

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 278**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2009 PCT/US2009/057569**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10033861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 09815306 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2323696**

54 Título: **Método óptico para la detección de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:
18.09.2008 US 98206 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2018

73 Titular/es:
**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (50.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048, US y
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(50.0%)**

72 Inventor/es:
**KORONYO, MAYA;
BLACK, KEITH, L.;
SCHWARTZ, MICHAL;
FARKAS, DANIEL, L. y
KORONYO, YOSEF**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 694 278 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

Método óptico para la detección de la enfermedad de Alzheimer

5 Campo de la materia

La presente materia se refiere a la curcumina para su uso en métodos para el monitoreo no invasivo de eventos patológicos tempranos específicos de la enfermedad de Alzheimer, y por lo tanto incluye los métodos y sistemas para el diagnóstico, pronóstico y evaluación de la respuesta al tratamiento de la AD.

10

Antecedentes de la materia

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad, común y devastadora. La patología cerebral por AD se caracteriza por la acumulación típica de los productos proteolíticos de la proteína precursora de amiloide (APP), péptidos β amiloides ($A\beta$), que forman agregados extracelulares denominados placas de $A\beta$. Se cree que estas placas contribuyen a alterar las actividades celulares y la comunicación en el cerebro, lo que conduce a una inflamación neurotóxica y muerte neuronal [2,3]. Las imágenes moleculares, que permiten un monitoreo no invasivo de los procesos patológicos en los sujetos vivos, tienen el potencial de mejorar la detección y la comprensión de la enfermedad y la eficacia de los fármacos. En consecuencia, se han invertido grandes esfuerzos en el desarrollo de herramientas para permitir la detección no invasiva de las placas amiloides a través del cráneo de pacientes con AD vivos y modelos animales [4-9]; sin embargo, el monitoreo no invasivo de las placas amiloides sigue siendo un reto clínico y de disponibilidad limitada en alta resolución [10-12]. Las imágenes ópticas constituyen una herramienta poderosa, de alta resolución y específica en la formación de imágenes in vivo, como se demostró recientemente con el uso de la microscopía multifotónica para obtener las imágenes de placas de $A\beta$ in vivo en el cerebro del ratón a través de una ventana craneal [13]. La presente materia plantea un enfoque alternativo y no invasivo en humanos para obtener imágenes de la retina de pacientes con AD mediante modalidades ópticas, siempre y cuando las placas de $A\beta$ se desarrollen en las retinas de estos pacientes y compartan propiedades similares con las del cerebro.

La APP se expresa ampliamente en las células ganglionares de la retina (RGC), una sobreexpresión del sistema nervioso central (SNC), y se transporta a la membrana plasmática axonal y los terminales nerviosos a través del nervio óptico [14]. Recientemente se investigó la formación de placas en la retina, especialmente en dos trastornos neurodegenerativos relacionados: la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma [50 - 53]. No estaba claro si las placas de $A\beta$ se encontraban en la retina en la etapa temprana o tardía de los pacientes con AD. Pruebas anteriores apuntaban a la presencia de placas de $A\beta$ en las retinas de pacientes con glaucoma y con AMD y sus modelos en roedores. Por ejemplo, el depósito de $A\beta$ en la capa de RGC se ha informado en pacientes con glaucoma [50, 51]. En los modelos experimentales de glaucoma, la apoptosis de las RGC se ha asociado con la acumulación de péptidos $A\beta$, y se demostró que los agentes dirigidos a su formación ejercen actividad neuroprotectora [52]. En pacientes con AMD, se encontraron depósitos de $A\beta$ en drusas que se correlacionaban con la ubicación de los fotorreceptores degenerativos y las células epiteliales pigmentarias de la retina [53].

En un modelo transgénico de AD en *Drosophila*, basado en la expresión dirigida de genes humanos mutados de APP y presenilina (PS), se encontró inmunoreactividad de $A\beta$ en el ojo compuesto, y en asociación con la degeneración de los fotorreceptores de la retina [15]. Un estudio reciente demostró depósitos de $A\beta$ en la capa de fibras nerviosas de la retina (NFL) y la capa de células ganglionares (GCL) en ratones transgénicos con AD en una etapa avanzada de la enfermedad (más de 10 meses de edad). Los depósitos de $A\beta$ se correlacionaron aún más con la neurodegeneración de las RGC y con la activación microglial [16].

A pesar de esta investigación alentadora, continúa existiendo una necesidad en la técnica de sistemas y métodos para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la AD. El presente tema satisface estas necesidades al descubrir la presencia de placas de $A\beta$ en retinas de ojos postmortem de pacientes con AD. Con el uso de ratones que expresan formas mutadas de los genes humanos APP y PS1 (APP^{swe}/PS1^{dE9}, referidos en la presente como ratones AD-Tg), la presente materia proporciona además la evidencia que describe la formación temprana de placas de $A\beta$ en la retina antes de su manifestación en el cerebro. Además, la presente descripción describe una terapia basada en el sistema inmunitario, con el uso de un agonista débil de un péptido derivado de la mielina cargado en las células dendríticas [17, 18], que es efectivo para reducir las placas de $A\beta$ en los cerebros y retinas de ratones AD-Tg. Finalmente, la materia demostró que la inyección sistémica de curcumina (diferuloilmetano), un compuesto natural que une y marca las placas de $A\beta$ [19, 20], en animales vivos permite la visualización no invasiva de alta resolución y específica de las placas de $A\beta$ en la retina. La presente materia muestra a la curcumina para su uso en los métodos que, por primera vez, permiten que las placas de $A\beta$ se detecten en número y ubicación, y que se cuenten y monitoreen repetidamente en tiempo real en la retina de los mamíferos con AD.

El documento de la patente núm.US 2004/0152068 (BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, GENERAL HOSPITAL CORP) se relaciona con un método para diagnosticar o proporcionar un pronóstico con respecto al estado de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero para diagnosticar o proporcionar un pronóstico con respecto al estado de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero al poner en contacto un tejido ocular con un compuesto de etiqueta detectable, que se une a una proteína amiloide.

Breve descripción de las figuras

5 Las modalidades representativas se ilustran en las figuras enumeradas. Se pretende que las modalidades y figuras descritas en la presente descripción se consideren representativas en lugar de restrictivas.

10 La Figura 1 describe, para propósitos de referencia e información, el depósito de A β retiniana en la retina de los ratones AD-Tg visualizados con curcumina. Las Figuras 1a - 1f describen las imágenes de criosecciones cerebrales de ratones AD-Tg de 9 meses de edad (Figuras 1a - 1e) y no Tg (silvestres) (Figura 1f) teñidos con anticuerpo anti-A β humano y curcumina *ex vivo*, lo que indica la colocalización de la tinción de las placas de A β por ambos métodos de detección. Las Figuras 1d y 1e describen imágenes de mayor aumento del patrón de tinción de las placas presentadas para cada canal, la Figura 1f no muestra evidencia de la presencia de placas doble positivas para anti-A β humano y curcumina en el ratón no-Tg (wt). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Barra de escala = 100 μ m. Las Figuras 1g - 1j son imágenes representativas de la retinas humanas de montaje completo de ratones AD-Tg (n=27) y no-Tg (wt) (n=18) de 10 meses teñidos con anticuerpo anti-A β y curcumina *ex vivo*. La formación de placas de A β (manchas amarillas de canales rojos y verdes superpuestos) se demuestra en varias capas de retina diferentes: La Figura 1g muestra la capa plexiforme interna IPL, la Figura 1h muestra las capas plexiformes nuclear interna INL/externa OPL, y la Figura 1i representa la capa nuclear externa ONL. La Figura 1j muestra que las placas de A β estaban esencialmente ausentes en los ratones no-Tg (silvestres). (Figura 1g y 1j, fila abajo). Las imágenes de mayor aumento para canales separados demuestran los patrones de tinción de placa con ambos procedimientos. Barras de escala = 5 μ m. Figuras 1k - Se representa las criosecciones sagitales oculares completas teñidas con curcumina *in vivo*, seguida de un anticuerpo anti-A β humano y DAPI *ex vivo*. En las Figuras 1k - 1m, se detectaron las placas de A β en la mayoría de las capas retinianas y en la coroides en ratones AD-Tg de 10 meses de edad. En la Figura 1n, las placas de A β fueron indetectables en la retina y la coroides de ratones no-Tg (wt). Barra de escala = 20 μ m.

25 La Figura 2 muestra, para propósitos de referencia e información, las placas de A β en la retina humana de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Las Figuras 2a y 2b son imágenes representativas de la retina humana de montaje completo de un paciente con AD de 87 años de edad después de teñirse con negro sudán B para eliminar las señales de autofluorescencia no específicas, y después de la tinción con curcumina *ex vivo* (las placas marcadas con curcumina se indican con flechas blancas). Barras de escala = 10 μ m. Los núcleos celulares se marcan con DAPI (azul). Las Figuras 2c y 2d muestran imágenes de mayor aumento de la retina humana de montaje completo de un paciente con AD de 65 años después de la tinción con negro sudán B (manchas negras para la tinción con Sudán), y después, la tinción con curcumina (la placa marcada con curcumina se indica mediante flechas blancas). Barras de escala = 5 μ m. Las Figuras 2e - 2g proporcionan ejemplos adicionales de placas de curcumina positivas en las retinas de una serie de pacientes con AD humanos de 65 a 90 años de edad. Las Figuras 2h - 2j son imágenes representativas de la retina humana de montaje completo de pacientes con AD de 65 y 87 años teñidos con anticuerpos anti-A β humano, seguido de un tratamiento con negro sudán B a varias profundidades de la retina (para incluir RGC e IPL). La Figura 2i representa una imagen de mayor aumento de la placa retiniana. La morfología de la placa A β fue similar a la encontrada en las retinas y cerebros de los ratones. Barras de escala = 5 μ m. Las Figuras 2k - 2m representan la tinción posterior de las mismas retinas humanas con curcumina, lo que revela que las placas se combinaron selectivamente con anticuerpos A β humanos y curcumina (imágenes de la fila inferior para canales separados). La Figura 2n representa la doble tinción con anticuerpos A β humanos y curcumina en un retina de montaje completo humana postmortem de un no AD que no muestra signos de placas de A β (imágenes de la fila inferior para canales separados). Barras de escala = 5 μ m.

45 La Figura 3 muestra, para propósitos de referencia e información, las formaciones de la placa A β en la retina de ratón en la etapa temprana presintomática y la acumulación durante la progresión de la enfermedad. Después de las inyecciones i.v. con curcumina en la vena de la cola, las placas de A β fueron visibles en las retinas y cerebros de los ratones AD-Tg. Las Figuras 3a - 3n son imágenes representativas de la proyección en el eje z de retinas de montaje completo de ratones AD-Tg (n=18) y no Tg (silvestre; n=10) a diversas edades; las Figuras 3a - 3d representan los ratones AD-Tg de 2,5 meses de edad, con la Figura 3a que muestra la presencia de placas en la retina y la Figura 3b que muestra la validación de la tinción de la placa A β mediante el uso de un anticuerpo antihumano específico *ex vivo* en la misma ubicación (colocalización de la curcumina y el anticuerpo A β en amarillo). Barras de escala = 10 μ m. Las figuras 3c y 3d muestran que no se detectaron placas en el hipocampo y la corteza del cerebro. Barras de escala = 100 μ m. Las Figuras 3e - 3h representan ratones AD-Tg de 5 meses de edad, con la Figura 3e representando la presencia de placas en la retina y la Figura 3f después de la tinción con el anticuerpo A β específico *ex vivo*. Barras de escala = 10 μ m. Las figuras 3g y 3h muestran la detección de placas en el cerebro. Barras de escala = 50 μ m. Las Figuras 3i - 3k representan ratones AD-Tg de 9 meses de edad, con la Figura 3i mostrando múltiples placas en la retina y las Figuras 3j y 3k mostrando placas en el cerebro. Barras de escala (i) = 10 μ m y (j,k) = 50 μ m. Las Figuras 3l - 3n representan un ratón AD-Tg de 17 meses de edad, con la Figura 3l mostrando numerosas placas en la retina y las Figuras 3m y 3n mostrando placas en el cerebro. Barras de escala (i) = 10 μ m y (m,n) = 100 μ m. Las Figuras 3o - 3q representan ratones no Tg (wt) de 9 meses de edad, con la Figura 3o sin placas en la retina y las Figuras 3p y 3q sin placas en el cerebro. Barras de escala (o) = 10 μ m y (p,q) = 100 μ m.

60 La Figura 4, para propósitos de referencia e información, muestra las placas de A β disminuidas en la retina de ratones AD-Tg después de la vacunación con las células dendríticas. Las Figuras 4a - 4g son imágenes representativas de proyección del eje z de las preparaciones completas de retina de ratones de 10 meses de edad, las Figuras 4a - 4c muestran el control de ratón AD-Tg tratado con PBS, las Figuras 4d - 4f muestran el ratón AD-Tg vacunado, y la Figura 4g muestra ratones no Tg (wt) teñidos *ex vivo* con curcumina y anticuerpos anti-A β humanos. Las Figuras 4b y 4c, y las

Figuras 4e y 4f representan imágenes de canales separados para el marcaje de anticuerpos de curcumina y anti-A β en la retina. Barras de escala = 10 μ m. La Figura 4h es una ilustración de 12 regiones alrededor del disco óptico (indicado por los rectángulos 1-12) que representan el área cubierta para el análisis cuantitativo de las placas en las preparaciones completas de retina (n=4 ratones por grupo; dos retinas por ratón). Barra de escala = 200 μ m. La Figura 4i muestra la disminución en el número de placas, observada en las retinas de los ratones AD-Tg tratados con la vacunación de base inmunológica en comparación con los controles tratados con PBS (*prueba de t de student*; $P=0,0028$). La Figura 4j muestra una disminución en el área promedio de la placa, observada en las retinas de ratones AD-Tg vacunados en comparación con sus controles (*prueba de t de student* $P=0,0002$). La Figura 4k muestra que la reducción significativa en el área total cubierta por las placas se detectó además en el hipocampo cerebral y la corteza de los mismos ratones después de la vacunación de base inmunológica (*prueba t de student* = $0,0085$). Las barras de error en cada panel representan SEM.

La Figura 5 representa la formación de imágenes *in vivo* de las placas marcadas con curcumina en las retinas del ratón AD-Tg. Las Figuras 5a a 5c son imágenes representativas de proyección en el eje z de las preparaciones completas de retina de ratones AD-Tg no perfundidos frente a ratones no Tg (wt) (10 meses de edad), seguido por la administración i.v. de curcumina o PBS *in vivo* (los vasos sanguíneos se indican por flechas rojas). La Figura 5a muestra que las placas de A β estaban visibles (indicadas por flechas blancas) en las retinas del ratón AD-Tg después de la inyección i.v. de curcumina (n=6). La Figura 5b muestra que las placas estaban indetectables en las retinas de ratones AD-Tg después de la inyección i.v. con PBS (n=5). La Figura 5c muestra que las placas estaban indetectables en las retinas de ratones no Tg (wt) después de la inyección i.v. de curcumina (n=5). La Figura 5d es una imagen de proyección confocal representativa del eje z, que utiliza tres canales y secciones virtuales sagitales/coronales, que demuestran las placas de A β (placas dentro de los vasos indicadas con flechas blancas), teñidas con anticuerpos anti-A β humanos, en el parénquima y dentro de los vasos sanguíneos de la retina de montaje completo del ratón AD-Tg. Las Figuras 5e y 5f representan las imágenes capturadas con el uso de un microscopio de fluorescencia con un sistema de imágenes espectrales basado en AOTF, y analizadas y visualizadas con el programa de clasificación y segmentación. En la Figura 5e, las placas de A β (en blanco) y los vasos sanguíneos (indicados por flechas), fueron visibles en una retina de montaje completo teñida *in vivo* con curcumina y en un solo canal (ex. 562/40 nm; em. 624/40 nm). La Figura 5f representa una imagen espectralmente clasificada con el uso de una firma óptica (OS) específica para las placas de A β marcadas con curcumina en la misma región y retina de montaje completo. Las placas de A β se muestran en pseudocolor (indicado por flechas blancas) y todo el tejido sin placa está en pseudocolor verde. Barras de escala = 10 μ m. Las figuras 5g - 5j son imágenes después de una inyección única de curcumina, en donde las placas (indicadas con flechas blancas) fueron visibles en las retinas de ratón AD-Tg vivo (n=4) por emisión de luz después de la excitación con una fuente espectralmente controlada (longitud de onda de 546/15 nm). Las Figuras 5i y 5j son imágenes de mayor aumento, donde las placas se detectaron principalmente en las áreas cercanas al disco óptico y el tamaño promedio de la placa fue compatible con el observado en las preparaciones completas de retina (*ex vivo*). La Figura 5k no muestra placas detectadas en los ratones no Tg (wt) (n=4) inyectados i.v. con curcumina. Barras de escala (g, k) = 100 μ m, y (h-j) = 10 μ m. 23.

La Figura 6 representa un diagrama de flujo de un sistema de imágenes espectrales para diagnosticar, pronosticar, y analizar placas de A β de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

La Figura 7 representa un diagrama de flujo de un sistema de imágenes espectrales para diagnosticar, pronosticar y/o analizar placas de A β de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

La Figura 8 muestra imágenes de alta resolución de las placas retinianas pequeñas (en su mayoría <1 μ m de diámetro), que se originaron en el gen de APP endógeno de ratón. Las imágenes son de una retina de ratón no Tg (wt) de 10 meses de edad.

La Figura 9 muestra imágenes de las retinas de ratón AD-Tg y no Tg (wt) vivo que muestran las placas teñidas con curcumina en la retina de AD-Tg, y la ausencia de placas teñidas con curcumina en la retina de no-Tg (wt).

Descripción detallada de la invención

A menos que se especifique de cualquier otra forma, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton y otros., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3ra ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Marzo, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5ta ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ra ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporciona a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos que se usan en la presente solicitud.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción, los que podrían usarse en la práctica de la presente invención. Ciertamente, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos.

"Administrar" y/o "Administra" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier vía para suministrar una composición farmacéutica a un paciente. Las vías de administración pueden incluir vías orales no invasivas (a través de la boca), tópicas (piel), transmucosas (nasales, bucales/sublinguales, vaginales, oculares y rectales) e inhaladas, así como vías parenterales y otros métodos conocidos en la técnica. Parenteral se refiere a la ruta de administración que se asocia generalmente con una inyección, que incluye inyección intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal,

intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. Por la vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados.

5 "Enfermedad de Alzheimer", como se usa en la presente descripción, se refiere a toda forma de demencia, identificada como un trastorno cognitivo degenerativo y terminal. La enfermedad puede ser estática, resultado de una lesión cerebral global única, o progresiva, lo que resulta en un declive en la función cognitiva a largo plazo debido al daño o enfermedad en el cuerpo más allá de lo que podría esperarse del envejecimiento normal.

10 "Degeneración macular relacionada con la edad", como se usa en la presente descripción, se refiere a una afección médica en adultos mayores que produce una pérdida de la visión en el centro del campo visual (la mácula) debido al daño en la retina.

15 "Cataratas", como se usa en la presente descripción, se refiere a una opacidad que se desarrolla en la lente cristalina del ojo o en su envoltura, que varía en grado de opacidad leve a completa y obstruye el paso de la luz. Al inicio del desarrollo de la catarata relacionada con la edad, el poder de la lente puede aumentar, lo que ocasiona miopía (miopía), y el amarillamiento y opacidad gradual de la lente pueden reducir la percepción de los colores azules. Las cataratas generalmente progresan lentamente para causar pérdida de la visión y son potencialmente cegadoras si no se tratan.

20 "Marcador fluorescente", como se usa en la presente descripción, se refiere a todos y cada uno de los compuestos que contienen fluoróforos para unir el compuesto a otra molécula, como una proteína o un ácido nucleico. Esto se logra generalmente con el uso de un derivado reactivo del fluoróforo que se une selectivamente a un grupo funcional contenido en la molécula objetivo.

25 "Glaucoma", como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo de enfermedades que afectan el nervio óptico e implica una pérdida de células ganglionares de la retina con un patrón característico. El glaucoma se clasifica como un tipo de neuropatía óptica.

30 "Mamífero" como se usa en la presente se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, incluyendo, sin limitación, los humanos y los primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y monos, los animales de granja como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra, se pretende que estén incluidos dentro del alcance de este término.

35 "Cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente se refiere a una cantidad que es capaz de lograr resultados beneficiosos en un mamífero que se trata. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada sobre una base individual y se basará, al menos en parte, en la consideración de las características fisiológicas del mamífero, el tipo de sistema de entrega o técnica terapéutica utilizada y el tiempo de administración en relación con la progresión de la enfermedad, trastorno, o afección que se trata.

40 "Tratamiento" y "tratar," como se usa en la presente descripción se refiere al tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objetivo es prevenir, disminuir (aliviar) la afección, enfermedad o trastorno patológico específico, incluso si el tratamiento en última instancia, no tiene éxito. Aquellos que necesitan el tratamiento pueden incluir los que ya están con el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno, y en los que el trastorno debe evitarse.

45 El depósito de β -amiloide es fundamental para la neuropatología de la AD y un sello clave de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el monitoreo de las placas de A β en los cerebros de los pacientes con Alzheimer y animales vivos está limitado por la resolución y especificidad actuales de la MRI y la PET, y un diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer u otra enfermedad o afección caracterizada por la formación de placas de A β solo es posible después autopsia de tejido cerebral mediante el seguimiento del número y distribución de placas y ovillos. Por lo tanto, desarrollar medios para identificar las placas *in vivo* es esencial para el diagnóstico, así como para la evaluación de la progresión de la enfermedad en respuesta a las terapias.

50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona curcumina para su uso en métodos como se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

55 Un aspecto de la invención proporciona curcumina para su uso en un método para diagnosticar o pronosticar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, comprendiendo dicho método:

60 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 examinar las imágenes para los péptidos A β teñidos; y ya sea
 (i) diagnosticar que el mamífero tiene la enfermedad de Alzheimer si están presentes los péptidos A β teñidos; o
 65 (ii) cuantificar el aumento/disminución de péptidos de A β teñidos en la retina del sujeto, en comparación con un diagnóstico previo; y

generar un pronóstico basado en el nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del sujeto.

Otro aspecto de la invención proporciona curcumina para su uso en un método para evaluar la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero que comprende:

5 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos; y
 evaluar la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer basado en el nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del mamífero.

10 Otro aspecto de la presente invención proporciona curcumina para su uso en un método para evaluar la efectividad del tratamiento para una dolencia de retina asociada al péptido de A β en un mamífero, dicho método que comprende:

15 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos; y
 evaluar la efectividad del tratamiento para el péptido de asociado a la dolencia de la retina en función del nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del mamífero.

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona curcumina para su uso en un método para identificar péptidos de A β en una retina de mamífero, dicho método que comprende:

administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes; y
 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos.

25 La presente descripción establece la formación de placas retinianas de A β en mamíferos y curcumina para su uso en métodos para identificar, cuantificar y obtener imágenes de la placa retiniana de A β . La presente materia puede incorporarse para pacientes con enfermedad de Alzheimer, demencia y otras afecciones clínicas y dolencias caracterizadas por la formación de placas de A β . Además, la presente materia descubrió que la formación de placas de A β en la retina de pacientes con AD precedió a su aparición en el cerebro. Por consiguiente, la presente materia describe la curcumina para su uso en un método para el diagnóstico temprano de AD en un mamífero que comprende las etapas de administrar un marcador fluorescente (es decir, curcumina) al paciente para teñir las placas de A β en la retina y obtener imágenes de la retina del paciente con un sistema de imagen óptico para identificar los péptidos de A β teñidos.

35 Otra modalidad de la presente materia muestra la curcumina para su uso en un método que pronostica AD en mamíferos al medir el aumento o la disminución de las placas de A β en la retina de pacientes antes y después del tratamiento. El método de pronóstico comprende las etapas de administrar un marcador fluorescente al paciente para teñir las placas de A β en la retina y obtener imágenes de la retina del paciente con un sistema de imagen óptico para identificar los péptidos de A β teñidos, seguido de la administración de un tratamiento AD al paciente y dejar el debido tiempo para que el tratamiento de la AD tenga efecto. Y, volver a administrar un marcador fluorescente al paciente para teñir las placas de A β en la retina después del tratamiento con AD y obtener imágenes de la retina del paciente con el sistema óptico de imagen para identificar un aumento o disminución de los péptidos de A β teñidos.

45 Para propósitos de información, en la presente se describe un método para tratar la AD en pacientes mamíferos, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz al paciente de péptidos derivados de la mielina y/o agonistas de los péptidos derivados de la mielina para reducir la formación y disolver la existencia de las placas de A β .

50 Para propósitos de información, en la presente se describen métodos para mejorar la vista en pacientes de mamíferos que contienen placas de A β retinianas, que comprenden las etapas de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de péptidos derivados de la mielina y/o agonistas de péptidos derivados de la mielina. El método para mejorar la vista puede aplicarse en los pacientes con AD, demencia u otras afecciones clínicas y dolencias caracterizadas por la formación de placas de A β , tal como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma.

55 La materia describe que las placas de A β están presentes en la retina de los mamíferos y pueden utilizarse para analizar, pronosticar y diagnosticar una multitud de otras afecciones clínicas y dolencias caracterizadas por las placas de A β en la retina. Las afecciones clínicas y dolencias representativas pueden incluir la AMD y el glaucoma.

60 Los descubrimientos adicionales útiles en el contexto de la invención incluyen un sistema de imagen óptico para visualizar las placas de A β *in vivo* en la retina de pacientes humanos y mamíferos no humanos. El sistema de imágenes ópticas incorpora el uso de microscopios de fluorescencia, lámparas de arco de mercurio y xenón, una cámara CCD, un aparato de adquisición de imágenes espectrales basadas en AOTF (filtros de ajuste acústico-óptico) y un programa de imágenes para su análisis posterior. El sistema de imágenes ópticas incorpora las herramientas anteriores para proporcionar imágenes en la retina de las placas de A β teñidas, proporcionando una representación visual en pseudocolor de la firma espectral extraída de las imágenes en bruto, que representa el tamaño y la ubicación de las placas de A β objetivo.

5 En una modalidad alternativa, el sistema de imágenes ópticas incorpora el uso de un estereomicroscopio que se ajusta para visualizar las señales de fluorescencia y dispersión en resoluciones más altas. El estereomicroscopio puede equiparse con una fuente de luz de longitud de onda variable Policromática V. En modalidades adicionales, el sistema de imágenes ópticas puede incorporar una cámara digital en color MicroFire y una o más lentes de aumento para mejorar la ampliación y el detalle de la imagen. La adquisición de imágenes se logra y se perfecciona mediante la segmentación y clasificación de imágenes posteriores al análisis mediante el uso de un programa de imágenes.

10 El sistema de imágenes ópticas puede incorporarse en los métodos descritos en la presente. Además, el sistema de imágenes ópticas puede aumentarse con una óptica adaptativa, que se utiliza para mejorar el rendimiento del sistema de imágenes ópticas al reducir los efectos de la distorsión óptica que cambia rápidamente.

15 En aun otra modalidad, la materia puede utilizarse para el desarrollo y prueba de fármacos. Dado que los métodos de imágenes no invasivas y repetitivas rápidamente pueden permitir la comparación de varios fármacos y varias dosis de fármacos, la presente materia puede encontrar una utilidad favorable en el desarrollo y las pruebas de fármacos.

20 Un informe anterior identificó la patología de A β en el cerebro, basándose en el hallazgo de la acumulación de A β en las lentes de los pacientes con AD [31]. El estudio actual proporciona evidencias de la existencia de placas de A β en las retinas de pacientes con AD que pueden visualizarse específicamente mediante la curcumina. Se encontraron placas de A β en la retina de todos los pacientes con AD examinados, mientras que no se pudieron detectar en los controles sin AD. Tanto en ratones AD jóvenes como en adultos, se observó una buena correlación entre la patología de la placa de A β retinal y cerebral; las placas se acumularon dependiente de la edad durante la progresión de la enfermedad, y tanto la retina como el cerebro mostraron una reducción de la placa de A β como respuesta a la misma modalidad terapéutica. En general, el tejido retiniano, que comparte muchas similitudes con el cerebro, puede usarse potencialmente para el diagnóstico y monitoreo de la AD.

30 En el presente estudio, las placas de A β en las retinas de los pacientes con AD se detectaron principalmente dentro de la capa RGC. En los ojos de ratones con AD, se observaron placas en la mayoría de las capas retinianas y en la coroides. Se notificaron placas desde NFL hasta ONL, y se observaron con mayor frecuencia agrupaciones de placas de A β en las capas internas de la retina, lo que significa la posibilidad de obtener imágenes de la placa a través de los ojos de los sujetos vivos. Las retinas de ratones con AD experimentan un aumento dependiente de la edad con respecto a la carga de placa A β en términos de número y tamaño, similar a la acumulación de placas dependiente de la edad observada en el cerebro. Nuestros resultados que demuestran la patología de la placa retiniana son consistentes con un informe reciente que revela el depósito de A β retiniano en correlación con la inflamación y degeneración retinianas en ratones AD-Tg adultos y longevos [16]. En la presente materia, no solo proporcionamos evidencias que apoyan un vínculo entre la patología de la placa retiniana y cerebral, sino que también mostramos que las placas de A β son detectables en la retina antes de su detección en el cerebro, en ratones AD-Tg jóvenes. Además, pudimos mostrar una reducción significativa de las placas de A β en las retinas de ratones AD-Tg después de la vacunación con el péptido derivado de la mielina; se encontró que este tratamiento, así como los relacionados, fueron efectivos para atenuar la carga de la placa de A β en el cerebro [17,24,25]. Estos hallazgos establecen que la evaluación de las placas de la retina puede usarse para evaluar las respuestas a la terapia de reducción de la placa, y que las placas de la retina pueden responder al mismo tratamiento que es efectivo en la reducción de la placa de A β en el cerebro.

45 Es importante destacar que el hecho de que se observaron placas en el GCL de los ojos humanos, que alcanzan un tamaño de más de 5 μ m, hace que las imágenes de pacientes de Alzheimer a través de la retina sean un enfoque viable, con algunas modificaciones, incluso con las herramientas actualmente disponibles para la formación de imágenes del ojo humano, tal como un oftalmoscopio de óptica adaptativa [32]. En ratones vivos, una cámara retinal midriática disponible en el mercado, se encontró que era eficaz en el registro de fotografías del fondo de ojo permitiendo evaluar los cambios longitudinales de las células ganglionares de la retina [33]. Un sistema de oftalmoscopio láser de barrido confocal de luz azul (bCSLO) que se modificó para visualizar la proteína fluorescente cian, proporciona además un enfoque no invasivo para visualizar RGC en la retina del ratón vivo [34]. En la presente, para la prueba de concepto, se pudo detectar las placas marcadas con curcumina en ratones vivos con el uso de un estereomicroscopio (Leica S6E) equipado con una fuente de luz espectral policromática V y una lente doble convexa. Además, al utilizar un sistema AOTF, se pudo detectar las placas retinianas de A β mediante curcumina y eliminar las fuertes señales de autofluorescencia de fondo (de los glóbulos rojos).

60 En el presente estudio, la curcumina fue eficaz en la detección de las placas de A β en la retina cuando se administra sistémicamente a una dosis única de 7,5 mg/kg o cuando se administra por vía oral. La curcumina demostró la capacidad de atravesar las barreras hematoencefálica y retina sanguínea, que es un requisito para un agente útil de formación de imágenes de la placa. En términos de seguridad, los ensayos de Fase I y II que usan curcumina en pacientes con cáncer han demostrado su baja toxicidad en humanos, incluso en dosis altas (12 g/día), y cuando se administran durante largos períodos de tiempo [35]. Se espera que la conversión de la dosis de curcumina administrada por vía intravenosa u oral, de ratones a humanos (por debajo de 1 g) para la visualización de la placa retiniana, se mantenga dentro de los niveles de seguridad informados. Además, estudios recientes han reportado varios enfoques para aumentar significativamente la estabilidad y biodisponibilidad de la curcumina en humanos [36].

La identificación de las placas de A β en la retina de los pacientes con AD, brinda una nueva oportunidad para desarrollar un método de imagen sensible y de alta resolución, que permitirá su detección *in vivo*. Estos resultados pueden ser consistentes con las disfunciones visuales tempranas encontradas en los pacientes con AD [37,38], y con la evidencia de anomalías retinianas como la pérdida de células en la GCL y la atrofia de la NFL, informadas en pacientes con AD [39-44]. Aunque no está claro si las placas de A β se encuentran en la retina en las etapas tempranas o posteriores de la AD, el descubrimiento actual de las placas de A β en la retina de estos pacientes en diferentes edades, y el hecho de que estas placas sean detectables en una etapa muy temprana presintomática de la enfermedad en ratones con AD-Tg refuerza la posibilidad de que las placas marcadas con curcumina, vistas a través de los ojos, puedan usarse para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Es importante destacar que, en función de su tamaño y distribución únicos dentro de las retinas, las placas observadas en los pacientes con AD pueden finalmente usarse para el diagnóstico diferencial: las placas que se detectaron en la degeneración macular relacionada con la edad se restringen localmente al pigmento retiniano del epitelio dentro de la drusa y parecen más pequeñas en tamaño [45-47]. En cuanto a las anomalías retinianas que se observan en los pacientes con EA, es posible que una terapia reductora de placa, tal como la actual vacunación contra la DC, puede ayudar además a mejorar algunas de las disfunciones visuales, incluso a mejorar la vista.

Junto con el envejecimiento de la población mundial y la creciente epidemia de AD, una detección temprana de AD se torna cada vez más crítica para evaluar el riesgo, evaluar nuevas terapias y tratar la AD con intervención temprana una vez que se ha desarrollado. Se cree que la patología de la AD, que incluye las placas amiloides y ovillos neurofibrilares, aparece muchos años antes de que se manifiesten los síntomas y antes de que ocurra cualquier neurodegeneración sustancial. El descubrimiento de marcadores medibles tempranos específicos a la AD, como las placas de A β en la retina, que pueden predecir el desarrollo de la patología cerebral y el deterioro cognitivo en sujetos aún cognitivamente normales, es especialmente necesario. Los hallazgos de los inventores en modelos de ratones con AD respaldan el uso de imágenes de placas retinianas *in vivo* marcadas con curcumina como una herramienta no invasiva para la indicación temprana de la patología de la AD y la respuesta a una intervención terapéutica.

Además, se describen en la presente terapias de vacunación para reducir y/o eliminar las placas de A β en la retina, a menudo asociadas con la degeneración de los ojos y la vista en pacientes con AD. Se usaron péptidos derivados de la mielina o agonistas débiles de los péptidos derivados de la mielina para inducir eficazmente la neuroprotección y para reducir la formación de placa en la retina.

En resumen, identificamos las placas de A β en retinas humanas y describimos un nuevo enfoque para detectar y monitorear la patología de la placa de Alzheimer antes y más fácilmente que en el cerebro, mediante la formación de imagen de las placas de A β en la retina mediante el uso de un compuesto administrado sistémicamente, demostrando seguridad en los humanos. Esto puede predecir el desarrollo de la patología cerebral y el deterioro cognitivo en sujetos que aún son cognitivamente normales y mucho antes de que se observe un déficit funcional significativo. Estos hallazgos muestran que la imagen óptica de la retina puede usarse como un enfoque no invasivo para monitorear la progresión de la AD y la respuesta a las intervenciones terapéuticas [48].

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitante del alcance de la invención. Hasta el punto que se mencionan los materiales específicos, es sólo para propósitos de ilustración y no se pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1 (para propósitos de información y referencia)

Los resultados de los depósitos de A β en la retina del ratón con AD pueden visualizarse mediante el uso de curcumina

Se utilizaron ratones AD-Tg que portaban los transgenes de APP^{swe} y PS1^{dE9} humanos para evaluar el potencial de desarrollar una herramienta no invasiva para detectar las placas de A β en el ojo. Primero se verificó que la curcumina tenía una afinidad con las mismas placas que fueron detectadas por anticuerpos específicos para A β humano en el hipocampo de ratones AD-Tg (Figura 1a; canales separados Figuras 1b y 1c). A mayor aumento, las imágenes muestran el patrón de tinción específico obtenido después de cada procedimiento (Figuras 1d y 1e). Las placas de A β humanas no se detectaron en los cerebros de ratones de tipo silvestre (wt) de la camada no Tg (Figura 1f). Después se probó si las placas de A β en los ojos de los ratones AD-Tg podían unirse además a la curcumina. El examen a alta resolución reveló la presencia de placas de A β marcadas por curcumina y anticuerpos anti-A β humanos en las retinas de ratones AD-Tg (Figura 1g - 1i, retina de montaje completo; Figura 1k - 1m, sección transversal) pero no en las retinas de ratones no Tg (wt) (Figura 1j y 1n). Las imágenes representativas muestran la ubicación de las placas de A β en las preparaciones completas de retina a varias profundidades (adquisición consecutiva en planos focales de 80 μ m de profundidad) para incluir la capa plexiforme interna (IPL; Figura 1g), la capa nuclear interna (INL)/capa plexiforme externa (OPL; Figura 1h), y capa nuclear externa (ONL; Figura 1i). El análisis de las secciones transversales verificó además el depósito de la placa de A β en las capas retinianas profundas y la coroides, con un predominio aparente en la capa de células ganglionares (GCL) e IPL a través de las capas OPL (Figura 1k - 1m). Mientras que las placas de A β humano estaban ausentes en las camadas no-Tg (wt) (Figura 1j y 1n), se detectaron pequeñas placas de curcumina

positivas ocasionales. Para determinar la naturaleza de estas placas pequeñas y dispersas que se detectaron mediante la tinción con curcumina en ratones silvestres, realizamos un experimento de doble tinción con curcumina y anticuerpos específicos para A β de ratón en las preparaciones completas de retina de ratones silvestres de 10 meses de edad. De hecho, se encontró que las pequeñas placas detectadas por la curcumina en las retinas wt estaban marcadas conjuntamente con los anticuerpos anti-A β de ratón, lo que confirma su identidad como depósitos de A β de ratón formados endógenamente en el ratón (Figuras 8a - 8d).

Ejemplo 2 (para propósitos de información y referencia)

Resultados de las placas de A β que se forman en las retinas de los pacientes con AD y pueden visualizarse con curcumina

A continuación, examinamos la presencia de placas de A β en los ojos de pacientes con diagnóstico definitivo de AD postmortem (n=9; intervalo de edad de 48 a 94 años; diferentes severidades de la enfermedad, categorizadas según sus informes de neuropatología), y en ojos de controles normales postmortem emparejados por edad (n=4; 66 a 92 años; ver registros de donantes oculares humanos en (ver Tabla 1). La autofluorescencia y las señales inespecíficas de los ojos humanos fijados que se observaron con una excitación de 360-710 nm y asociaron con los depósitos de lipofuscina/lípidos y/o fijación a largo plazo con formalina [21, 22] se eliminaron mediante la tinción de negro sudán B (Figura 2). Para la tinción de curcumina, primero sumergimos retinas humanas de montaje completo con negro sudán B (Figura 2a y 2c; no se observaron placas), seguido de exposición a la curcumina (Figura 2b y 2d; las imágenes representativas muestran placas dentro de la misma ubicación del tejido). Se encontraron placas detectadas por curcumina, que varían en tamaño de 1 a 10 μ m (típicamente alrededor de 5 μ m), en todos los ojos de pacientes con AD examinados, a varias profundidades focales correspondientes a las capas retinianas GCL, IPL e INL (Figura 2a y 2g), y con una aparente correlación con la patología de placa informada en el cerebro. Se analizaron además las retinas humanas con anticuerpos dirigidos contra A β humano. Identificamos placas de A β en pacientes con AD y encontramos que su estructura era similar a la encontrada en la retina y el cerebro del ratón [las Figuras 2h y 2i representan las capas retinales más internas (es decir, GCL) donde las placas se detectan fácilmente; la Figura 2i es una imagen de mayor aumento de la estructura de la placa A β retiniana; la figura 2j representa planos focales consecutivos más profundos (es decir, IPL)]. Las placas no pudieron detectarse cuando solo se usaron anticuerpos secundarios (datos no mostrados). La exposición de las retinas humanas a la curcumina después de su inmunomarcaje para A β , confirmó su colocalización (Figura 2k - 2m). En ojos humanos sin AD, no se detectaron placas de A β (Figura 2n).

Tabla 1

| Paciente # | Género ¹ & Edad (años) | Diagnóstico Premortem (Duración de la Enfermedad) | Neuropatología post mortem | Diagnóstico final | Causa de muerte |
|------------|-----------------------------------|---|---|-------------------|---------------------------------------|
| 412 | H, 48 | Demencia, AD (10 años) | NP y NFT de moderados a frecuentes en el neocórtex y el hipocampo | AD definitivo | Atrofia cerebral con hidrocefalia |
| 404 | H, 65 | Demencia, AD (5 años) | Núm. grande de placas difusas, NP, NFT en la corteza entorrinal e hipocampo | AD definitivo | N/A |
| 435 | M, 70 | Demencia, AD (5 años) | Núm. moderado de NP y NFT | AD definitivo | Neumonía de los pulmones posteriores. |
| 539 | M, 78 | Demencia (3 años) | Núm grande de NP con núcleos y NFT abundantes y placas difusas | AD definitivo | Hematoma subdural |
| 484 | M, 86 | Demencia, AD (11 años) | NFT y NP abundantes en el neocórtex e hipocampo | AD definitivo | Infarto de cerebro y cerebelo |
| 664 | M, 87 | Demencia, AD (8 años) | NP moderados a frecuentes con NFT en el neocórtex e hipocampo CA-1 | AD definitivo | Infarto de cerebro |
| 486 | H, 88 | Demencia, AD (6 años) | NP y NFT severos | AD definitivo | Neumonía |

| | | | | | | |
|----|---|-------|---|---|----------------------------|--------------------------------------|
| 5 | 513 | H, 90 | Demencia, AD ² (14 años) | NP leves ⁵ y NFT abundantes ⁴ | AD definitivo ⁶ | Infarto de hemorragia cerebral focal |
| | 525 | H, 94 | Demencia, AD (11 años) | NP abundantes con núcleos maduros y numerosos NFT | AD definitivo | Infarto de cerebro |
| 10 | 93-78 | M, 66 | Ausencia de demencia normal | N/A | Cerebro normal | Insuficiencia hepática |
| | 93-111 | M, 77 | Ausencia de demencia normal | N/A | Cerebro normal | Sepsis |
| 15 | 476 | M, 88 | Ausencia de demencia occipital CVA ⁵ | NP y NFT neocorticales dispersos | Cerebro normal | Infartos cerebrales |
| 20 | 529 | H, 92 | Ausencia de demencia normal | Núm. moderado de placas difusas y núm. pequeño de NP solo en el hipocampo | Cerebro normal | Infarto cerebrales remotos múltiples |
| 25 | <p>¹ Género: F=Hembra, M=Macho ² AD - enfermedad de Alzheimer ³ Placas neuríticas (NP) ⁴y Ovillos Neurofibrilares (NFT) se determinaron mediante tinción de plata (Gallyas o Bielschowsky) y tinción de tioflavina en varios sitios del SNC: Hipocampo CA-1, Corteza Entorinal, Frontal Medio, Sup./Mid. Temporal, Parietal inferior, Visual primario, Área de asociación visual. ⁵ CVA - Accidente vascular cerebral o accidente cerebrovascular. ⁶ AD definitivo - De acuerdo con los criterios de CERAD.</p> | | | | | |

30 Ejemplo 3 (para propósitos de información y referencia)

Los resultados de las placas de Aβ en ratones con AD, teñidas in vivo con curcumina, se detectan en la retina antes que en el cerebro y se acumulan durante la progresión de la enfermedad

35 Para establecer el uso de la curcumina en las placas de imagen en la retina, se probó su biodisponibilidad en el ojo cuando se inyecta sistémicamente. Con esta finalidad, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con la curcumina. Placas marcadas que siguen a la curcumina administrada se pudieron detectar en las retinas y los cerebros de los ratones AD-Tg, pero no en los controles no-Tg (wt) (Figura 3). Estos hallazgos confirmaron que la curcumina atraviesa la barrera hematoencefálica y sugiere que atraviesa también la barrera de la retina en sangre y tiene una alta afinidad por las placas de Aβ *in vivo*. Es importante destacar que las placas marcadas con curcumina podrían detectarse después de una única inyección de curcumina o después de múltiples inyecciones. Las proyecciones representativas del eje z del hipocampo de la retina y el cerebro y las imágenes corticales de ratones con AD-Tg a las edades de 2,5, 5, 9 y 17 meses demostraron una correlación dependiente de la edad entre el depósito de la placa en la retina y el cerebro, y una mayor acumulación en el transcurso de la progresión de la enfermedad (Figura 3a - n). Es importante destacar que las placas se detectaron en la retina (Figura 3a y 3b) pero no en el cerebro (Figura 3c y 3d) tan pronto como a los 2,5 meses de edad en ratones con AD-Tg después de la administración *in vivo* de la curcumina, lo que sugiere que las placas de Aβ en las retinas preceden a la patología cerebral. Confirmamos además que estas placas marcadas con curcumina se colocan *ex vivo* con la tinción del anticuerpo anti-Aβ humano (Figura 3b y 3f). Las placas de Aβ se detectaron por primera vez en el cerebro a la edad de 5 meses (Figura 3g y 3h), en línea con las descripciones previas del inicio de la enfermedad y la progresión en esta cepa de ratones AD-Tg [23]. En los ratones silvestres, las placas de Aβ no se detectaron tanto en la retina (Figura 3o) como en el cerebro (Figura 3p y 3q) hasta los 9 meses de edad.

Ejemplo 4 (para propósitos de información y referencia)

55 Resultados de la carga de la placa de Aβ disminuye en la retina después de la terapia de vacunación

Se investigó además si el destino de las placas retinianas observadas en los ratones AD-Tg es similar al de las placas de Aβ en el cerebro en respuesta al mismo tratamiento. Se ha demostrado que los péptidos derivados de la mielina o los agonistas débiles de los péptidos derivados de la mielina inducen eficazmente la neuroprotección y reducen la formación de placa [24-26]. Para garantizar el efecto beneficioso de la vacunación sin el riesgo de inducir encefalomiелitis autoinmune, elegimos vacunar ratones AD-Tg con un péptido alterado derivado de la mielina (MOG45D, derivado de MOG 35-5527,28) con el uso de células dendríticas (DC) como portador y adyuvante. Las preparaciones completas de retinas de ratones AD-Tg de 10 meses inyectados ya sea con las DC cargadas con MOG45D o con PBS, y las camadas silvestres (4 ratones/8 retinas por grupo), se marcaron *ex vivo* para placas de Aβ, mediante el uso tanto de curcumina como de anticuerpo anti-Aβ (Figura 4). Las imágenes representativas de proyección axial (pila-z) demostraron una reducción sustancial del número de placas de Aβ en ratones AD-Tg vacunados en comparación con

los controles tratados con PBS (Figura 4a - 4c frente la Figura 4d y 4f, respectivamente; canales separados en las Figuras 4b y 4c, y las Figuras 4e y 4f). No se detectaron placas de A β (doble tinción con curcumina y anticuerpo antihumano A β) en los ratones silvestres (Figura 4g). En imágenes de alta resolución, se detectaron placas retinianas pequeñas (en su mayoría <1 μ m de diámetro), que se originaron a partir del gen de APP endógeno de ratón (Figura 8). Estas pequeñas placas se tiñeron con curcumina pero no con anticuerpos anti-A β humanos en los tres grupos experimentales (Figuras 4a, 4d y 4g). Además, se cuantificó el número y el tamaño de la placa capturando 12 áreas (un total de aproximadamente 0,45 mm²) alrededor del disco óptico, y se cuantificaron las placas en una profundidad de barrido de 60 μ m en cada área (Figura 4h; cada área se indica mediante el rectángulo 1-12). Se encontró una disminución significativa en el número de placas detectadas con la tinción con curcumina en las retinas de ratones AD-Tg vacunados en comparación con los controles tratados con PBS (Figura 4i; $P=0,0028$). También se observó una reducción sustancial en el área promedio cubierta por las placas retinianas en ratones AD-Tg vacunados frente a los tratados con PBS (Figura 3j; $P=0,0002$). Notablemente, se observó una reducción significativa, en relación con los ratones tratados con PBS, en el área total de la placa en el hipocampo y la corteza de los cerebros de los mismos ratones vacunados (Figura 4k; $P=0,0085$).

15 Ejemplo 5

Resultados de las imágenes in vivo de las placas de A β en los ojos con el uso de la curcumina inyectada sistémicamente

20 Para investigar más a fondo el potencial de visualización de las placas de A β con la curcumina en los ojos de sujetos vivos, primero se probó nuestra capacidad para identificar las placas de A β en las preparaciones completas de retinas de ratones que no se perfundieron antes de su enucleación ocular, un entorno más fisiológico. Las imágenes representativas de la proyección axial demostraron que incluso bajo esas condiciones, que incluían señales de fondo de los glóbulos rojos en los capilares, las placas podían identificarse en las retinas de los ratones AD-Tg que habían sido previamente inyectados i.v. con la curcumina (Figura 5a). Es importante destacar que, en ausencia de la curcumina, las placas fueron indetectables en los ratones AD-Tg que habían sido inyectados i.v. con PBS (Figura 5b), lo que sugiere que cuando se usan estas modalidades de imagen, las placas son apenas detectables en la retina únicamente mediante sus señales de autofluorescencia. Como se esperaba, en los ratones no-Tg (wt) inyectados con curcumina, tampoco se detectaron placas (Figura 5c). El marcaje adicional de las placas con anticuerpos anti-A β humanos *ex vivo*, confirmó la especificidad de A β de la tinción con curcumina (datos no mostrados). Se encontraron las placas de A β en las preparaciones completas de retinas de ratones AD-Tg marcadas con anticuerpos anti-A β dentro de los vasos sanguíneos, así como en sus cercanías parenquimales (Figura 5d; corte transversal confocal virtual). Se evaluó además si sería posible detectar placas de A β al tiempo de reducir la señal de fondo que emerge de los vasos sanguíneos. Con esta finalidad, se monitoreó la firma óptica específica con el uso de un microscopio de fluorescencia (Nikon TE2000) que incluye una tecnología de imágenes multispectrales, compuesta por las imágenes espectrales con filtros sintonizables acústico-ópticos (AOTF) [29] e imágenes de tiempo de vida fluorescente con el uso de una cámara cerrada; la adquisición de la imagen se siguió por una segmentación y clasificación de la imagen después del análisis mediante el uso de un programa que se desarrolló previamente [30]. Se observaron las placas marcadas con curcumina obtenidas mediante un microscopio equipado con AOTF en un solo canal de longitud de onda en la retina del ratón AD-Tg (Figura 5e). Al aplicar la imagen basada en AOTF, capturar la firma espectral de las placas marcadas con curcumina y la traducción posterior a imágenes digitales clasificadas por color, se pudo identificar la firma óptica específica de las placas de A β como señales "verdaderas", mientras que eliminamos el ruido de la autofluorescencia generado por los vasos sanguíneos (Figura 5f). Para investigar la factibilidad de nuestro enfoque para la detección de la placa no invasiva, se realizó una imagen *in vivo* de la retina en ratones vivos mediante el uso de un estereomicroscopio modificado (Leica S6E) con una fuente de luz controlada por longitud de onda y una cámara digital. Después de una inyección única de curcumina (7,5 mg/kg) dos horas antes de la obtención de imágenes, las placas marcadas con curcumina estaban visibles en la retina de ratones AD-Tg específicamente a una longitud de onda de excitación de 546/15 nm (Figura 5g - 5j). Se detectaron las placas en su mayoría en las áreas cercanas al disco óptico. El tamaño promedio de la placa fue compatible con el observado en la preparación completa de la retina (*ex vivo*). No se detectaron placas en los ratones no-Tg (wt) inyectados i.v. con curcumina (Figura 5k) o en ratones AD-Tg que no recibieron inyección de curcumina (datos no mostrados). Para verificar que las señales capturadas por el estereomicroscopio modificado se originaron a partir de las placas, los ratones se sometieron a eutanasia y se confirmó la presencia de las placas marcadas con curcumina en las preparaciones completas de la retina (datos no mostrados).

55 Ejemplo 6 (para propósitos de información y referencia)

Ratones

60 Ratones doble transgénicos (hembras y machos en igual número) que albergan los genes de la APP quimérica de ratón/humano (APP^{Swe}) y la presenilina 1 humana mutante (supresión en el exón 9 - PSEN1 Δ E9) y sus camadas no-Tg apareadas por edad se adquirieron en los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, cepa # 4462) y se criaron y mantuvieron en el centro animal de medicina comparativa del Centro Médico Cedars-Sinai (Los Angeles, CA). Todos los experimentos se aprobaron y realizaron de acuerdo con los reglamentos diseñados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Cedars-Sinai.

Ejemplo 7 (para propósitos de información y referencia)

Genotipado

5 El ADN genómico se extrajo a partir de 0,5 cm de la punta de la cola con el uso de un estuche de extracción de ADN (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Los ratones utilizados en este estudio se genotiparon para la presencia de los transgenes por PCR como se describió anteriormente (Jankowsky, 2004, Ref. #120).

Ejemplo 8 (para propósitos de información y referencia)

10

Preparaciones de vacunación

15 El péptido derivado de la mielina modificado (MOG45D) se deriva del péptido encefalitogénico MOG₍₃₅₋₅₅₎ (Koehler, 2002, Ref. #285; Shao, 2002, Ref. #283; Zhong, 2002, Ref. #284; Hauben, 2001, Ref. #28; y Hauben, 2001, Ref. #35). Para las vacunaciones, se agregó MOG45D (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones donadores de la camada no-Tg. La preparación de las células dendríticas para la vacunación fue como se describió anteriormente (Hauben, 2003, Ref. #34).

Ejemplo 9 (para propósitos de información y referencia)

20

Régimen Experimental de Vacunaciones

25 Ratones AD-Tg a la edad de 7 meses se inyectaron con DC-MOG45 (0,5x10⁶ células/200 ml en PBS1x por animal) una vez al mes durante tres meses. Los grupos de control de ratones AD-Tg de 7 meses de edad se inyectaron con PBS 1 x de acuerdo con los regímenes correspondientes. Al final del estudio, todos los ratones se perfundieron bajo anestesia con PBS 1 x después del paraformaldehído al 2,5% ("PFA") (Sigma) y se recogieron sus cerebros y ojos para un análisis adicional.

Ejemplo 10 (para propósitos de información y referencia)

30

Tejido animal

35 Los ratones se anestesiaron y se perfundieron con PFA tamponado al 4% enfriado con hielo, y un grupo de ratones no se perfundió. Sus ojos se enuclearon y se fijaron inmediatamente con PFA fresco al 4% durante la noche. Para las preparaciones completas de retinas, se diseccionaron los ojos y se extrajo la parte anterior. Los oculares se empaparon durante 10 minutos en hialuronidasa (tipo I-S) (0,07 mg/ml) (Sigma) para licuar y eliminar los residuos vítreos, después se lavaron durante 10 minutos x 3 en PBS, y se recogieron todas las preparaciones completas de las retinas. Para seccionar todo el ojo, los ojos se pusieron en sacarosa al 30% en PFA al 4% durante 2 horas, después se lavaron durante 15 minutos x3 en PBS. Los ojos se embebieron en O.C.T y se congelaron lentamente en hielo seco, después se seccionaron en el plano sagital (7 µm) con el criostato. Se recolectaron los cerebros y se fijaron inmediatamente en PFA fresco al 4% durante la noche. Los cerebros se colocaron en un gradiente de sacarosa al 30% (en PFA al 4%). Se lavaron los cerebros durante 15 minutos x3 en PBS, después se embebieron en O.C.T y se congelaron lentamente en hielo seco, después se seccionaron en el plano coronario (30 µm) con el criostato.

45 Ejemplo 11 (para propósitos de información y referencia)

Autopsia de ojos humanos

50 La autopsia de los ojos de pacientes con Alzheimer se obtuvo del Centro de Investigación de la Enfermedad de Alzheimer, Departamento de Patología, Universidad del Sur de California (Los Ángeles, CA), bajo los protocolos 99491 y 3201 de IRB. Se adquirieron los ojos de donantes sanos del Intercambio Nacional de Investigación de Enfermedades (NDRI, Filadelfia, PA). El NDRI tiene un protocolo de recolección de tejido humano aprobado por un comité de gestión y sujeto a la supervisión de los Institutos Nacionales de la Salud. Se fijaron y almacenaron los ojos enfermos y normales en formalina tamponada neutra al 10%. Además, se utilizaron dos ojos sanos que se congelaron sin fijación y se almacenaron a -80°C. Se prepararon las preparaciones completas de la retina a partir de los ojos y se estudiaron posteriormente mediante inmunohistoquímica.

Ejemplo 12

60

Inyección de la curcumina en la vena de la cola

65 Para obtener imágenes *in vivo* de la placa de Aβ, se inyectaron por vía intravenosa ratones AD-Tg y tipo silvestre no-Tg en la vena de la cola con curcumina en PBS (7,5 mg/kg/día, durante 7 días consecutivos) o con PBS. Posteriormente, los cerebros y los ojos se sometieron a criosección o se prepararon para la preparación completa de la retina. En una modalidad alternativa, la curcumina puede administrarse al paciente por vía oral.

Ejemplo 13

Inmunohistoquímica

5 Las criosecciones cerebrales (30 μm de espesor), secciones transversales de retina (criosecciones) (7 μm de espesor) y preparaciones completas de la retina se trataron con una solución de permeabilización/bloqueo que contiene 20% de suero de caballo (Invitrogen) y Triton X-100 al 0,01-0,1% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO). Las secciones se tiñeron durante la noche a 4°C con una combinación específica de los siguientes Ac primarios en PBS que contenían solución de bloqueo al 10%: anti-A β de ratón [residuos de aminoácidos humanos 1-17; clón 6E10 (1: 100; Milipore, Temecula, CA)]. Las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los Ac secundarios, después se lavaron tres veces con PBS 1 x y se montaron con el uso de un Vectorshield que contenía o no diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol, (DAPI, Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido). La solución de los Ac secundarios en PBS 1 x contenía anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con Cy-5 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se procesó un control negativo con el mismo protocolo con la omisión del anticuerpo primario para evaluar el marcaje no específico. Para el análisis microscópico se utilizó un microscopio fluorescente Zeiss ApoTome.

Ejemplo 14

Tinción con la curcumina

20 La solución de curcumina a 0,1 mg/ml se preparó disolviendo la curcumina (Sigma-Aldrich) en NaOH 0,5 M, pH = 7,9, después de la dilución inmediata en PBS 1 x. Las criosecciones de tejido de cerebro y retina (30 μm y 7 μm de espesor respectivamente) y las preparaciones completas de la retina se tiñeron con la solución de curcumina durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se enjuagaron tres veces con PBS 1 x durante 15 minutos cada uno. Las muestras se cubrieron con el medio de montaje GVA (Zymed).

30 Se conocen compuestos adicionales en la técnica que pueden teñir/marcar las placas de amiloide in vivo, incluidas la tioflavina S y T y algunos derivados, rojo Congo y derivados, metoxi-X04, Compuesto B de Pittsburgh (PiB), DDNP, crisamina-G y varios más. Sin embargo, la curcumina y sus derivados son muy atractivos para las imágenes ópticas in vivo de las placas de amiloide en los modelos animales y humanos, debido a la siguiente ventaja. La curcumina genera señales específicas y muy brillantes en el espectro óptico de uso común, y está disponible comercialmente, con un costo excepcionalmente bajo. Los problemas de seguridad relacionados con la curcumina son mínimos (incluso en dosis altas) y pueden considerarse beneficiosos para la salud del paciente como antioxidante. La curcumina es un ligando eficaz con muy buenas características de unión in vitro e in vivo al A β , y ofrece una buena tasa de captación y lavado inicial del cerebro (propiedades importantes para los agentes de formación de imágenes in vivo).

Ejemplo 15

Cuantificación

40 Se obtuvieron micrografías de tejidos teñidos en un microscopio equipado con ApoTome Axio Imager Z1 (con unidad Z motorizada) con la cámara monocromática AxioCam MRm versión. 3.0 (a una resolución de 1388 x 1040 píxeles, tamaño de píxel de 6,45 μm x 6,45 μm , rango dinámico de > 1:2200, que suministra imágenes de bajo ruido debido al sensor de enfriamiento por Peltier). El análisis cuantitativo del número de placas A β y el área (βm^2) se realizó a partir de dos preparaciones completas de retinas por ratón (n=4 ratones por grupo). Cada imagen, capturada con un objetivo de 40x y una resolución de 0,28 μm , incluía un área de 0,04 mm² y un total de 12 áreas rectangulares alrededor del disco óptico dentro de una profundidad de escaneo de 60 μm (múltiples imágenes de secciones virtuales en planos focales consecutivos con el uso de una etapa de escaneo motorizado). Se completaron mediciones del radio de la placa promedio (después de la tinción con la curcumina) para cada grupo de animales, seguido de un cálculo del área de la placa promedio en cada grupo de animales. Para la adquisición, se utilizaron tiempos de exposición similares (aproximadamente 75 ms) y los mismos valores de ganancia (0) para todas las imágenes. No se realizó postprocesamiento de las imágenes. Las señales de emisión de las placas de A β teñidas con curcumina se compararon con las señales de fondo en el tejido retiniano, para determinar la relación entre señal y fondo. La relación del ruido de señal-fondo calculada para las imágenes fue alta y dentro del intervalo de 3:1 a 10:1. El análisis cuantitativo del número de placa A β y el área (βm^2) en el cerebro se determinó a partir de tres secciones coronales (dos hemisferios cada una) por ratón con intervalos de 450 μm , en un área que cubre las regiones de hipocampo y cortical. Se importaron secciones ópticas de cada campo de la muestra al programa NIH Image J (Institutos Nacionales de la Salud). La conversión a escala de grises se realizó para distinguir entre las áreas de inmunoreactividad y las referencias. El área total y los niveles cuantitativos de inmunoreactividad se determinaron mediante el uso de una técnica de umbral basada en histogramas personalizada y estandarizada, y después se sometieron al análisis de las partículas.

Ejemplo 16

65 Imágenes espectrales y multiespectrales.

Las imágenes espectrales proporcionan imágenes digitales de un objeto en un gran número secuencial de longitudes de onda que generan firmas ópticas precisas en cada píxel. Nuestro sistema de imágenes espectrales capturó la firma espectral de fluorescencia de las placas de A β , marcadas *in vivo* con curcumina, mediante el uso del siguiente equipo: Los microscopios de fluorescencia Nikon (E800 y TE2000), lámparas de arco de mercurio y xenón, una cámara CCD, un sistema de adquisición de imágenes espectrales basado en AOTF (filtros de ajuste acústico-óptico) (ChromoDynamics, Inc) [29] y el programa de análisis de imagen desarrollado por nuestro Instituto de Tecnologías Quirúrgicas Mínimamente Invasivas [30]. Las imágenes finales proporcionaron una representación visual en pseudocolor de la firma espectral extraída de las imágenes sin procesar, que representan el tamaño y la ubicación de los objetos analizados. En las imágenes multispectrales, la imagen de tiempo de vida fluorescente, realizada con un láser pulsado y una cámara cerrada LaVision PicoStar HR, complementaba la adquisición espectral.

La Figura 6 representa un diagrama de flujo de un sistema de imágenes espectrales 100 para diagnosticar, pronosticar y analizar las placas de A β *in vivo* de acuerdo con una modalidad de la presente invención. La materia retina 110 se tiñe con un marcador fluorescente para marcar las placas de A β . Poco después, la retina teñida 110 recibe imágenes de un dispositivo de imágenes 120 que se ajusta para visualizar las señales de fluorescencia y dispersión a resoluciones más altas. El dispositivo de imágenes 120 puede equiparse con una fuente de luz espectral variable Policromática V 130. En modalidades adicionales, el sistema de imágenes espectrales 100 puede incorporar una cámara digital de color 140 (por ejemplo, MicroFire) y uno o más lentes de aumento para mejorar la ampliación y el detalle de la imagen. La adquisición de imágenes 170 se logra mediante la segmentación y clasificación de imágenes posteriores al análisis mediante el uso del programa de imágenes 160.

La Figura 7 representa un diagrama de flujo de un sistema de imágenes espectrales 200 para diagnosticar, pronosticar y analizar placas de A β de acuerdo con una modalidad de la presente invención. La materia retina 210 se tiñe con un marcador fluorescente para marcar las placas de A β . Poco después, se toma una imagen de la retina teñida 210 mediante el uso de un dispositivo de imágenes 220. El dispositivo de imágenes 220 puede equiparse con tecnología de imágenes multispectrales, que comprende imágenes espectrales con filtros ajustables acústico-ópticos (AOTF) 230 e imágenes de tiempo de vida fluorescente mediante el uso de una cámara digital 240. La adquisición de imágenes 260 se logra mediante la segmentación y clasificación de imágenes posteriores al análisis mediante el uso del programa de imágenes 250.

Ejemplo 17

Imágenes *in vivo* de la retina del ratón.

Se tomaron imágenes de las retinas de ratones AD-Tg y silvestres dos horas después de la inyección intravenosa de la curcumina. Los ratones se anestesiaron con ketamina 100mg/ml/kg y Xilazina 20mg/ml/kg. Las pupilas de ratón se dilataron hasta aproximadamente 2 mm de diámetro con una solución oftálmica de clorhidrato de fenilefrina al 0,5% (Bausch & Lomb) combinada con una solución oftálmica de tropicamida al 0,5% (Mydral; Bausch & Lomb). Durante el proceso de obtención de imágenes, los ratones se colocaron en una fase del estereomicroscopio y el ojo se cubrió con una gota de PBS suplementado con calcio y magnesio, que sirvió como medio de acoplamiento óptico entre la superficie del ojo y la lente de obtención de imágenes. Se usó un estereomicroscopio modificado (Leica S6E) que se ajustó para visualizar las señales de fluorescencia y dispersión a una resolución más alta para capturar imágenes (tiempo de exposición 750 ms con ganancia 4). El estereomicroscopio modificado se montó para incluir una fuente de luz de longitud de onda variable Policromática V (Till Photonics), una cámara digital en color MicroFire (Optronics) y una lente de aumento adicional 6x (doble convexa), con una longitud focal de 10 cm. Las imágenes se capturaron repetidamente en varios ángulos diferentes, para visualizar un campo más grande y eliminar las señales de reflexión no específicas.

Ejemplo 18

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante una prueba t de Student no pareada para los valores de p de la comparación de dos grupos. Los resultados se expresan como la media \pm SD.

Se entenderá por aquellos dentro del estado de la técnica que, en general, los términos usados en la presente descripción deben entenderse generalmente como términos "abiertos" (*por ejemplo*, el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye, pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", etc.).

Referencias

1. Sisodia, S.S. & Price, D.L. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* 9, 366-370 (1995).
2. Hardy, J. & Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356 (2002).
3. McGeer, P.L. & McGeer, E.G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 8, 529-538 (2002).

4. Klunk, W.E. y otros, Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55, 306-319 (2004).
5. Ng, S. y otros, Visual assessment versus quantitative assessment of 11C-PIB PET and 18F-FDG PET for detection of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 48, 547-552 (2007).
- 5 6. Wang, Y. y otros, Development of a PET/SPECT agent for amyloid imaging in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 24, 55-62 (2004).
7. Nordberg, A. Amyloid plaque imaging in vivo: current achievement and future prospects. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1, S46-50 (2008).
8. Hintersteiner, M. y otros, In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat Biotechnol* 23, 577-583 (2005).
- 10 9. Nakada, T., Matsuzawa, H., Igarashi, H., Fujii, Y. & Kwee, I.L. In vivo visualization of senile-plaque-like pathology in Alzheimer's disease patients by MR microscopy on a 7T system. *J Neuroimaging* 18, 125-129 (2008).
10. Toyama, H. y otros, PET imaging of brain with the beta-amyloid probe, [11C] 6-OHBT-1, in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32, 593-600 (2005).
- 15 11. Klunk, W.E. y otros, Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci* 25, 10598-10606 (2005).
12. Lockhart, A. y otros, PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (A β) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain* 130, 2607-2615 (2007).
13. Meyer-Luehmann, M. y otros, Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720-724 (2008).
- 20 14. Morin, P.J. y otros, Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *J Neurochem* 61, 464-473 (1993).
15. Greeve, I. y otros, Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci* 24, 3899-3906 (2004).
- 25 16. Ning, A., Cui, J.Z., To, E., Hsiao Ashe, K. & Matsubara, J.A. Amyloid Beta Deposits Lead to Retinal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2008).
17. Koronyo-Hamaoui, M. y otros, Dendritic-cell based vaccination with a weak agonist of myelin-derived peptide attenuates Alzheimer's-like pathology in APP/PS1 transgenic mice. *Sfn abstract* 740.1/Q1 (2008).
18. Hauben, E. y otros, Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury. *J Neurosci* 23, 8808- 8819 (2003).
- 30 19. Yang, F. y otros, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280, 5892-5901 (2005).
20. Garcia-Alloza, M., Borrelli, L.A., Rozkalne, A., Hyman, B.T. & Bacskai, B.J. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 102, 1095- 1104 (2007).
- 35 21. Schnell, S.A., Staines, W.A. & Wessendorf, M.W. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* 47, 719-730 (1999).
22. Baschong, W., Suetterlin, R. & Laeng, R.H. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *chem Cytochem* 49, 1565-1572 (2001).
- 40 23. Garcia-Alloza, M. y otros, Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 24, 516-524 (2006).
24. Frenkel, D., Maron, R., Burt, D.S. & Weiner, H.L. Nasal vaccination with a proteasome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115, 2423-2433 (2005).
- 45 25. Butovsky, O. y otros, Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11784-11789 (2006).
26. Butovsky, O., Kunis, G., Koronyo-Hamaoui, M. & Schwartz, M. Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci* 26, 413-416 (2007).
27. Ford, M.L. & Evavold, B.D. An MHC anchor-substituted analog of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induces IFN-gamma and autoantibodies in the absence of experimental autoimmune encephalomyelitis and optic neuritis. *Eur J Immunol* 34, 388-397 (2004).
- 50 28. Ziv, Y., Avidan, H., Pluchino, S., Martino, G. & Schwartz, M. Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13174-13179 (2006).
29. Wachman, E.S., Niu, W. & Farkas, D.L. AOTF microscope for imaging with increased speed and spectral versatility. *Biophys J* 73, 1215-1222 (1997).
- 55 30. Burton, K., Jeong, J., Wachsmann-Hogiu, S. and Farkas, D. L. Spectral optical imaging in biology and medicine in *Biomedical Optical Imaging*, Edn. In press. (Oxford University Press 2008).
31. Goldstein, L.E. y otros, Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet* 361, 1258-1265 (2003).
- 60 32. Carroll, J., Choi, S.S. & Williams, D.R. In vivo imaging of the photoreceptor mosaic of a rod monochromat. *Vision Res* 48, 2564-2568 (2008).
33. Murata, H. y otros, Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss in vivo by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 5546-5552 (2008).
34. Leung, C.K. y otros, Longitudinal profile of retinal ganglion cell damage after optic nerve crush with blue-light confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4898-4902 (2008).
- 65

35. Dhillon, N. y otros, Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14, 4491-4499 (2008).
36. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. & Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4, 807-818 (2007).
- 5 37. Sadun, A.A., Borchert, M., DeVita, E., Hinton, D.R. & Bassi, C.J. Assessment of visual impairment in patients with Alzheimer's disease. *Am J Ophthalmol* 104, 113- 120 (1987).
38. Katz, B. & Rimmer, S. Ophthalmologic manifestations of Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol* 34, 31-43 (1989).
39. Hinton, D.R., Sadun, A.A., Blanks, J.C. & Miller, C.A. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 315, 485-487 (1986).
- 10 40. Blanks, J.C., Torigoe, Y., Hinton, D.R. & Blanks, R.H. Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging* 17, 377-384 (1996).
41. Trick, G.L., Barris, M.C. & Bickler-Bluth, M. Abnormal pattern electroretinograms in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 26, 226-231 (1989).
42. Katz, B., Rimmer, S., Iragui, V. & Katzman, R. Abnormal pattern electroretinogram in Alzheimer's disease: evidence for retinal ganglion cell degeneration? *Ann Neurol* 26, 221-225 (1989).
- 15 43. Parisi, V. y otros, Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients. *Clin Neurophysiol* 112, 1860-1867 (2001).
44. Berisha, F., Fekete, G.T., Trempe, C.L., McMeel, J.W. & Schepens, C.L. Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2285-2289 (2007).
- 20 45. Anderson, D.H. y otros, Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 78, 243-256 (2004).
46. Dentchev, T., Milam, A.H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. & Dunaief, J.L. Amyloidbeta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. *Mol Vis* 9, 184-190 (2003).
47. Ding, J.D. y otros, Targeting age-related macular degeneration with Alzheimer's disease based immunotherapies: anti-amyloid-beta antibody attenuates pathologies in an agerelated macular degeneration mouse model. *Vision Res* 48, 339-345 (2008).
- 25 48. Koronyo, Y., Koronyo-Hamaoui, M., Black, K.L., Schwartz, M. & Farkas, D.L., Optical method for the detection of Alzheimer's Disease. Patent application submitted to the USPTO (2008)
49. Jankowsky, J.L. y otros, APP processing and amyloid deposition in mice haploinsufficient for presenilin 1. *Neurobiol Aging* 25, 885-892 (2004).
- 30 50. McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, y otros, (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1077-1087.
51. Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, & Tanihara H (2005) *Jpn J Ophthalmol* 49, 106-108.
52. Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, y otros, (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13444-13449.
- 35 53. Dentchev T, Milam AH, Lee VM, Trojanowski JQ, & Dunaief JL (2003) *Mol Vis* 9, 184-190.

Reivindicaciones

1. La curcumina para su uso en un método para diagnosticar o pronosticar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, dicho método que comprende:
 5 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 examinar las imágenes para los péptidos A β teñidos; y ya sea
 (i) diagnosticar que el mamífero tiene la enfermedad de Alzheimer si están presentes los péptidos A β teñidos; o
 10 (ii) cuantificar el aumento/disminución de péptidos de A β teñidos en la retina del sujeto, en comparación con un diagnóstico previo; y
 generar un pronóstico basado en el nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del sujeto.
2. La curcumina para su uso en un método para evaluar la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero que comprende:
 15 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos; y
 evaluar la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer basado en el nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del mamífero.
3. La curcumina para su uso en un método para evaluar la efectividad del tratamiento para una dolencia retiniana asociada al péptido A β en un mamífero, dicho método que comprende:
 20 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes;
 25 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos; y
 evaluar la efectividad del tratamiento para el péptido de asociado a la dolencia de la retina en función del nivel de péptidos de A β teñidos en la retina del mamífero.
4. La curcumina para su uso en un método para identificar los péptidos de A β en la retina de un mamífero, dicho método que comprende:
 30 administrar sistémicamente curcumina al mamífero;
 formar imágenes de la retina del mamífero con un sistema óptico de imágenes; y
 examinar las imágenes para péptidos de A β teñidos.
- 35 5. La curcumina para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además:
 proporcionar una representación visual de las imágenes en pseudocolor, extraer una firma espectral de imágenes sin procesar, que representa el tamaño y la ubicación de las placas de A β en la retina del mamífero.
- 40 6. La curcumina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los péptidos de A β están en forma de placas de A β .
7. La curcumina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la imagen óptica se realiza *in vivo*.
- 45 8. La curcumina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sistema de imagen óptico se selecciona del grupo que consiste en un espectrómetro, un microscopio de fluorescencia, un estereomicroscopio, una lámpara de arco de mercurio, una fuente de luz de longitud de onda variable, una lámpara de arco de xenón, una cámara cerrada CCD, una cámara digital en color, un sistema de adquisición de imágenes espectrales basadas en filtros ajustables acústicos ópticos, ópticas adaptativas, programa de imágenes y combinaciones de estos.
- 50 9. La curcumina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad de curcumina administrada es inferior a 12,0 gramos y mayor de 7,5 mg.
- 55 10. La curcumina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la curcumina se administra sistémicamente por inyección sistémica.
- 60 11. La curcumina para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la curcumina se administra sistémicamente por inyección intravenosa sistémica.
- 65 12. La curcumina para su su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la dolencia retiniana se selecciona de un grupo que consiste en pérdida de visión, cataratas, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, afecciones neurodegenerativas en las que se acumulan las placas amiloides en la retina y combinaciones de estas.

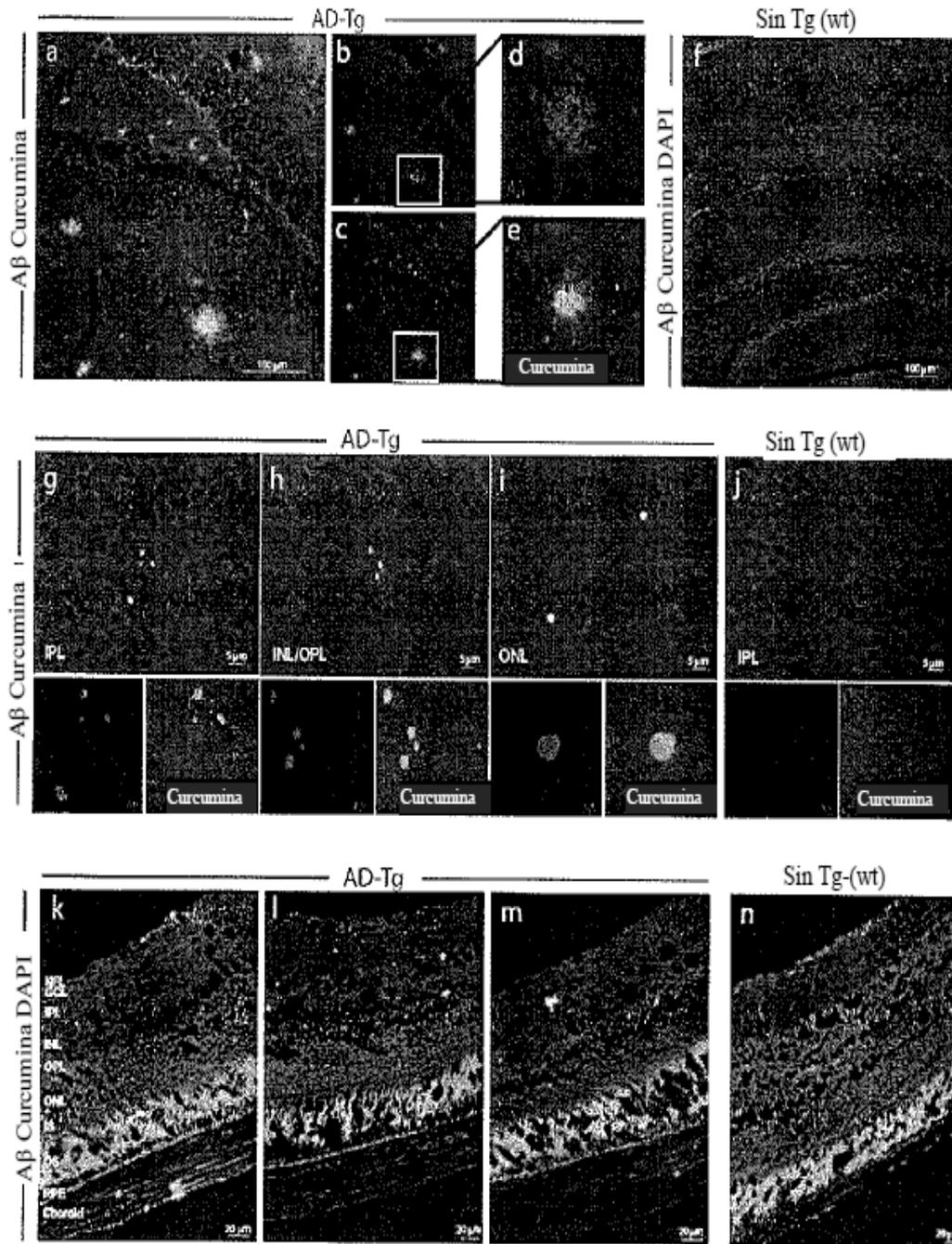


Figura 1

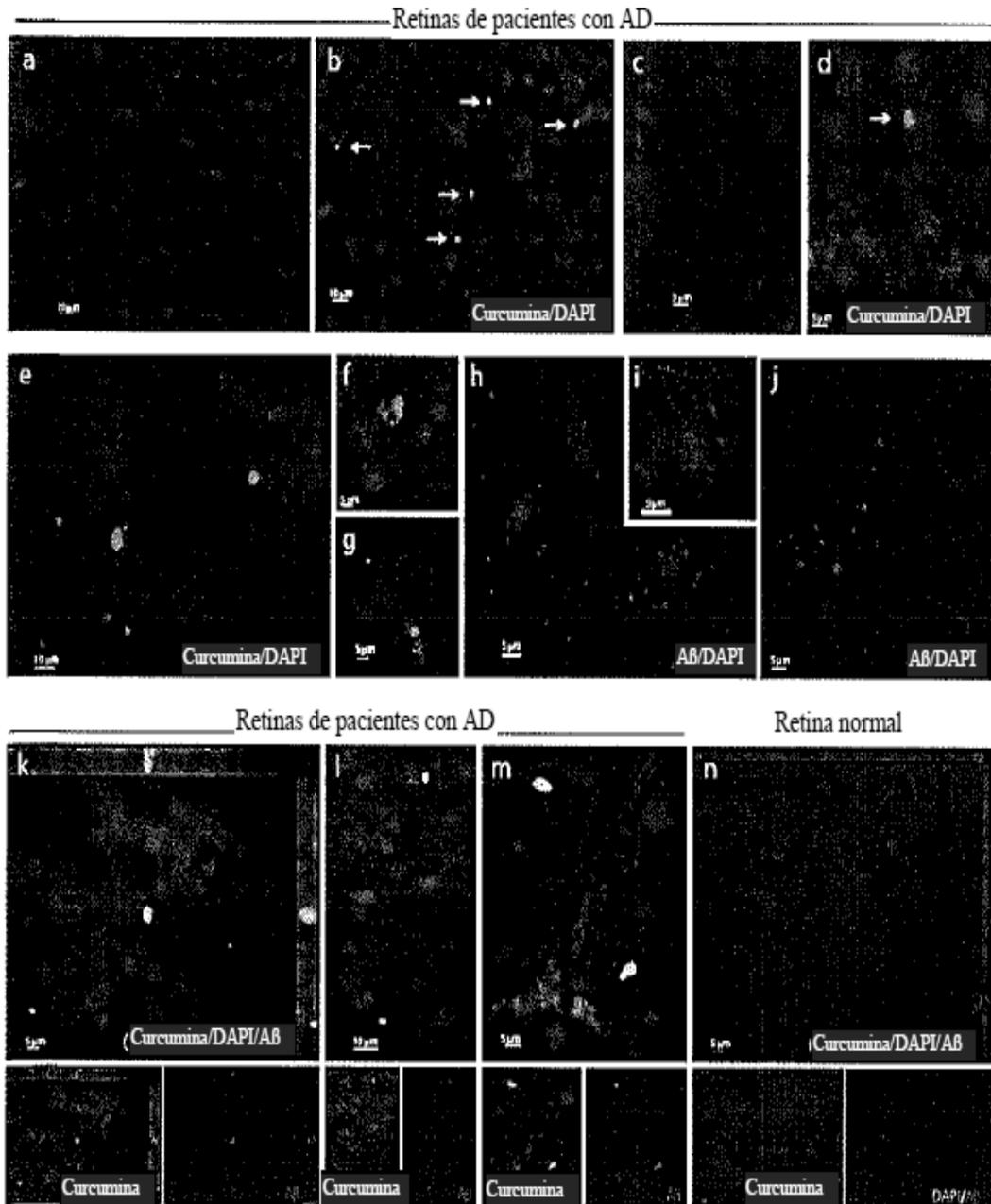


Figura 2

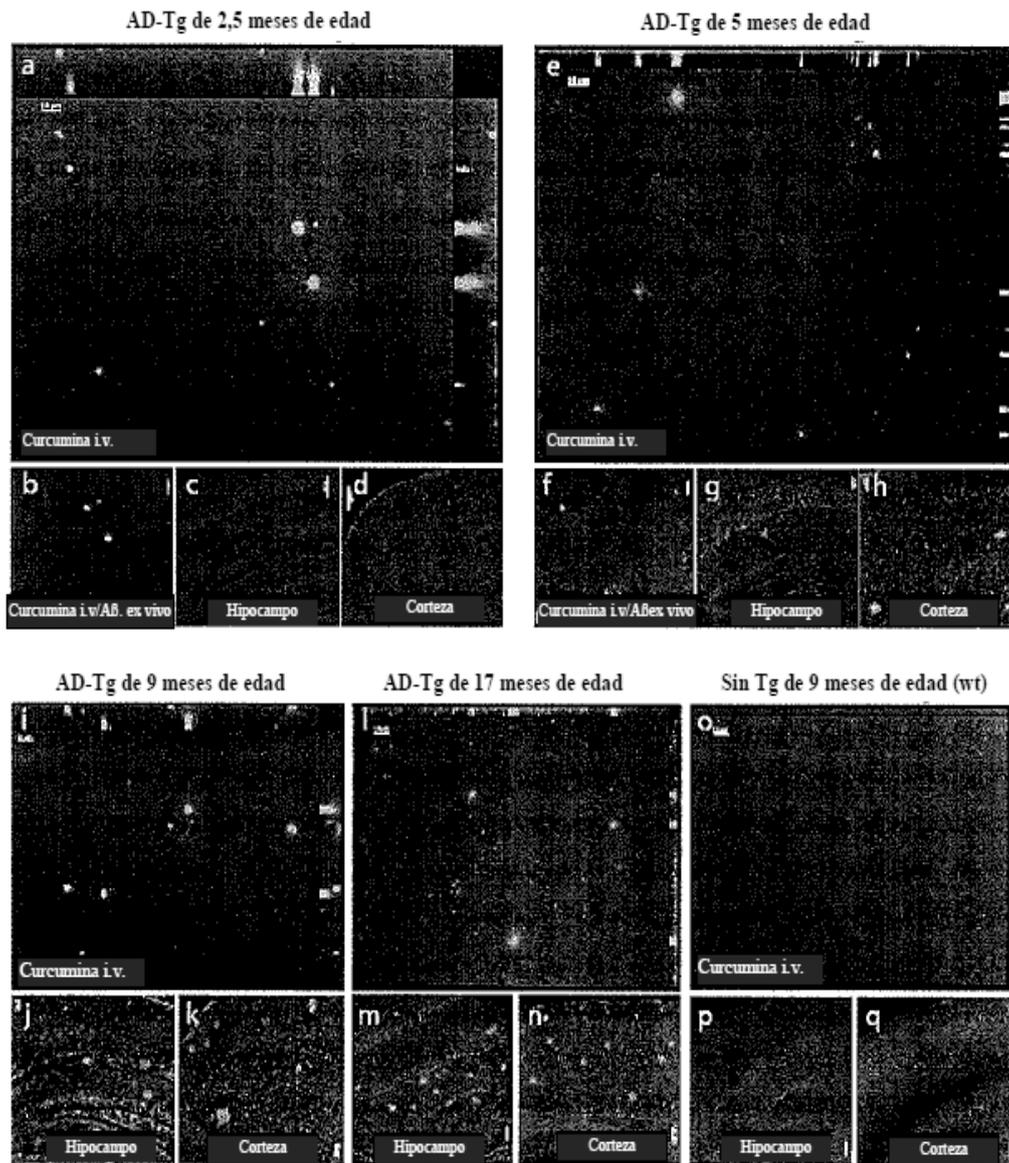


Figura 3

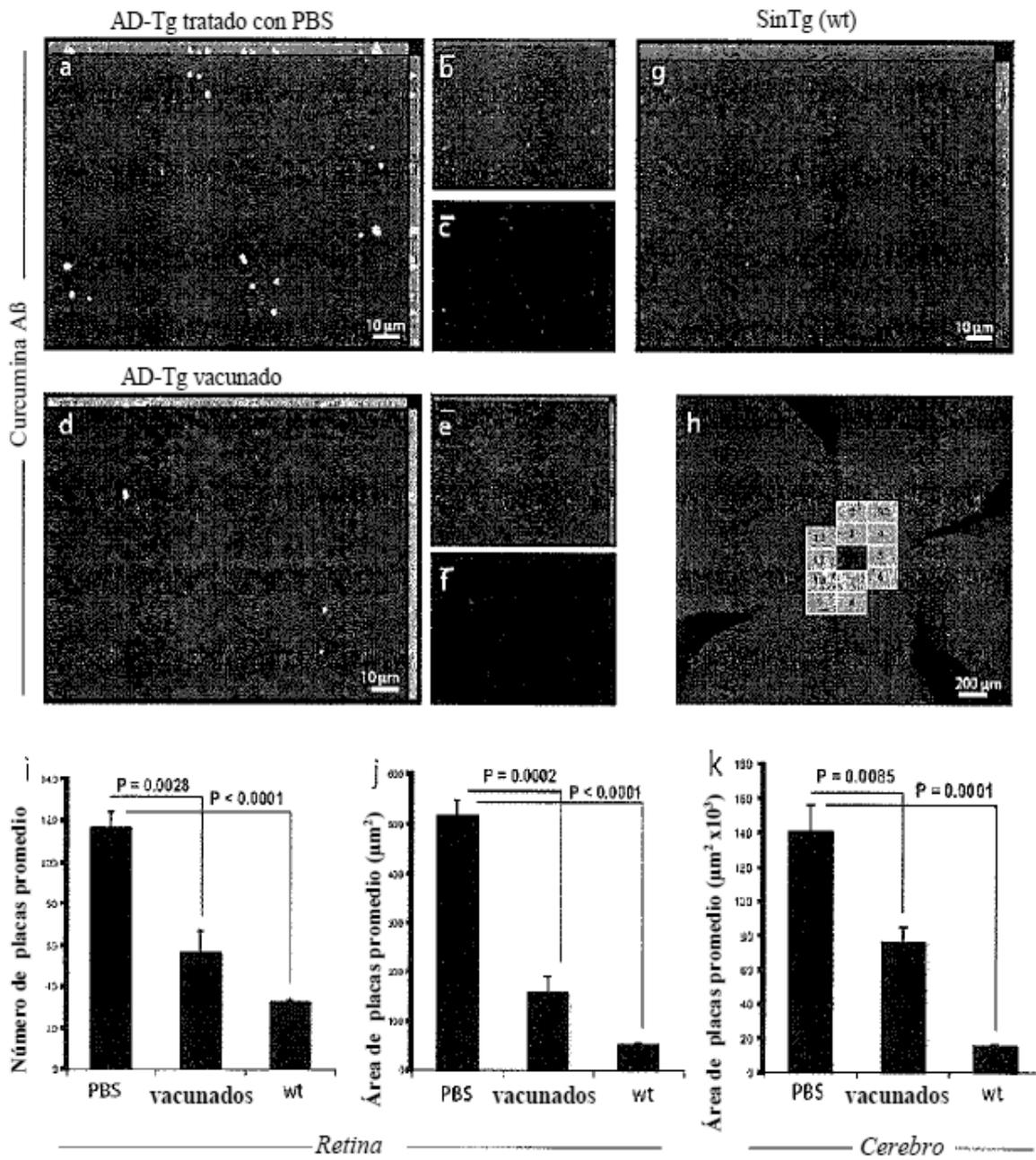


Figura 4

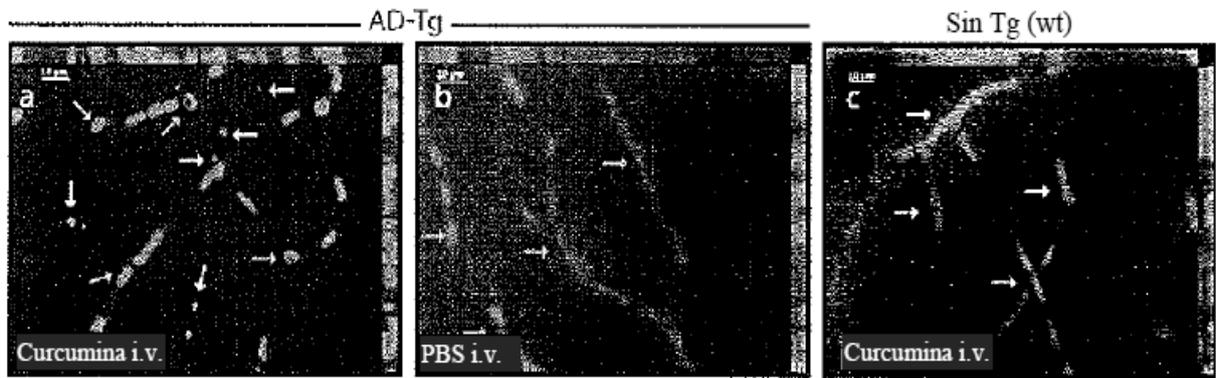


Figura 5a

Figura 5b

Figura 5c

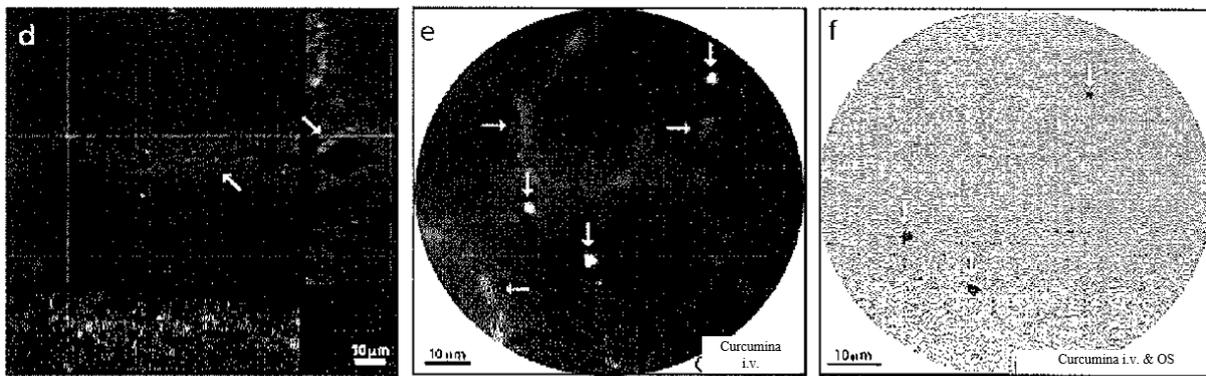


Figura 5d

Figura 5e

Figura 5f

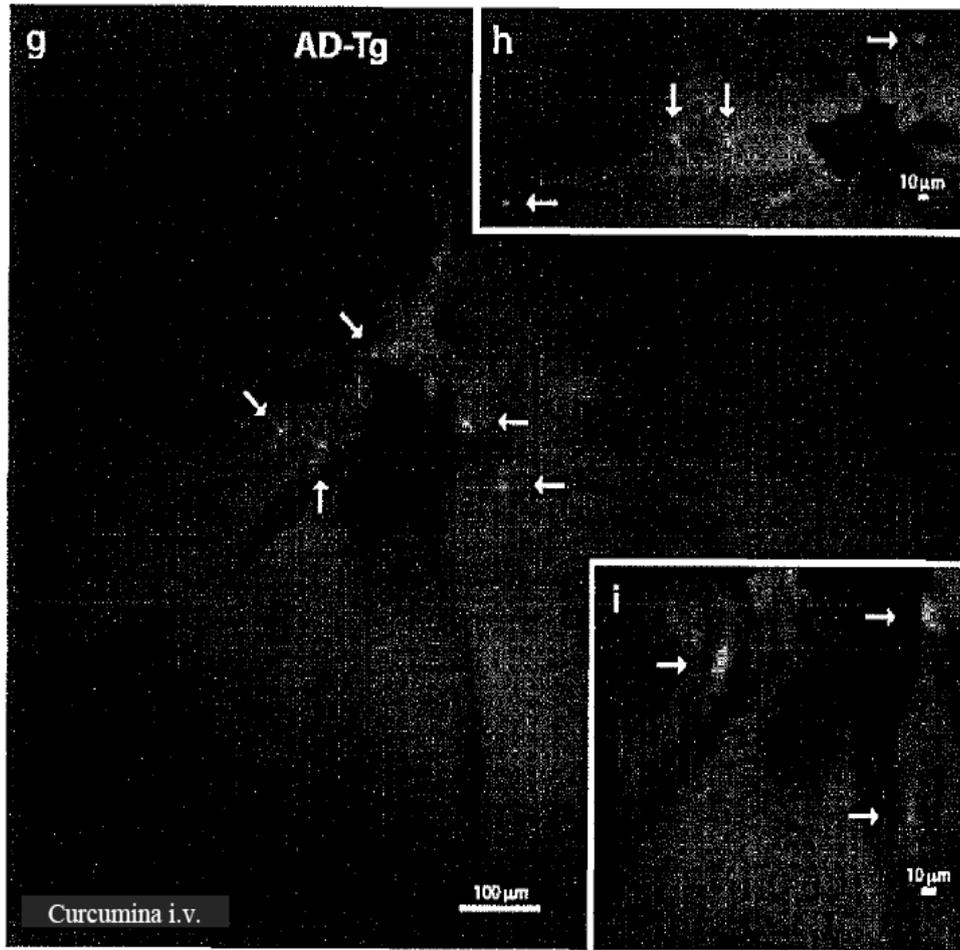


Figura 5g, 5h y 5i

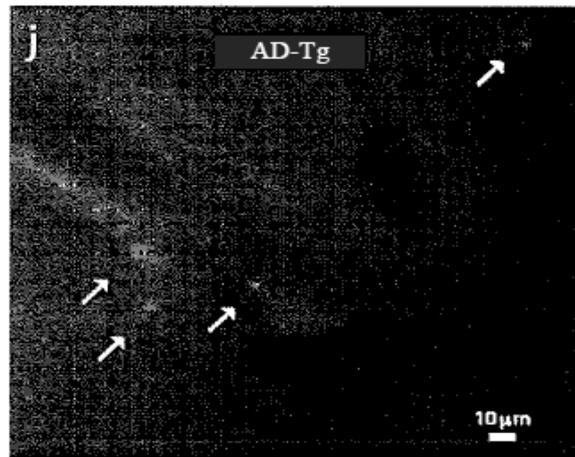


Figura 5j

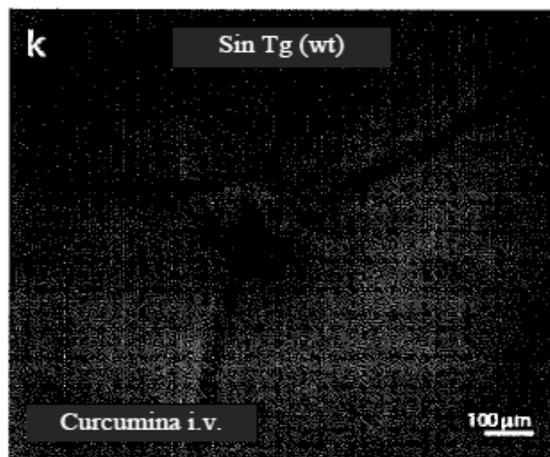


Figura 5k

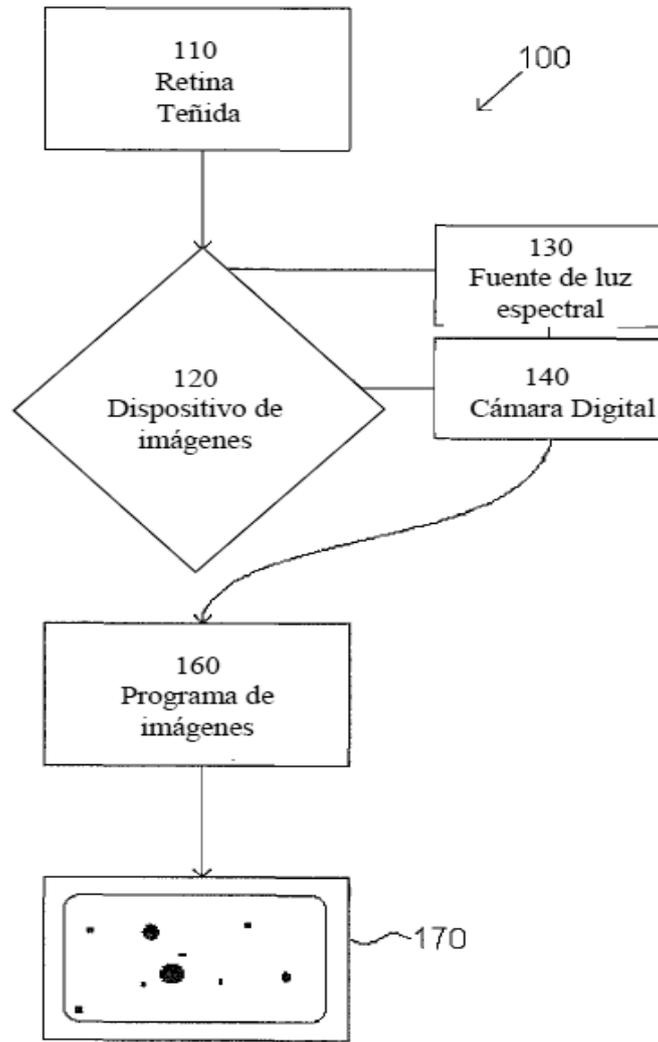


Figura 6

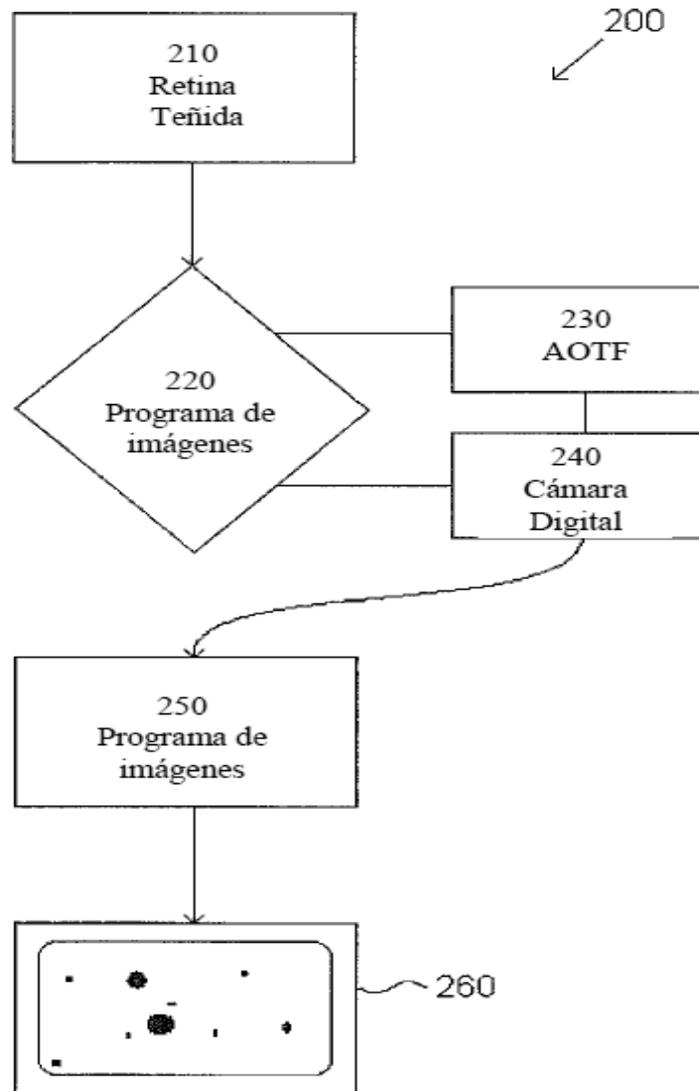


Figura 7

Ratón sin Tg (10 meses de edad)

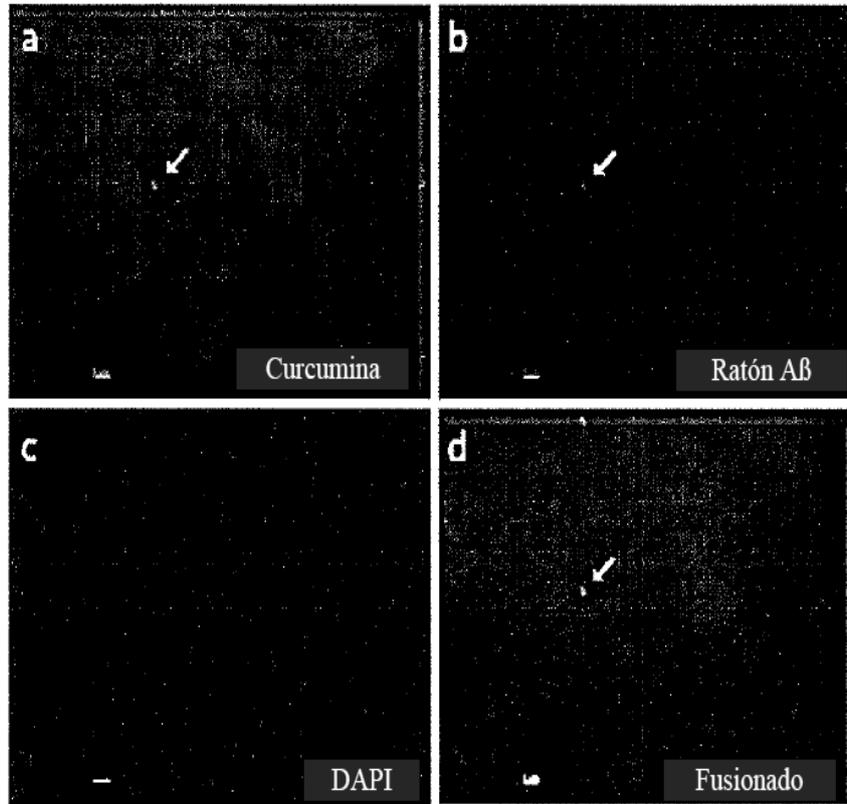


Figura 8

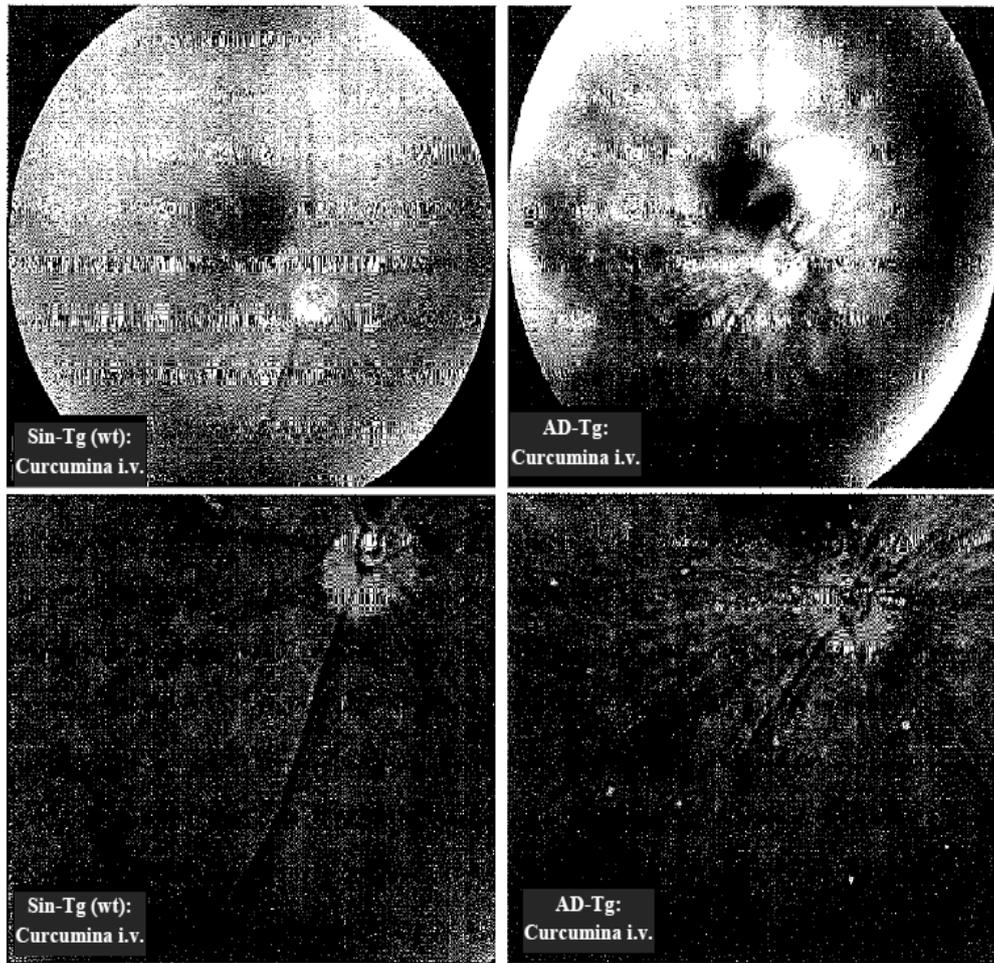


Figura 9