitación a la que la fluorescencia del fluoróforo alcanza la máxima intensidad. El máximo de emisión es la longitud de onda de la luz emitida por el fluoróforo excitado cuando su fluorescencia está en la intensidad máxima.

La mayoría de los fluoróforos que se excitan y emiten luz visible tienen un espectro de emisión que se superpone con su espectro de excitación, aunque el máximo para cada uno es diferente. La distancia en nanómetros entre el máximo del espectro de excitación y el máximo del espectro de emisión se conoce como "desplazamiento Stokes". Los fluoróforos con desplazamientos Stokes grandes en el rango visible funcionan mejor para esta invención. Por ejemplo, es preferente un fluoróforo con un máximo de excitación de 400 nm y un máximo de emisión de 700 nm, con poca o ninguna superposición entre los espectros.

Los métodos descritos en este documento ofrecen varias ventajas con respecto a las propuestas existentes para el diagnóstico de la EA. En primer lugar, el método se lleva a cabo *ante mortem* e identifica de manera precisa y fiable la acumulación de A β en tejidos vivos. Antes de la invención, la detección fiable de los depósitos se hacía estudiando muestras cerebrales de autopsias de pacientes de EA. En segundo lugar, el método no es invasivo; no se necesita biopsia de tejido. El método utiliza sondas fisiológicamente compatibles. Por otra parte, el procedimiento de escaneo en sí mismo es cuestión de segundos, por ejemplo de 30 segundos a minutos. Por último, la especificidad y la sensibilidad de detección es alta debido al único patrón anatómico de acumulación de A β , es decir la zona cortical del cristalino en un estado sin enfermedad se caracteriza por una acumulación/agregación de proteínas pequeña o nula. Incluso pequeñas cantidades de acumulación de proteína A β son estables y fácilmente detectables en esta zona del ojo.

Otras características, propósitos y ventajas de la invención quedan claras en la descripción y los dibujos.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos para su utilización en los métodos de diagnóstico ocular no invasivos que se describen en este documento facilitan el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización de la EA y de trastornos neurodegenerativos asociados, confirmándose éstos por la acumulación de proteínas amiloides. El proceso de la enfermedad implica la acumulación patogénica de péptidos A β en zonas vulnerables del cerebro. La invención se basa en el descubrimiento de que estos mismos péptidos A β se acumulan como microagregados en las células oculares y, en particular, en la zona cortical del cristalino, en pacientes con EA. Además de la acumulación en la corteza del ojo, los A β se acumulan en el humor acuoso del ojo, por ejemplo en la cámara anterior. La progresión de la enfermedad conduce a la muerte celular y a la acumulación de péptidos A β extracelulares. La agregación de proteínas puede progresar hasta el desarrollo de una catarata relativamente rara ("supranuclear" o catarata cortical profunda). Estas cataratas supranucleares fueron detectadas en un modelo de ratón transgénico con EA y en cristalinos *postmortem* de pacientes humanos de los que se confirmó neuropatológicamente que padecían EA. Los compuestos para su uso en los métodos de diagnóstico de la invención son herramientas con las que se monitoriza la agregación de A β y la acumulación en el cristalino como un biomarcador para casos similares que ocurren en compartimentos cerebrales mucho menos accesibles.

La Crisamina G y sus derivados se conocen en el estado de la técnica (por ejemplo de las patentes US 6.133.259; 6.168.776; 6.114.175). Estos compuestos se unen a los péptidos A β , aunque no son fluorescentes. Los métodos de diagnóstico utilizan derivados de Crisamina G de unión a un amiloide fluorescente altamente lipofílicos para detectar péptidos A β en el ojo. Después de poner en contacto el tejido ocular con una sonda específica de A β , un escaneo no invasivo, que utiliza técnicas fluorofotométricas oculares estándar, revela el grado de unión. En el estado de la técnica (por ejemplo de las patentes US 6.198.532 y 6013, 034) se conocen fluorímetros oculares y otros dispositivos de formación de imágenes oculares.

Los métodos sacan partido de las sondas fluorescentes lipofílicas biodisponibles. Tales fluoróforos y sondas están disponibles comercialmente, por ejemplo de Molecular Probes, Inc. Eugene, OR. Algunos colorantes, por ejemplo X-34 ó {(trans,trans)-1-bromo-2,5-bis(3-hidroxycarbonil-4-hidroxi)estiril-benceno (BSB)} (Styren y col., 2000, J. Histochem. 48:1223-1232; Link y col., 2001, Neurobiol. Aging 22:217-226; y Skrovonsky y col., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:7609-7614) se han utilizado para analizar el tejido cerebral (aunque no el tejido ocular). Estas sondas emiten luz en el rango azul-verde, por tanto, el nivel de fluorescencia, que es importante para el diagnóstico, sobrepasa la cantidad de autofluorescencia del cristalino humano en el rango azul-verde.

Las sondas utilizadas en los métodos de diagnóstico se unen específicamente a A β y a proteínas asociadas a A β en relación con otras proteínas o polipéptidos que contienen hoja plegada β . Las sondas se aplican al ojo en forma de líquido o pomada. La lipofilia de los compuestos facilita la penetración en las estructuras intermedias. Los compuestos se unen con gran avidez a las acumulaciones de A β en el cristalino y en otras estructuras oculares. Por ejemplo, los compuestos se formulan en solución con un excipiente, por ejemplo DMSO, para mejorar la penetración tisular y celular del compuesto de unión a A β fluorescente. Después de poner en contacto el ojo con el compuesto, se permite al compuesto penetrar en los tejidos oculares durante un período de tiempo, por ejemplo entre 1 minuto y 5 horas, antes del escaneo fluorescente del ojo. Preferentemente el ojo se pone en contacto con el compuesto durante al menos una hora antes del escaneo fluorométrico. El ojo puede ponerse en contacto con la sonda durante un día o más antes del escaneo. El análisis radiométrico y otros análisis de señales fluorofotométricas antes y después de la aplicación ocular y la distribución de las sondas fluorescentes dentro de subzonas específicas de las estructuras oculares revelan cuantitativamente el grado y la localización de acumulaciones de A β asociadas al estado de la EA. Un aumento en la cantidad de péptidos A β acumulados en comparación con un valor normal de control indica una condición neurodegenerativa, tal como EA.

La región del cristalino en la que se forma una catarata supranuclear asociada a la EA no tiene tendencia a formar agregados de alto peso molecular en comparación con la zona nuclear del cristalino. Además, las proteínas del cristalino, una vez formadas, son estables únicamente durante largos períodos de tiempo. Por tanto, las proteínas y péptidos del cristalino no se aclaran fácilmente y tienden a acumularse, mientras que en el cerebro existen múltiples mecanismos implicados en la aclaración de péptidos A β nocivos. Por tanto, la única situación del cristalino A β favorece

la acumulación temprana relativa al cerebro. Esta característica del cristalino aumenta la exactitud y fiabilidad de la detección de agregación y acumulación de A β establecidas de forma temprana durante el transcurso de la enfermedad (por ejemplo, antes de la aparición de síntomas cognitivos o neurológicos visibles).

Proteínas Amiloides

5 La EA se caracteriza por el daño oxidativo y la acumulación patológica de proteínas insolubles en zonas vulnerables del cerebro. Generalmente se piensa que los péptidos A β amiloides tóxicos son los principales elementos patogénicos en la EA. Estos diversos péptidos se generan por la escisión de una proteína más grande, denominada proteína precursora de amiloide (APP) (Selkoe y col., 2000, Annal. de NY Acad. Sci., 924: 17-25). Las proteínas denominadas presenilinas (PS1, PS2) pueden intervenir en la escisión. Otras proteínas asociadas a placas neuríticas incluyen enzimas secretasas- β -amiloide I y II (BASE I y II) que se asocian a las proteínas amiloides. Algunos de los péptidos A β resultantes son más tóxicos que otros. Se cree que el aumento de péptidos A β específicos en el cerebro está asociado casualmente con todas las formas conocidas de la EA. Esta "hipótesis de A β " generalmente aceptada afirma que la generación, depósito y/o acumulación de A β en el cerebro es una ruta común final importante que subraya el proceso de la enfermedad en este trastorno neurológico devastador.

15 Las proteínas amiloides (A β , APP, PS1, PS2) se expresan también en el cristalino de los mamíferos. La agregación de A β ocurre tanto dentro como fuera de las células, dependiendo del estado de avance de la enfermedad neurodegenerativa. El A β puede interactuar de manera anormal con proteínas en el cristalino, por ejemplo cristalinos α de larga vida. Los métodos de diagnóstico descritos en este documento se basan en las siguientes observaciones: i) se acumulan péptidos A β en subzonas específicas del cristalino, ii) los péptidos A β favorecen potencialmente la agregación de proteínas en el cristalino y iii) se asocia una catarata zonular supranuclear profunda característica a la sobreexpresión de A β en un modelo animal diagnosticado correctamente con EA, el ratón de la línea transgénica Tg2576 APP mutante que contiene amiloides, y en cristalinos *postmortem* obtenidos de pacientes humanos diagnosticados de forma independiente y neuropatológicamente de EA.

Detección fluorescente de la acumulación de proteínas asociadas a EA en el ojo

25 Los datos aquí descritos indican que el examen *in vivo* de las proteínas del cristalino proporciona información relevante desde el punto de vista del diagnóstico en referencia a la acumulación de A β que no se puede obtener de órganos menos accesibles, tales como el cerebro. Una ventaja importante de estos métodos es que no son invasivos. Los métodos no invasivos son útiles en la detección de medicamentos *in vivo*, en el diagnóstico, pronóstico y la respuesta de monitorización de pacientes con EA en la intervención terapéutica. La técnica se aprovecha de una sonda de unión a A β de alta afinidad fluorescente lipofílica tal como {(trans,trans)-1-bromo-2,5-bis(3-hidroxicarbonil-4-hidroxi)estirilbenceno (BSB)}. Este compuesto (así como los derivados de unión a A β fluorescentes lipofílicos) se aplica a los ojos y se permite que se distribuya al cristalino.

35 A diferencia de otros métodos que utilizan sondas amiloidofílicas relativamente no específicas, por ejemplo Rojo Congo o tioflavina, los presentes métodos emplean sondas muy específicas para los péptidos A β . Las otras sondas amiloidofílicas se unen a estructuras de proteínas de hoja plegada β presentes en el ojo, mientras que las sondas que tienen como base Crisamina se unen específicamente a A β y a otros fragmentos de APP. La Crisamina G y otros derivados de unión a amiloide de Rojo Congo son útiles como fracción de amiloide de la sonda, una etiqueta perceptible, por ejemplo un fluoróforo se une para permitir el escaneo fluorescente. La Crisamina y otros derivados de Rojo Congo se unen a las proteínas amiloides mediante una unión bidentada que abarca varias cadenas de péptidos amiloides.

40 La cantidad de unión al A β a lo largo del eje óptico se monitoriza mediante técnicas fluorofotométricas de escaneo. La fluorescencia a lo largo del eje óptico se mide antes de la aplicación de la sonda, para determinar la autofluorescencia de referencia. La fluorescencia se mide de nuevo después de la aplicación de la sonda. La fluorescencia se mide en la zona cortical profunda supranuclear del cristalino anterior y posterior, así como en la zona nuclear. La relación fluorescencia cortical-fluorescencia nuclear antes de la aplicación de la sonda se compara con la relación después de la aplicación de la sonda. Por ejemplo, la relación fluorescencia cortical-fluorescencia nuclear antes de aplicar la sonda es 2:2; después de la aplicación de la sonda, la relación es 10:2. La comparación indica acumulación de A β (y un diagnóstico de EA o una predisposición a desarrollar EA). Un valor control normal mínimo o sin fluorescencia detectable en la zona cortical después de la administración de la sonda. La unión de una sonda de unión al A β fluorescente lipofílica, según se indica mediante una señal fluorescente aumentada en la zona cortical del cristalino en comparación con la zona nuclear, proporciona un indicador que se correlaciona con la presencia o ausencia de enfermedad. El grado de acumulación de A β es mayor y más rápido dentro del cristalino en comparación con otros tejidos. Esta acumulación es un indicador de la fase de la enfermedad, es decir, una mayor acumulación se correlaciona directamente con una fase más avanzada de EA o de un estado neurodegenerativo asociado. La magnitud de fluorescencia por encima de la autofluorescencia de referencia se asocia con la gravedad de la enfermedad. Estos datos de unión sirven como indicador biológico o biomarcador de la deposición de A β en el cerebro.

Las sondas específicas de A β son lipofílicas y relativamente sin carga. Por el contrario, las sondas de anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos no son adecuados a la prueba debido a su gran masa molecular y carga.

La naturaleza lipofílica de las sondas establece un acceso eficiente a los tejidos oculares y a través de la barrera lipofílica de las membranas oculares y celulares de las estructuras oculares. Además, la lipofilia facilita el acceso a los compartimentos intracelulares de las células de la zona del cristalino del ojo. Este aspecto de las sondas es fundamental para la detección temprana de la enfermedad, ya que en las fases iniciales de la EA, el A β se acumula dentro de las células en lugar de extracelularmente. Sólo cuando la enfermedad avanza y las células mueren, se hacen evidentes las acumulaciones o placas extracelulares.

Además de las sondas descritas anteriormente que emiten luz en el rango azul-verde del espectro visible, los métodos también utilizan otras sondas que emiten una señal fluorescente (más larga o más corta) fuera del rango de autofluorescencia del cristalino normal (495 nm-520 nm). Varios fluoróforos moleculares pequeños se conjugan con compuestos de unión a amiloides, por ejemplo Crisamina G o clioquinol, utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se utilizan fluoróforos de onda larga, por ejemplo Rojo de Texas y sus derivados. Tales colorantes permiten el escaneo en longitudes de onda, por ejemplo en la gama de infrarrojo lejano, sin interferencia de la autofluorescencia del cristalino normal.

Ejemplo 1: Formación de cataratas asociadas a la EA

La acumulación avanzada de A β en tejidos oculares deriva en la formación de cataratas. A diferencia del cerebro, la zona del cristalino del ojo que se va a escanear se caracteriza por una escasa renovación de proteínas. Las proteínas del cristalino son estables y no se aclaran durante décadas. Por tanto, el aumento en la producción de proteínas APP, por ejemplo péptidos A β , se detecta muy pronto en el avance de la enfermedad y se mantiene estable y detectable durante largos períodos de tiempo.

La EA se caracteriza por la acumulación cerebral de agregados de proteínas compuestas por péptidos A β . Antes o simultáneamente a la acumulación de péptidos A β en el cerebro, los péptidos se acumulan y se pueden detectar en los tejidos oculares. Recientemente se ha detectado la formación de cataratas corticales (supranucleares) profundas asociadas a la EA en cristalininos de pacientes humanos con EA *postmortem* y en ratones de la línea transgénica Tg2576 que presentan amiloides.

Los péptidos A β del cristalino se analizaron utilizando fotomicroscopía de lámpara de hendidura, inmunomicroscopía electrónica usando anticuerpos ligados a partículas de oro (EM), Western blot cuantitativo, co-inmunoprecipitación y turbidometría *in vitro*. Los cristalininos de casos verificados neuropatológicamente de EA muestran cataratas en la zona supranuclear del cristalino. En sujetos de control normales, la formación de cataratas en esta zona es poco frecuente. Se detectó acumulación de A β y cataratas supranucleares en el tejido ocular *postmortem* de pacientes con EA y en ratones de la línea transgénica Tg2576, un modelo reconocido en el estado de la técnica para humanos con EA. Los estudios EM de cristalininos humanos con EA mostraron grupos de microagregados inmunorreactivos A β en el citoplasma de las células de fibra corticales. La mayor parte del cristalino A β se asocia con otras proteínas, incluyendo A β -cristalino. El A β favorece la agregación de proteínas humanas del cristalino humano a través de mecanismos oxidativos dependientes de trazas de metales.

Estos datos indican que la agregación de proteínas A β intracelulares deriva en la formación de cataratas supranucleares. La acumulación de agregados en el cristalino asociados a A β se produce pronto en la EA y permanecen *in situ*. Por tanto, el cristalino proporciona una "ventana molecular" periféricamente accesible en procesos amiloidogénicos cerebrales. Los métodos de diagnóstico y escaneo no invasivos para cuantificar A β en el ojo permiten la identificación temprana y fiable de la EA en pacientes con EA subclínica o que tienen predisposición a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa tal como la EA.

Ejemplo 2: Perfiles amiloidogénicos, citotóxicos y redox de péptidos A β

Las cataratas relacionadas con la edad (CRE) y la enfermedad de Alzheimer (EA) se caracterizan por el daño oxidativo y la acumulación patológica de proteínas agregadas. Los péptidos A β y las proteínas asociadas a la EA se expresan en el cristalino. Las reacciones a las metaloproteínas están relacionadas con perfiles amiloidogénicos, citotóxicos y redox de diferentes péptidos A β .

La contribución de los péptidos A β y de la química de metaloproteínas a la agregación de proteínas en el cristalino se estudió de la siguiente manera. Se examinaron cristalininos de ratones transgénicos Tg+ que contienen amiloides (vs Tg) y especímenes humanos mediante fotomicroscopía de lámpara de hendidura y se analizaron para A β y APP mediante Western blot cuantitativo, EM e inmunohistoquímica. Se realizaron estudios de agregación *in vitro* mediante la incubación de la proteína soluble total del cristalino (TLP) con péptidos A β sintéticos, quelantes, barredores antioxidantes, seguida de un análisis de densidad óptica, Western blot y pruebas de amiloides estándar.

Los datos indican que 1) A β y APP se expresan en el cristalino, 2) A β se encuentra como especie monomérica, oligomérica, reticulada y agregada, 3) los ratones de la línea transgénica Tg2576 APP mutante desarrollan cataratas "zonulares" supranucleares bilaterales, 4) la agregación TLP *in vitro* depende de trazas de metales y de motas reactivas de oxígeno (ROS) y 5) A β , en concreto el humano altamente amiloidogénico A β 1-42, potencia notablemente la

agregación TLP en un modo peptido-específico y metal-dependiente /ROS. A β 1-42 en el cristalino contribuye a cataratogénesis y es un indicador de EA o de una predisposición a la misma. Los datos también sugieren que los procesos que contribuyen al desarrollo de la EA y ARC están bioquímicamente vinculados.

5 Metales como el cobre, el zinc y el hierro se asocian claramente con A β . Los metales se co-localizan en acumulaciones o placas de A β . En consecuencia, un agente quelante metálico fluorescentes lipofílico, por ejemplo clioquinol, es útil para detectar depósitos de A β en la zona cortical del cristalino. Los compuestos de unión a metales se emplean solos (siempre que exhiban fluorescencia detectable) o se modifican mediante la unión de un fluoróforo para facilitar o aumentar la fluorescencia. Las sondas metálicas de unión a amiloide descritas en este documento se pueden administrar terapéuticamente para prevenir la agregación de proteínas.

10 Otras realizaciones se encuentran dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto lipofílico marcado de manera detectable que comprende un fluoróforo que se une a una proteína amiloide en el tejido ocular para su utilización en un método de diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer en un mamífero, comprendiendo el diagnóstico poner en contacto el tejido ocular con el compuesto, donde un aumento de la unión de dicho compuesto a dicho tejido ocular en comparación con un nivel de control normal de unión indica que dicho mamífero padece o está en riesgo de desarrollar la Enfermedad de Alzheimer.
- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo emite en una longitud de onda de luz fuera de los espectros azul-verde.
3. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo emite en una longitud de onda de luz por encima de 520 nm.
- 15 4. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo emite en una longitud de onda de luz en el rango infrarrojo.
- 20 5. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo emite en una longitud de onda de luz inferior a 450 nm.
- 25 6. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo es un compuesto Crisamina.
7. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto se une preferentemente a un polipéptido β -amiloide (A β).
8. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto se une preferentemente a A β (1-42).
- 30 9. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho fluoróforo es {(trans,trans)-1-bromo-2,5-bis(3-hidroxicarbonil-4-hidroxi)estirilbenceno (BSB)}.
- 35 10. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque el citado diagnóstico comprende la formación de una imagen de una zona cortical de un ojo.
11. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho diagnóstico comprende formar la imagen de una zona supranuclear de un ojo.
- 40 12. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho diagnóstico comprende formar la imagen de la región del humor acuoso de un ojo.
13. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque el citado aumento es al menos un 10% superior al mencionado valor de control normal.
- 45 14. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho aumento es al menos un 25% superior a dicho valor de control normal.
- 50 15. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho aumento es al menos un 50% superior a dicho valor de control normal.
16. Compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho aumento es al menos un 100% superior a dicho valor de control normal.

- 5
17. Compuesto lipofílico marcado de manera detectable que comprende un fluoróforo que se une a una proteína amiloide en el tejido ocular para su utilización en la determinación del pronóstico de la Enfermedad de Alzheimer en mamíferos, comprendiendo la determinación del pronóstico poner en contacto el tejido ocular con el compuesto, cuantificar la unión del compuesto al tejido ocular y comparar el nivel de unión con el nivel de control normal de unión, donde la detección de un aumento de unión del compuesto al tejido ocular con el tiempo en comparación con un nivel de control normal de unión indica un pronóstico desfavorable.