

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
27 de enero de 2011 (27.01.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2011/009967 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
G01N 33/577 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/000392

(22) Fecha de presentación internacional:  
23 de julio de 2009 (23.07.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200901632 23 de julio de 2009 (23.07.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avenida de Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): SANCHEZ RAMOS, Celia [ES/ES]; Escuela Universitaria de Optica de la Universidad Complutense de Madrid, Avenida Arcos del Jalon s/n, 28037 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: KIT AND METHOD FOR THE PRE-MORTEM *IN VITRO* DETECTION OF ALZHEIMER'S DISEASE

(54) Título : KIT Y MÉTODO DE DETECCIÓN PRE MÓRTEM DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER IN VITRO

(57) Abstract: The invention relates to a kit and method for the pre-mortem *in vitro* detection of Alzheimer's disease. The invention relates to a kit for detecting Alzheimer's disease by the *in vitro* identification of the presence of biomarkers in waste from crystal lens surgery. The kit enables the pre-mortem detection of the disease, even before the appearance of clinical symptoms. The beta-amyloid peptide is selected from among the biomarkers.

(57) Resumen: Kit y método de detección premortem de la enfermedad de Alzheimer in vitro. La invención se refiere a un kit de detección de la enfermedad de Alzheimer mediante la identificación in vitro de la presencia de biomarcadores en los restos desechados tras una intervención quirúrgica de cristalino. El kit permite la detección premortem de la enfermedad, incluso antes de la aparición de sintomatología clínica. Entre los biomarcadores resulta de elección el péptido beta-amiloide.



WO 2011/009967 A1

## **Kit y método de detección pre mórtem de la enfermedad de Alzheimer *in vitro***

### **OBJETO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a la detección precoz de la enfermedad de Alzheimer (EA) a través de los restos desechados de las intervenciones quirúrgicas de cristalino. Hasta el momento, el único método de diagnóstico fiable de esta enfermedad consiste en el análisis del tejido cerebral del paciente tras su muerte. Esta invención plantea detectar tempranamente a los pacientes  
10 de Enfermedad de Alzheimer, preferentemente antes que muestren signos de la neuropatía.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, que se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las neuronas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian.

20 La repercusión de esta enfermedad es tal que se calcula entre 18 y 22 millones de personas las afectadas a nivel mundial, con una prevalencia media del 3-15% y una incidencia anual entre 0,3- 0,7 %. La prevalencia es variable, pero se calcula que entre un 1-5 % de la población mayor de 65 años y entre un 20-40% de la población mayor de 85 años padece la enfermedad. De hecho, su  
25 prevalencia se duplica cada cinco años después de los 65 años y constituye del 50 al 60 % de los síndromes demenciales en estudios post-mortem. (J. Vilalta-Franch, S. López-Pousa, J. Garre-Olmo, A. Turón Estrada e I. Pericot-Nierga. Heterogeneidad clínica de la enfermedad de Alzheimer según la edad de inicio. Revista de Neurología 2007; 45:67-72)

30

Aunque actualmente no existe cura para esta enfermedad, los medicamentos ahora disponibles para tratar el Alzheimer pueden ayudar a mantener las

capacidades mentales de los pacientes durante meses o años, aunque no cambien el curso fundamental de la enfermedad. En este sentido, el diagnóstico precoz de la enfermedad aumenta las perspectivas de un tratamiento con éxito.

5

Sin embargo, actualmente no existe un método de diagnóstico específico y determinante para esta enfermedad, sino que se basa, primero, en la historia del paciente y en la observación clínica de características neurológicas y psicológicas, tanto por parte del profesional de la salud como por parte de los familiares. En segundo lugar, se realizan pruebas de imagen cerebral utilizando diferentes técnicas entre las que podemos señalar la Tomografía Axial Computarizada (TAC), Resonancia Magnética (RMN), Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) o la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT); sin embargo, estas técnicas pueden mostrar diferentes signos de que existe algún tipo de demencia, sin determinar el diagnóstico definitivo. (Manuela Neumann, Deepak M. Sampathu, Linda K. Kwong. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 2006; 314:130-133)

20 El diagnóstico de la enfermedad basado en la observación clínica del paciente, en las pruebas neurológicas y neuropsicológicas, así como en la ausencia de un diagnóstico alternativo y apoyado en el escáner cerebral, ha conseguido aproximar la certeza del diagnóstico a un 85% pero el diagnóstico definitivo debe hacerse con pruebas histológicas sobre tejido cerebral obtenidas en la autopsia, es decir, se trata siempre de un diagnóstico post mórtem.

Los estudios post mórtem demuestran que la enfermedad de Alzheimer se manifiesta en dos lesiones cerebrales. Una de ellas es la formación de un depósito proteico que conforma las placas seniles o neuríticas de péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y la otra consiste en un enmarañamiento de las fibrillas de las neuronas, conocido como ovillos neurofibrilares.

30

- Las placas seniles de la enfermedad de Alzheimer están formadas por un centro proteico rodeado de neuronas degeneradas, así como de células de glía y microglía. El péptido A $\beta$  se produce normalmente en forma monomérica soluble y circula en concentraciones bajas en el líquido cefalorraquídeo y la sangre. A pesar del papel aparentemente negativo que presenta en esta neuropatía, este péptido participa en funciones celulares normales, esto es:
- 5 - Ejerce una función autocrina y estimula la proliferación celular.
  - Promueve la adhesión celular y protege a las neuronas contra el daño oxidativo.
  - 10 - En concentraciones fisiológicas puede actuar como factor neurotrófico y neuroprotector.
  - Es un regulador fisiológico de la actividad de los canales iónicos de potasio (K) y calcio (Ca) en neuronas y es secretado por algunas de estas células en respuesta a la actividad neuronal para regular negativamente la transmisión
  - 15 sináptica excitatoria.
  - Sus depósitos pueden atrapar iones metálicos potencialmente peligrosos. (Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid  $\beta$ -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. Annu Rev Cell Biol (1994); 10:373-40)
- 20 Los ovillos neurofibrilares son restos de microtúbulos dañados (los microtúbulos forman la estructura que permite el flujo de nutrientes a través de la neurona). La formación de estos ovillos se inicia en la región del hipocampo en la que reside la función de la gestión de la memoria y la ruptura del sistema microtubular origina defectos en el transporte axonal y probablemente
- 25 degeneración celular, lo que ha sido observado en las neuronas afectadas por la enfermedad de Alzheimer. En este proceso están implicadas la proteínas tau, que pertenecen a la familia de la "Proteínas asociadas a los microtúbulos" o MAP, por lo que muchas veces las enfermedades en las que se observa la formación de neurofibrillas se denominan taupatías. (Castaño, E.M; Frangione.
- 30 Biology of disease: Human amyloidosis, Alzheimer's disease and related disorders. Laboratory Investigation (1998) 58:122).

En el citoplasma, la proteína tau está normalmente fosforilada, es decir que tiene grupos fosfato unidos, los cuales son muy importantes en la regulación de la función de la proteína. Esta fosforilación permite la movilidad de las proteínas tau dentro de los axones de las neuronas en dirección centrífuga. Los  
5 filamentos helicoidales están compuestos por agregados de tau que, a diferencia de la proteína normal, contiene un número elevado de fosfatos por lo cual se dice que tau se halla hiperfosforilada (Wang H. Y., LiW., Benedetti N. J. and Lee D. H. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. J. Biol. Chem. (2003) 278, 31  
10 547–31 553).

En la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías se produce un fenómeno de hiperfosforilización y/o de fosforilación anormal. Se ha demostrado que ni la forma soluble de tau hiperfosforilada ni la que forma los filamentos tienen  
15 capacidad de promover la formación de microtúbulos ni de estabilizar los microtúbulos formados previamente. Más aún, esta forma de tau inhibe el ensamblado de la tubulina en los microtúbulos y puede desarmar aquellos formados con la proteína normal.

20 Desde hace varios años se estudia la detección de diferentes biomarcadores (marcadores biológicos) en varios fluidos corporales, fundamentalmente en líquido cefalorraquídeo, sangre y orina, como base de futuras pruebas diagnósticas para la detección de la EA, sin embargo, por el momento, los expertos en el área no han podido establecer ningún protocolo de utilización de  
25 un biomarcador en el diagnóstico pre mórtem de la EA en este tipo de muestras (H.M. Schipper. The role of biologic markers in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* (2007) 3:325-332). En este sentido, el péptido A $\beta$  y la proteína tau son los principales biomarcadores para el diagnóstico *in vitro* de la EA.

30

La patente EP1420830A1 describe un método de diagnóstico ocular *in vivo* de la EA mediante el uso de compuestos o marcadores que se unen al péptido A $\beta$

presente en tejidos oculares de los enfermos. Los marcadores son, normalmente, compuestos fluoróforos que, al unirse al péptido A $\beta$  permiten detectar y cuantificar el A $\beta$  presente mediante mediciones de fluorescencia, lo que pondría en evidencia la existencia o no de la enfermedad en el paciente. El procedimiento divulgado consiste en aplicar dichos marcadores en el ojo en forma de líquido o gel. La lipofilia de estos compuestos facilita la penetración de los mismos en el tejido ocular, donde se unen al péptido A $\beta$ . Posteriormente, tras un periodo de tiempo que asegure la penetración de los compuestos en el tejido ocular y la unión de los mismos al péptido A $\beta$ , se lleva a cabo la medición de fluorescencia directamente en los ojos del paciente. Se trata, por tanto, de un diagnóstico la EA pre mórtem, in vivo y no invasivo.

Por otra parte, la patente EP1913866A1 divulga una nueva forma no invasiva de detectar marcadores biológicos de EA en el cristalino y en otros tejidos oculares usando dispersión de luz quasi-elástica, espectroscopia Raman, fluorimetría u otras técnicas ópticas. Estas técnicas permiten la detección y monitorización de deposición de péptido A $\beta$  en el ojo para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas como es la EA.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos y los avances que se acaban de describir, el diagnóstico definitivo de la EA, por el momento, sigue realizándose sólo post mórtem. Sigue siendo fundamental, por lo tanto, desarrollar nuevas herramientas para la detección temprana y preferentemente preclínica, de la EA, que permitan instaurar el tratamiento adecuado en los estadios tempranos de la enfermedad, de manera que se pueda retrasar el desarrollo de los síntomas de la misma.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit de detección de la EA mediante la utilización de los restos desechados en intervenciones quirúrgicas

de cristalino donde se extraen los desechos oculares de la cirugía de cristalino. Sobre esos desechos se analiza la presencia de un biomarcador de la EA, preferentemente el péptido A $\beta$ , que, además de depositarse en el cerebro de los enfermos de Alzheimer dando lugar a las placas seniles o neuríticas, también lo hace en el cristalino.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los restos de desecho de las operaciones de cristalino en la elaboración de un método para la detección de la EA mediante la detección de un biomarcador, por ejemplo mediante la detección de péptido A $\beta$ .

En medicina oftalmológica, la opacificación total o parcial del cristalino se llama cataratas. Hoy en día, la intervención quirúrgica de cristalino más frecuente es la operación de cataratas. La catarata es una enfermedad crónica asociada al proceso de envejecimiento y el paulatino aumento de la esperanza de vida ha provocado un aumento sustancial de la prevalencia de cataratas que afecta a una proporción creciente de la población. Las cataratas se pueden desarrollar por varios motivos, sin embargo, la catarata adquirida es el tipo más frecuente y es la principal causa de pérdida de visión entre los mayores de 55 años, por lo que la operación de cataratas es una intervención muy frecuente en el rango de edades susceptibles de padecer la enfermedad de Alzheimer. De hecho, en personas menores de 50-55 años la prevalencia de las cataratas es baja, del orden del 0,2% al 7%; en grupos de edades intermedias, entre 55 y 65 años aproximadamente, las cataratas afectan a alrededor del 20% de la población de tal edad; y, a partir de los 70-75 años, las cataratas afectan a entre el 40% y más del 60% de la población. Aún sin llegar a producir problemas graves de visión que obliguen a la intervención quirúrgica, más del 75% de las personas mayores de 60 años y el 95% de las mayores de 75 presentan ya algún grado de opacidad en el cristalino.

De las intervenciones quirúrgicas realizadas para la eliminación de cataratas, la más difundida actualmente es la cirugía extracapsular, ya que tiene menos

complicaciones que otras técnicas y permite el empleo de una lente intraocular. Mediante esta cirugía se extrae sólo la porción opaca de la catarata y se deja la porción posterior de la cápsula, que sirve de soporte para una lente intraocular que ocupa el mismo lugar que el cristalino extraído. La cirugía extracapsular se realiza generalmente mediante una técnica denominada facoemulsificación en la que se hace una incisión pequeña en el tejido ocular, seguida de la destrucción de las lentes opacas del paciente aplicando ondas ultrasónicas que producen una vibración de entre 30000 y 60000 veces por segundo. Esta vibración rompe la catarata en fragmentos suficientemente pequeños para ser emulsionados y aspirados suavemente. Los aparatos de facoemulsión constan de un sistema de circulación de suero con irrigación y aspiración, conectado al propio terminal de ultrasonido. Este sistema permite aspirar los fragmentos emulsificados al mismo tiempo que mantiene el terminal del emulsificador refrigerado para evitar quemaduras. Los fragmentos de cristalino opaco aspirados se recogen junto con el suero en un recipiente y constituyen los restos desechados en las operaciones de cristalino. Para finalizar la operación, se inserta una lente en el lugar que ocupaba el cristalino del paciente (Olitsky SE, Hug D, Smith LP. Abnormalities of the Lens. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18<sup>va</sup> ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: cap. 627).

El kit de detección de la EA de la invención incluye dos componentes. En primer lugar, consta de un elemento contenedor donde se recogen los restos de la operación de cristalino. Estos restos se encuentran en un líquido que suele ser suero fisiológico. En segundo lugar, el kit contiene un elemento de marcaje que se une al biomarcador de EA presente en el conjunto de los restos del cristalino. En caso necesario, el kit incluye un sistema de detección del elemento de marcaje unido al biomarcador, que permite comprobar la presencia o no de dicho biomarcador y, por lo tanto, de la EA en el paciente.

30

Adicionalmente, el kit puede contener un sistema para separar la parte sólida y

la parte líquida de la mezcla de restos obtenida como resultado de la operación. Se trata generalmente de una centrifugadora, la cual imprime a la mezcla un movimiento rotatorio con una fuerza de mayor intensidad que la gravedad, provocando la sedimentación de los restos sólidos en cuestión.

5

Los restos desechados de las intervenciones quirúrgicas de cristalino que se incluyen en el kit, permiten detectar el contenido de biomarcador que se encuentra en el cristalino del paciente como consecuencia de la aparición y desarrollo de la EA. La presente invención también se refiere al método de  
10 detección *in vitro* de un biomarcador de EA en el cristalino y este método incluye, en primer lugar, la recogida, en un elemento contenedor, de los restos de cristalino extraídos durante la operación de catarata junto con el suero utilizado en la misma. Esta mezcla puede ser tratada directamente con elementos de marcaje que se unen al biomarcador, o bien, puede ser  
15 centrifugada para separar la parte líquida de la mezcla, correspondiente al suero, de la parte sólida, correspondiente a las células fragmentadas. Una vez separada, la parte sólida se procesa para proceder al marcaje del biomarcador de EA seleccionado para detectar la enfermedad en el paciente. Este paso varía en función de la técnica seleccionada para la detección del biomarcador.  
20 La técnica puede caracterizarse por la inclusión de la muestra en bloques de parafina de los que posteriormente se obtienen cortes o láminas sobre los que se aplica el elemento de marcaje del biomarcador de EA seleccionado. Estos bloques también pueden obtenerse por congelación rápida de la parte sólida de la muestra. Otra opción es separar las proteínas del resto de elementos de la  
25 parte sólida mediante cualquiera de las técnicas habituales (sonicación, tratamiento con detergentes suaves, etc.) y, posteriormente, detectar la presencia o ausencia del biomarcador en la mezcla de proteínas por medio de cualquiera de las técnicas utilizadas por los expertos en la materia (Western blot, ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, microarrays de proteínas, etc.) y  
30 utilizando para ello el elemento de marcaje oportuno.

En la presente invención por "elemento de marcaje" se entiende cualquier

compuesto que pone de manifiesto específicamente la presencia de un determinado componente de una mezcla heterogénea y, más concretamente, cuando dicho componente es un biomarcador; y por "biomarcador" se entiende una sustancia, cuya presencia es objetivamente mensurable y evaluable, utilizada como indicadora de la existencia de la EA bien por su propia presencia o bien por modificaciones en su cantidad o concentración.

El biomarcador utilizado en esta invención puede ser cualquiera de los biomarcadores de EA. Preferentemente, se utiliza el péptido A $\beta$ , entendiéndose por péptido A $\beta$  las proteínas o péptidos que forman parte de las placas neuríticas o seniles, tanto la proteína amiloide como la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP) como cualquiera de las isoformas de entre 39 y 42 residuos aminoacídicos generados por el proceso proteolítico natural que da lugar a varios los péptidos (A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>2-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>) a partir de la APP.

El elemento de marcaje seleccionado varía en función de la técnica elegida para detectar la presencia de EA. Frecuentemente, estos marcadores ya conocidos en el estado de la técnica son compuestos fluoróforos, es decir, compuestos que emiten fluorescencia una vez unidos al biomarcador, lo que permite detectar fácilmente la presencia de dicho biomarcador en la muestra en cuestión. Por ejemplo, un fluoróforo ampliamente utilizado para la detección de beta-amiloide es el Rojo Congo o derivados del mismo, que da lugar a la aparición de depósitos de amiloide teñidos en un tono entre fucsia y anaranjado fácilmente identificables. Al igual que el uso de otros fluoróforos, la evidencia de placas puede realizarse con otros compuestos como tioflavina, el cristal violeta, o la plata metenamina. También se pueden utilizar como elementos de marcaje anticuerpos específicos anti-biomarcador mediante técnicas convencionales.

El kit y el método de la invención suponen un beneficio para el paciente, ya que su uso permite la detección de un biomarcador de la EA *in vitro* y no

directamente sobre el propio ojo, por lo que no es necesario aplicar ningún gel o pomada con los elementos de marcaje de A $\beta$  sobre el ojo del paciente ni hacer medidas directamente sobre el mismo, como ocurre con alguna de las últimas invenciones conocidas para detectar A $\beta$  (EP1420830A1), evitando así cualquier efecto secundario, como las reacciones anafilácticas. Por otra parte, en la elaboración del método y en el kit de detección de la EA se aprovechan los restos que se extraen en las operaciones de cristalino y que son sistemáticamente desechados dándoles una utilidad para analizar la presencia de A $\beta$  u otros bioindicadores de la EA. Dado que las operaciones de cristalino en que se obtienen restos de cristalino y otros fluidos oculares se realizan en personas de edades similares o incluso anteriores a la aparición de los primeros síntomas clínicos de la EA, la presente invención proporciona herramientas para la detección precoz de esta enfermedad de forma que se puedan instaurar de manera temprana tratamientos que mitiguen o retrasen el avance de la enfermedad.

### **Modo de realización de la invención**

Los siguientes ejemplos que se acompañan ayudan a comprender mejor la invención y se presentan con carácter ilustrativo y no limitativo de ésta.

#### **Ejemplo 1. Obtención de las muestras**

Se utilizaron los desechos extraídos en cirugía de cristalino realizadas a 42 pacientes, de edades comprendidas entre 68 y 88 años, mediante facoemulsión. Dichos restos se habían recogido en bolsas de plástico de desechos, habituales en este tipo de intervenciones quirúrgicas y, cada una de ellas, contenía los restos de cristalino y otros restos de fluidos oculares de una operación junto con el suero fisiológico utilizado en la misma. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesado.

## **Ejemplo 2. Separación de los restos sólidos del cristalino**

En primer lugar, se extrajo de la bolsa la disolución de restos celulares y suero fisiológico y se dejó en un vaso de precipitados durante 24h para que se produjera una precipitación natural de los restos sólidos, transcurrido este tiempo, se retiró todo el sobrenadante posible y se procedió a la centrifugación del sobrenadante. Se extrajo un volumen de 15ml del sobrenadante de esta primera centrifugación, que denominamos disolución M1, y, en un tubo de ensayo, se centrifugó durante 15 minutos a 5000 revoluciones por minuto. Esta operación proporcionó una masa de restos sólidos y una disolución que se denominó M2.

De esta nueva disolución M2 se extrajo un volumen de 5ml y se centrifugó en un tubo Eppendorf durante 10 minutos a 5000 revoluciones por minuto. Esta operación proporcionó una masa de restos sólidos y una disolución que se denominó M3.

De esta nueva disolución M3 se extrajo un volumen de 5ml y se centrifugó en un tubo Eppendorf durante 5 minutos a 5000 revoluciones por minuto. Esta operación proporcionó una masa de restos sólidos y una disolución que se denominó M4.

Y por último se extrajo de la disolución M4 un volumen de 5ml y se centrifugó en un tubo Eppendorf durante 5 minutos a 5000 revoluciones por minuto. Esta operación proporcionó una masa de restos sólidos y un sobrenadante que se desechó.

Se unió toda la masa de restos sólidos obtenida mediante las diferentes centrifugaciones y se procedió a realizar una última centrifugación para eliminar todo el sobrenadante posible de la masa de restos sólidos, obteniendo una masa compacta.

**Ejemplo 3. Inclusión en parafina de la masa de restos sólidos extraída de la disolución en suero de fragmentos de cristalino**

Una vez obtenida la masa de restos sólidos se incluyó en un “pocillo” al que se  
5 taparon los dos extremos con una tela fina o media. Se colocaron los “pocillos”  
en un recipiente con agua corriente y el grifo abierto para proceder a su lavado  
durante un tiempo de 2 a 4 horas. Una vez realizado el lavado se procedió a  
deshidratar la masa en alcohol.

10 Se extrajo la muestra de los “pocillos”, se secó con una gasa esterilizada y se  
procedió a incluirla en alcohol al 30% durante 30 minutos. Una vez transcurrido  
ese tiempo, se secó la muestra con una gasa esterilizada y se procedió a  
incluirla en alcohol al 50 % durante 25 minutos. Trascurridos los 25 minutos de  
15 inclusión en alcohol de 50%, se procedió al secado de la muestra y posterior  
inclusión en alcohol de 70% durante 24 horas.

Se secó la muestra con una gasa estéril y se procedió a incluirla en alcohol de  
96%. Esta inclusión se realizó en dos pasos de 25 minutos cada uno. Se  
procedió al secado de la muestra con gasas estériles y se incluyó en alcohol de  
20 100%. Esta inclusión se realizó en tres pasos, dos de ellos de 25 minutos y el  
último de 1h y 30 minutos. Se secó la muestra y se procedió a su inclusión en  
xileno durante 40 minutos.

Se preparó una disolución de parafina líquida y xileno con una proporción 1:1 y  
25 se incluyó la muestra en dicha disolución durante 30 minutos en una estufa a  
50°C. Trascurrido ese tiempo se incluyó la muestra en parafina líquida en tres  
pasos, dos de ellos de 45 minutos y un paso final de 1h y 30 minutos, durante  
esta fase los recipientes con parafina se encontraban dentro de una estufa a  
temperatura de 50°C.

30

Una vez terminado este proceso de deshidratación se comenzó con el montaje  
de los bloques de parafina. Para montar los bloques de parafina se disponía de

parafina líquida a una temperatura de 50°C, barras de Leuckart y un mechero Bunsen. Se colocaron las barras de Leuckart sobre una superficie metálica, se vertió la parafina, se colocó la identificación de la muestra y se procedió a incluir la muestra en el bloque aún líquido. Una vez realizada esta operación se introdujo el bloque en un cristizador con agua corriendo hasta que solidificó totalmente con lo cual se obtuvo el bloque de parafina con la muestra incluida.

Mediante la utilización de un microtomo se obtuvieron secciones del bloque de parafina de 10 µm de grosor. Una vez obtenida una serie de cortes, se depositaron sobre agua a 40°C para que los cortes se estirasen. A continuación, se recogieron los cortes con portaobjetos que se colocaron en estufa a 37°C durante toda la noche para fijarlos.

#### **Ejemplo 4. Tinción con Rojo Congo en solución de hematoxilina de Mayer**

Una vez realizado el corte, se procedió a rehidratarlo para permitir su coloración, siguiendo el proceso inverso a la deshidratación descrita en el ejemplo 3, es decir, utilizando alcohol cada vez de menor concentración hasta dejar los cortes en agua desionizada.

Posteriormente se procedió a la tinción en solución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos, se aclaró durante 5 minutos con agua del grifo y se dejó en solución de cloruro sódico alcalina durante 20 minutos. A continuación se tiñó con solución de rojo congo alcalina (SIGMA-ALDRICH) durante 20 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la tinción con Rojo Congo y utilizando un microscopio de luz doblemente polarizada, la aparición de una coloración se utilizó como criterio para determinar la presencia de péptido Aβ en la muestra.

**Ejemplo 5. Tinción con Rojo Congo en hematoxilina de Gill**

Se realizó como el Ejemplo 4 pero, en vez de hematoxilina de Mayer, se utilizó hematoxilina de Gill N° 3 y se tiñó durante 3 minutos.

**5 Ejemplo 6. Tinción con tioflavina T**

Una vez realizado el corte, se procedió a rehidratarlo para permitir su coloración, siguiendo el proceso inverso a la deshidratación descrita en el ejemplo 3, es decir, utilizando alcohol cada vez de menor concentración hasta dejar los cortes en agua desionizada.

10

Los cortes ya desparafinados e hidratados fueron incubados en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas con el suero antipéptido. Posteriormente se incubaron con una mezcla de IgG anti IgG de conejo conjugado con Alexa-594 diluido 1:500 y tioflavina T 10  $\mu$ M, preparados ambos en albúmina sérica bovina (BSA) 1% (p/v) en tampón PBS 1X pH 7,4; durante 4 horas en oscuridad. Luego los cortes se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS 1X/ Tween 20 0.05% (p/v).

15

Los cortes se montaron en medio para fluorescencia y fueron observados en microscopio de epifluorescencia usando filtros para rodamina (594 nm) y FITC (488 nm) para visualizar la fluorescencia roja del Alexa-594 y verde de la tioflavina T.

20

**Ejemplo 7. Montaje**

25 Luego de la coloración, se deshidrató el corte y se procedió a la aclaración y montaje definitivo. La deshidratación se realizó con alcoholes de graduaciones crecientes.

La aclaración se realizó con xilol. El objetivo de este paso es impregnar el corte con el disolvente Bálsamo de Canadá, que al mismo tiempo le confiere un índice de refracción semejante al del vidrio.

30

Para el montaje se limpió el portaobjeto alrededor del corte y se depositó sobre el mismo una gota de Bálsamo de Canadá disuelto en xilol y se cubrió con un cubreobjeto. Se dejó secar unas horas antes de su observación al microscopio.

5 **Ejemplo 8. Detección de péptido A $\beta$  en cortes de parafina mediante anticuerpos monoclonales anti-A $\beta$  humano**

Se utilizó Monoclonal Mouse Anti-Human Beta-Amyloid (Dako), en diluciones de 1:50 y se aplicó a secciones, incluidas en parafina y fijadas en formol, utilizando 10 minutos de recuperación de epítipo por calor y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario.

Para la recuperación del epítipo los cortes de tejido se desparafinaron y rehidrataron como se describe en el ejemplo 4, y se sumergieron los cortes, que se encontraban a temperatura ambiente, en una solución precalentada y diluida 1:10 con agua deshinizada de Dako Target Retrieval Solution, High pH concentración 10x, en un baño de agua a 95°C. Se incubaron durante 30 minutos. Se retiró el contenedor con los portaobjetos del baño de agua.

20 Una vez enfriada la muestra durante unos 20 minutos a temperatura ambiente se decantó la solución Target Retrieval Solution, High pH y se aclararon los cortes tres veces con tampón pH 8,0 que contenía 5,0 M guanidinaHCl y 50 mM trisHCl, a temperatura ambiente.

25 El control negativo se realizó con DakoCytomation Mouse IgG1, diluido a la misma concentración de IgG murina que el anticuerpo primario.

**Ejemplo 9: Detección de péptido A $\beta$  por una técnica inmunoenzimática**

30

Los niveles de péptido A $\beta$  se cuantificaron mediante sandwich ELISA utilizando un kit comercial, Innotest A  $\beta$ 1-42, (Innogenetics, Bélgica), que detecta el

fragmento  $\beta$ 1-42 de amiloide.

La muestra obtenida según el ejemplo 2 fue solubilizada en una solución tampón enfriada en hielo que contenía 5,0 M guanidinaHCl y 50 mM trisHCl, pH 8,0; las muestras estuvieron en incubación por 3 a 4 horas y luego se diluyeron 1:10 en solución tampón enfriada en hielo con caseína al 0,25%, azida de sodio 0,05%, 20  $\mu$ g/ml de aprotinina, 5 mM EDTA, pH 8,0, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina en PBS. Se centrifugaron a 16.000g por 20 minutos a 4°C.

Se utilizaron pocillos impregnados del anticuerpo primario (anti-A $\beta$ ) que se incubaron durante 1 hora a 37° con otro anticuerpo anti-A $\beta$  biotinilado, las muestras correspondientes, estreptavidina conjugada con peroxidasa y una solución cromógena (tetrametilbenzidina disuelta en dimetil sulfóxido). La reacción se paró con ácido sulfúrico 1N y se leyó la absorbancia de cada pocillo con un lector a una longitud de onda de 450 nm.

Se realizó una curva estándar entre 100 y 2.000 pg/ml que permitió establecer la ecuación y transformar los datos de absorbancia en concentración de proteína (pg/ml). Para cada muestra se duplicó la determinación y se tomó como resultado final la media de ambas. Aquellas muestras en las que la diferencia de determinación entre los dos pocillos fue mayor de un 20% se descartaron.

## Reivindicaciones

1. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer que comprende:
  - a) un elemento contenedor donde se recogen los desechos oculares extraídos durante la cirugía de cristalino.
  - b) un elemento de marcaje que se une a un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer que esté presente en los desechos oculares recogidos en el elemento contenedor;
2. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 1, que comprende, además, un sistema de detección del elemento de marcaje unido al biomarcador.
3. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende adicionalmente los medios necesarios para realizar la separación de la parte sólida y la parte líquida del contenido del elemento contenedor.
4. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el biomarcador es el péptido  $\beta$ -amiloide.
5. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de marcaje es un compuesto fluorescente.
6. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 5, en el que el compuesto fluorescente es Rojo Congo o derivados del mismo.
7. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 5, en el que el compuesto fluorescente es tioflavina T.
8. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según cualquiera de las

reivindicaciones 1-4, en el que el elemento de marcaje es un anticuerpo.

9. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 8, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-beta-amiloide.

5

10. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 8 y 9, en el que el sistema de detección se basa en una técnica inmunológica.

10 11. Kit de detección de la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 10, en el que la técnica inmunológica se selecciona entre ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA directo, ELISA indirecto y Western Blot.

15 12. Método in vitro de detección de la enfermedad de Alzheimer que comprende:  
a) recuperar los restos desechados de una operación quirúrgica de cristalino;  
b) detectar un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en los restos recuperados.

20 13. Método in vitro según la reivindicación 12 que incluye un paso adicional c) entre el paso a) y el paso b) y en el que dicho paso adicional c) comprende marcar el biomarcador de la enfermedad de Alzheimer con un elemento de marcaje.

25 14. Método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13 que incluye un paso adicional d) entre el paso a) y el paso b) o bien entre el paso a) y el paso c) y en el que dicho paso adicional d) comprende separar la parte sólida y la parte líquida de los restos de desecho recuperados.

30 15. Método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el biomarcador es el péptido beta-amiloide.

16. Método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que el marcaje del paso c) se realiza con un compuesto fluorescente.
17. Método in vitro según la reivindicación 16, en el que el compuesto fluorescente es Rojo Congo o derivados del mismo.  
5
18. Método in vitro según la reivindicación 16, en el que el compuesto fluorescente es tioflavina T.
- 10 19. Método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que el marcaje del paso c) se realiza con un anticuerpo.
20. Método in vitro según la reivindicación 19, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-beta-amiloide.  
15
21. Método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 12, 13, 14, 15, 19 y 20, en que el sistema de detección se basa en una técnica inmunológica.
22. Método in vitro según la reivindicación 21, en que la técnica inmunológica se selecciona entre ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA directo, ELISA indirecto y Western Blot.  
20
23. Uso de los restos de desecho de las intervenciones de cristalino en la elaboración de un método de diagnóstico in vitro de la enfermedad de  
25 Alzheimer.
24. Uso según la reivindicación 23 en el que el método de diagnóstico in vitro comprende:
- a) recuperar los restos desechados de una operación quirúrgica de cristalino;
- 30 b) detectar la presencia o ausencia de un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en los restos recuperados.

25. Uso según la reivindicación 24 en el que el método de diagnóstico in vitro incluye un paso adicional c) entre el paso a) y el paso b) y en el que dicho paso adicional c) comprende marcar el biomarcador de la enfermedad de Alzheimer con un elemento de marcaje.
- 5
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25 en el que el método de diagnóstico in vitro incluye un paso adicional d) entre el paso a) y el paso b) o bien entre el paso a) y el paso c) y en el que dicho paso adicional d) comprende separar la parte sólida y la parte líquida de los restos de desecho
- 10 recuperados.
27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que el biomarcador es el péptido beta-amiloide.
- 15 28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23-27, en el que el marcaje del paso c) se realiza con un compuesto fluorescente.
29. Uso según reivindicación 28, en el que el compuesto fluorescente es Rojo Congo o derivados del mismo.
- 20 30. Uso según reivindicación 28, en el que el compuesto fluorescente es tioflavina T.
31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23-27, en el que el marcaje
- 25 del paso c) se realiza con un anticuerpo.
32. Uso según la reivindicación 31, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-beta-amiloide.
- 30 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 31 y 32, en que el sistema de detección se basa en una técnica inmunológica.

34. Uso según la reivindicación 33, en que la técnica inmunológica se selecciona entre ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA directo, ELISA indirecto y Western Blot.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/000392

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**G01N 33/577** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Goldstein L. E. Et al. Cytosolic $\beta$ -amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. The Lancet. 12.04.2003, Vol. 361, pages 1258-1265 (the whole document).	1, 2, 4-22
X	EP 1913866 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION & THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, BOSTON) 23.04.2008, (the whole document).	1, 2, 4-22
X	WO 2008/115197 A2 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 25.09.2008, (the whole document).	1, 2, 4-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	--

Date of the actual completion of the international search

03 December 2009 (03.12.2009)

Date of mailing of the international search report

(11/12/2009)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Cumbreño Galindo

Telephone No. +34 91 349 68 80

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000392

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Frederikse P. H. et al. Oxidative stress increases production of $\beta$ -amyloid precursor protein and $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) in mammalian lenses and $A\beta$ has toxic effects on lens epithelial cells [online]. The Journal of Biological Chemistry. 26.04.1996, Vol. 271, N° 17, pages 10169-74 [retrieved on 27-11-2009] Recuperado de Internet: <URL: <a href="http://www.jbc.org/content/271/17/10169.full">http://www.jbc.org/content/271/17/10169.full</a> >	1, 2, 4-22
A	US 5955285 (AVERBACK) 21.09.1999, (the whole document).	1, 2, 4-22

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **Claims 3 and 23-34**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The subject matter of claim 3 does not meet the requirements in respect of clarity and concision (PCT Article 6) to such an extent that it was not possible to carry out a meaningful search on the basis of this claim, since the subject matter for which protection is sought is not clearly defined, since the claim contains the expression "necessary means" which, being vague and too broad, results in the features being defined not being indicated clearly. Regarding claims 23 to 34, see Box VIII of the WOISA, "Certain observations on the international application".
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000392

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1913866 A1	23.04.2008	WO 0216951 A CA 2420186 AC AU 8517001 A US 2002091321 A US 7107092 B EP 1322959 A EP 20010964297 JP 2004507296 T US 2004152068 A US 7297326 B AU 2001285170 B US 2007038127 A EP 20070023740	28.02.2002 28.02.2002 04.03.2002 11.07.2002 12.09.2006 02.07.2003 21.08.2001 11.03.2004 05.08.2004 20.11.2007 26.10.2006 15.02.2007 21.08.2001 21.08.2001
----- WO 2008115197 A2	----- 25.09.2008	----- NONE	-----
----- US 5955285	----- 21.09.1999	EP 0281922 AB EP 19880103174 US 4816416 A JP 1199163 A JP 2831644 B US 4919915 A CA 2032141 AC WO 9009789 A AU 5176990 A EP 0460078 A EP 19900904202 CA 1296624 C JP 4505006 T AT 90103 T US 5231170 A DE 3881413 T ES 2042615 T AU 649608 B US 5525339 A US 5567720 A JP 3179782 B US 6309892 B US 2002028473 A US 6727278 B US 2005191711 A	14.09.1988 02.03.1988 28.03.1989 10.08.1989 02.12.1998 24.04.1990 28.08.1990 07.09.1990 26.09.1990 11.12.1991 26.02.1990 03.03.1992 03.09.1992 15.06.1993 27.07.1993 14.10.1993 16.12.1993 02.06.1994 11.06.1996 22.10.1996 25.06.2001 30.10.2001 07.03.2002 27.04.2004 01.09.2005
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/000392

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N 33/577** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	Goldstein L. E. Et al. Cytosolic $\beta$ -amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. The Lancet. 12.04.2003, Vol. 361, páginas 1258-1265 (todo el documento).	1, 2, 4-22
X	EP 1913866 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION & THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, BOSTON) 23.04.2008, (todo el documento).	1, 2, 4-22
X	WO 2008/115197 A2 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 25.09.2008, (todo el documento).	1, 2, 4-22

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. <b>03 Diciembre 2009 (03.12.2009)</b>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <b>11 de Diciembre de 2009 (11/12/2009)</b>
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado <b>M. Cumbreño Galindo</b> N° de teléfono +34 91 349 68 80

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000392

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones N°s: 3, 23-34  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
El objeto de la reivindicación 3 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esa reivindicación, resulta imposible ya que no define claramente el objeto cuya protección se pretende pues incluye la expresión "medios necesarios" que por ser confusa y demasiado amplia hace que las características que define no estén indicadas claramente.  
Respecto a las reivindicaciones 23 a 34, ver el Recuadro VIII "Observaciones relativas a la solicitud internacional".
3.  Las reivindicaciones N°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000392

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Frederikse P. H. et al. Oxidative stress increases production of $\beta$ -amyloid precursor protein and $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) in mammalian lenses and $A\beta$ has toxic effects on lens epithelial cells [en línea]. The Journal of Biological Chemistry. 26.04.1996, Vol. 271, N° 17, páginas 10169-74 [recuperado el 27-11-2009] Recuperado de Internet: <URL: <a href="http://www.jbc.org/content/271/17/10169.full">http://www.jbc.org/content/271/17/10169.full</a> >	1, 2, 4-22
A	US 5955285 (AVERBACK) 21.09.1999, (todo el documento).	1, 2, 4-22

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000392

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP 1913866 A1	23.04.2008	WO 0216951 A CA 2420186 AC AU 8517001 A US 2002091321 A US 7107092 B EP 1322959 A EP 20010964297 JP 2004507296 T US 2004152068 A US 7297326 B AU 2001285170 B US 2007038127 A EP 20070023740	28.02.2002 28.02.2002 04.03.2002 11.07.2002 12.09.2006 02.07.2003 21.08.2001 11.03.2004 05.08.2004 20.11.2007 26.10.2006 15.02.2007 21.08.2001 21.08.2001
WO 2008115197 A2	25.09.2008	NINGUNO	
US 5955285	21.09.1999	EP 0281922 AB EP 19880103174 US 4816416 A JP 1199163 A JP 2831644 B US 4919915 A CA 2032141 AC WO 9009789 A AU 5176990 A EP 0460078 A EP 19900904202 CA 1296624 C JP 4505006 T AT 90103 T US 5231170 A DE 3881413 T ES 2042615 T AU 649608 B US 5525339 A US 5567720 A JP 3179782 B US 6309892 B US 2002028473 A US 6727278 B US 2005191711 A	14.09.1988 02.03.1988 28.03.1989 10.08.1989 02.12.1998 24.04.1990 28.08.1990 07.09.1990 26.09.1990 11.12.1991 26.02.1990 03.03.1992 03.09.1992 15.06.1993 27.07.1993 14.10.1993 16.12.1993 02.06.1994 11.06.1996 22.10.1996 25.06.2001 30.10.2001 07.03.2002 27.04.2004 01.09.2005