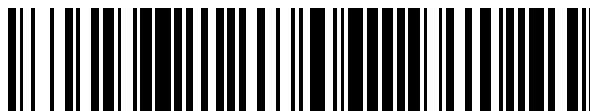


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 041 857**

21 Número de solicitud: 202530536

51 Int. Cl.:

C07F 5/04 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

C01B 35/06 (2006.01)

C09B 23/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.06.2025

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.11.2025

Fecha de concesión:

29.04.2026

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.05.2026

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100,00%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SARABIA VALLEJO, Álvaro;
MARTÍN CARMONA, María Antonia;
LÓPEZ-ALVARADO GUTIÉRREZ, María Del Pilar y
MENÉNDEZ RAMOS, José Carlos**

54 Título: **Cribado para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de β -amiloide por FRET en plasma**

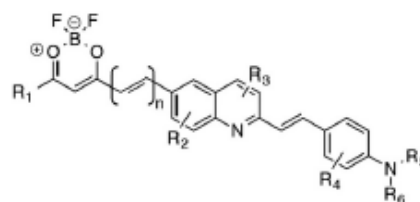
57 Resumen:

Cribado para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de β -amiloide por FRET en plasma.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo. Por ello, la búsqueda de biomarcadores y el desarrollo de metodologías que permitan su detección temprana, constituye un reto sanitario y económico.

Las concentraciones de beta amiloide A_{42} y A_{40} presentes en el líquido cefalorraquídeo y sangre de los enfermos de Alzheimer constituyen un buen biomarcador de pronóstico. Actualmente, es posible la detección de oligómeros con conformación anómala de A_{42} mediante un inmunoanálisis tipo ELISA o la detección temprana de la oligomerización de A_{42} mediante un inmunosensor que utiliza radiación infrarroja.

Se propone un método basado en resonancia de fluorescencia por transferencia de energía, empleando un par FRET (fluorescencia por transferencia de energía) formado por un compuesto A de fórmula general I y el compuesto B CRANAD-2.



I

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 3 041 857 B2

DESCRIPCIÓN

Cribado para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de β -amiloide por FRET en plasma

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra en el sector del uso de biomarcadores para determinación de enfermedades neurodegenerativas. De forma más concreta, se refiere a un método basado en resonancia de fluorescencia para la cuantificación en
10 plasma humano de concentraciones de fragmentos peptídicos de β -amiloide. El método es de utilidad como ensayo de cribado poblacional para la detección de potenciales enfermos de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo. En la actualidad, el diagnóstico de la EA se realiza en base a los antecedentes familiares y la sintomatología (deterioro cognitivo y motor). Se consigue diagnosticar cuando la enfermedad ya se encuentra avanzada y se corrobora por técnicas de imagen
20 diagnóstica. En ciertos casos, incluso, se realiza el análisis histológico *post mortem*.

A día de hoy, el diagnóstico temprano previo a la sintomatología clínica de las enfermedades neurodegenerativas en general y de la enfermedad de Alzheimer en particular, continúa siendo un problema no resuelto satisfactoriamente. Por ello, la
25 búsqueda de biomarcadores y el desarrollo de metodologías que permitan su determinación constituye un reto sanitario y económico.

Recientemente se han descrito métodos para el estudio de muestras de sangre de pacientes basados en espectrometría de masas y procedimientos de inmunoensayo
30 (N.R. Barthélemy, *et al.*, "Highly accurate blood test for Alzheimer's disease is similar or superior to clinical cerebrospinal fluid tests", *Nat Med* 2024;30:1085–1095. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02869-z>). Análogamente, algunas empresas (CN2, Quest Diagnostics, Fujierbio, Quanterix, Araclon Biotech) han desarrollado metodologías analíticas para la identificación de proteínas con conformación anómala
35 mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas o técnicas inmunoanalíticas (M.

Pascual-Lucas, *et al* “Clinical performance of an antibody-free assay for plasma $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ to detect early alterations of Alzheimer’s disease in individuals with subjective cognitive decline”, *Alzheimers Res Ther* 2023;15:2. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-01143-z>. S. Janelidze, *et al*, “Head-to-Head Comparison of 8 Plasma Amyloid- β 42/40 Assays in Alzheimer Disease”, *JAMA Neurol* 2021;78:1375. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3180>. M. Monane, *et al*, “A blood biomarker test for brain amyloid impacts the clinical evaluation of cognitive impairment”, *Ann Clin Transl Neurol* (2023;10:1738–1748. <https://doi.org/10.1002/acn3.51863>). En ambos casos se requiere pretratamiento de las muestras biológicas (extracción, digestión, inmunoprecipitación) antes de su determinación.

Las concentraciones de beta amiloide $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ presentes en el líquido cefalorraquídeo y sangre de los enfermos de Alzheimer constituyen un buen biomarcador de pronóstico. Se ha observado que los niveles de los fragmentos peptídicos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ se modifican en diferentes fluidos biológicos mucho antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas de la EA y se pueda diagnosticar (S. Mankhong, *et al*, “Development of Alzheimer’s Disease Biomarkers: From CSF-to Blood-Based Biomarkers”, *Biomedicines* 2022;10. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040850>). Así, la relación $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ permite hacer un pronóstico de la evolución de la patología debido a la mayor tendencia a la agregación de $A\beta_{42}$. Este cociente varía significativamente en pacientes con Alzheimer hasta 14 años antes de su diagnóstico (J. Jia, *et al*, “Biomarker Changes during 20 Years Preceding Alzheimer’s Disease”, *New England Journal of Medicine* 2024;390:712–722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa231>).

Con el fin de detectar en sangre la transformación de la conformación normal de α -hélice de la proteína amiloide en su conformación patológica de β -hélice, se han desarrollado diferentes inmunoanálisis (A. Nabers, *et al*, “Amyloid- β -Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer’s Disease”, *Anal Chem* 2016;88:2755–2762. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04286>. A. Nabers, *et al*, “Amyloid blood biomarker detects Alzheimer’s disease”, *EMBO Mol Med* 2018;10. <https://doi.org/10.15252/emmm.20170876>). Así, es posible la detección de oligómeros con conformación anómala de $A\beta$ mediante un inmunoanálisis tipo ELISA, denominado *Multimer Detection System* (M.J. Wang, *et al*, “Oligomeric forms of amyloid- β protein in

plasma as a potential blood-based biomarker for Alzheimer's disease", *Alzheimers Res Ther* 2017;9. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0324-0>). Otras metodologías propuestas se basan en la detección temprana de la oligomerización de A β mediante un inmunosensor que utiliza radiación infrarroja (T. Möllers, *et al*, "A β misfolding in blood plasma measured by immuno-infrared-sensor as an age-independent risk marker of Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 2021;13. <https://doi.org/10.1002/dad2.12151>) y de este modo es posible la detección de agentes implicados en los procesos de neurodegeneración (Babapour Mofrad, *et al*, "Plasma amyloid- β oligomerization assay as a pre-screening test for amyloid status", *Alzheimers Res Ther* 2021;13. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00873-w>. J. Stockmann, *et al*, "Amyloid- β misfolding as a plasma biomarker indicates risk for future clinical Alzheimer's disease in individuals with subjective cognitive decline", *Alzheimers Res Ther* 2020; 12:169. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00738-8>. L. Beyer, *et al*, "Amyloid-beta misfolding and GFAP predict risk of clinical Alzheimer's disease diagnosis within 17 years", *Alzheimer's & Dementia* 2023;19:1020–1028. <https://doi.org/10.1002/alz.12745>).

En la presente invención se propone un método basado en resonancia de fluorescencia por transferencia de energía (FRET).

20

El fenómeno FRET (*Föster Resonance Energy Transfer* o *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) es un caso particular de transferencia de energía intermolecular que se observa cuando dos compuestos presentan un adecuado solapamiento espectral entre el espectro de emisión de fluorescencia del donador y el espectro de excitación de fluorescencia del aceptor (M. Seidel, *et al*, "Miniaturization and parallelization of fluorescence immunoassays in nanotiter plates", *TrAC Trend Anal Chem*, 2003;22:385-394. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00606-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00606-X)). Así, este proceso aporta una elevada selectividad ya que el aceptor y el donador deben poseer afinidad por un mismo entorno y encontrarse localizados en proximidad espaciotemporal. Por ello, este fenómeno resulta extraordinariamente útil para el estudio de la interacción, detección y visualización de moléculas pequeñas y biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (C.-C. Li, *et al*, "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer and its biomedical applications", *TrAC Trend Anal Chem*, 2020;122:115753. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115753>. A. Kaur, *et al*, "Recent applications of FRET-based multiplexed techniques", *TrAC Trend Anal Chem*, 2020;123:115777.

35

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115777>).

El método descrito en la invención, basado en el proceso de resonancia de fluorescencia por transferencia de energía (FRET) permite la cuantificación sensible y selectiva de agregados $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo *in vitro* en muestras de plasma humano enriquecido con proteínas amiloides. El método es robusto, rápido y económico. Resulta de utilidad como ensayo de cribado poblacional para la detección de potenciales enfermos de Alzheimer.

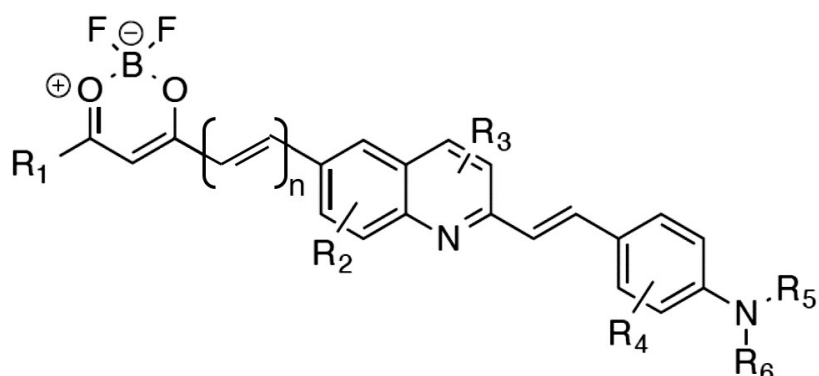
10 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

El método descrito en la presente invención combina la utilización de un par FRET constituido por dos moléculas orgánicas pequeñas ($M_M < 500$) con la detección de agregados de proteína amiloide ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$) y la cuantificación de agregados de proteína beta amiloide en plasma humano. No requiere del uso de reactivos de coste elevado (anticuerpos marcados) para el pretratamiento de las muestras biológicas, ni instrumentación sofisticada, ni personal especializado para la obtención y el tratamiento de los datos.

20 Para ello, se propone un par FRET (**A-B**) que genera una respuesta fluorescente en la región del infrarrojo cercano (NIR) con grandes ventajas desde el punto de vista biológico y diagnóstico, gracias a la afinidad de los compuestos fluorescentes **A** (donador) y **B** (receptor) por fragmentos de proteínas amiloide $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ y la efectividad que proporciona el proceso de transferencia de energía entre ambos, desarrollado exclusivamente en el entorno que proporcionan estos fragmentos peptídicos.

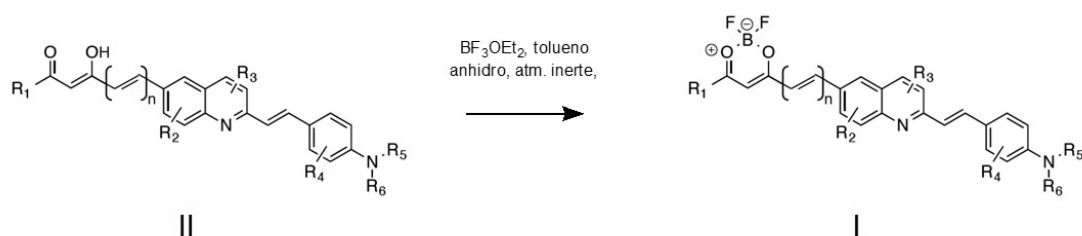
El compuesto **A** es un derivado de difluorodioxaborinino y estirilquinolina de fórmula I, donde R_1 es un sustituyente alquilo o anillos aromáticos, carbocíclicos o heterocíclicos; R_2 , R_3 y R_4 son H, OH, O-alquilo, O-arilo, SH, S-alquilo, S-arilo, NH_2 , NH-alquilo, NH-arilo o un halógeno (F, Cl, Br o I); R_5 y R_6 son H, cadenas alquílicas o arílicas, anillos aromáticos, heterociclos, o forman parte de un mismo heterociclo; y n varía entre 0 y 1.

35



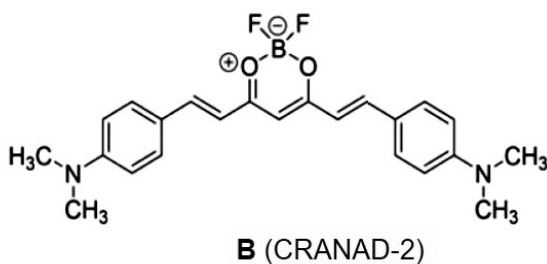
Fórmula general I

El procedimiento general de preparación de los compuestos de fórmula I se muestra en el Esquema general 1. Sobre un compuesto precursor de quinolina, de fórmula general II, se añade trifluoruro de boro dietil eterato y tolueno anhidro, y se agita la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente, el residuo sólido se lava con éter etílico anhidro y el precipitado oscuro se disuelve en CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lava con agua. En el proceso se observa un cambio de color de azul a rojo oscuro en la capa orgánica. Finalmente, se realiza una evaporación a presión reducida para obtener un compuesto de fórmula general I en forma de sólido de color negro.



Esquema general 1

Entre los diferentes sensores fluorescentes disponibles comercialmente y que emiten fluorescencia en la región del infrarrojo cercano, se eligió como **B** el compuesto CRANAD-2.



Para realizar el estudio del FRET entre **(A)** y CRANAD-2 **(B)** en presencia de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo, en primer lugar se obtienen los espectros de excitación de y emisión de fluorescencia de disoluciones de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ (según la proteína a estudiar) en tampón fosfato a las que se adiciona el compuesto **A**, el compuesto **B** o ambos compuestos **A** y **B**.

En presencia de $A\beta$ con plegamiento anómalo, ambos fluoróforos (compuestos **A** y **B**) son capaces de interactuar con la proteína y experimentar un aumento de su fluorescencia, lo que les confiere la capacidad de, por separado, detectar beta amiloide mal plegada. Además, ambos fluoróforos, en presencia de $A\beta$ rica en láminas β , se colocan en el entorno de la proteína y experimentan el fenómeno FRET. La estructura secundaria de la proteína alterada actúa como inductor de proximidad. En ausencia de plegamiento β -amiloide no se produce FRET entre ambos fluoróforos, lo que se traduce en una detección de $A\beta$ seleccionada por FRET.

Cuando el estudio del FRET entre **(A)** y CRANAD-2 **(B)** se realiza en presencia de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo disuelta en plasma humano la respuesta de fluorescencia frente a la concentración de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo se ajusta a una recta para concentraciones de $A\beta$ en el rango de 0 a 120 nM.

Además, el efecto FRET observado posibilita la medida de fluorescencia en la región próxima al infrarrojo cercano (NIR). La radiación NIR del espectro electromagnético es conveniente para fines de diagnóstico por varias razones: penetración más profunda en los tejidos, menor autofluorescencia de biomoléculas, mayor relación señal-ruido y ausencia de radiación nociva. Por lo tanto, el método descrito resulta de utilidad como ensayo de cribado poblacional para la detección de potenciales enfermos de Alzheimer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 415 \text{ nm}$) de los compuestos: **A** en presencia de $A\beta_{40}$; **B** en presencia de $A\beta_{40}$; y del par FRET (compuestos **A** y **B**) en presencia de $A\beta_{40}$. Las flechas indican la modificación en la intensidad de fluorescencia como consecuencia del FRET: (x) 250 nM compuesto **A** + 1 μM $A\beta_{40}$; (y) 250 nM compuesto **B** + 1 μM $A\beta_{40}$; (z) 250 nM compuesto **A** + 250 nM

compuesto **B** + 1 μ M $A\beta_{40}$.

Figura 2. Superposición de los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 415$ nm) de los compuestos: **A** en presencia de $A\beta_{42}$; **B** en presencia de $A\beta_{42}$; y del par FRET (compuestos **A** y **B**) en presencia de $A\beta_{42}$. Las flechas indican la modificación en la intensidad de fluorescencia como consecuencia del FRET: (x) 250 nM compuesto **A** + 1 μ M $A\beta_{42}$; (y) 250 nM compuesto **B** + 1 μ M $A\beta_{42}$; (z) 250 nM compuesto **A** + 250 nM compuesto **B** + 1 μ M $A\beta_{42}$.

10

Figura 3. Cuantificación de agregados de $A\beta_{40}$ en plasma humano fortificado. A) Respuesta de fluorescencia del par FRET con concentraciones crecientes de agregados de $A\beta_{40}$ y detalle para el intervalo de longitud de onda entre 650 nm y 800 nm. B) Señal de fluorescencia neta debida al efecto FRET con agregados de $A\beta_{40}$. La fluorescencia observada para el par FRET en presencia de concentraciones crecientes $A\beta_{40}$ se corrige por sustracción de la señal del par FRET en el seno de plasma humano: (a) Par FRET + 10 % plasma + 0 nM $A\beta_{40}$ (500 nM $A\beta_{40}$, línea base); (b) Par FRET + 10 % plasma + 20 nM $A\beta_{40}$ (520 nM $A\beta_{40}$); (c) Par FRET + 10 % plasma + 40 nM $A\beta_{40}$ (540 nM $A\beta_{40}$); (d) Par FRET + 10 % plasma + 60 nM $A\beta_{40}$ (560 nM $A\beta_{40}$); (e) Par FRET + 10 % plasma + 80 nM $A\beta_{40}$ (580 nM $A\beta_{40}$); (f) Par FRET + 10 % plasma + 100 nM $A\beta_{40}$ (600 nM $A\beta_{40}$); (g) Par FRET + 10 % plasma + 120 nM $A\beta_{40}$ (620 nM $A\beta_{40}$).

20

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

25

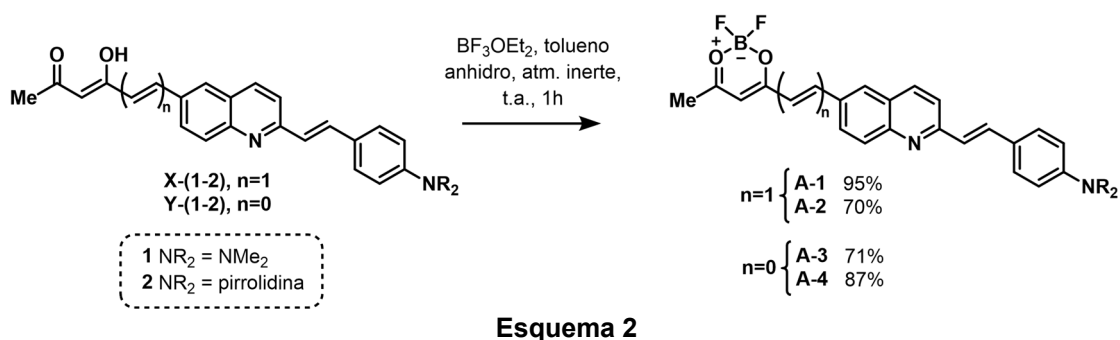
La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

30

Este ejemplo se refiere a la preparación de compuestos de fórmula general I, según el Esquema 2, el cual corresponde a un caso particular del Esquema general 1.

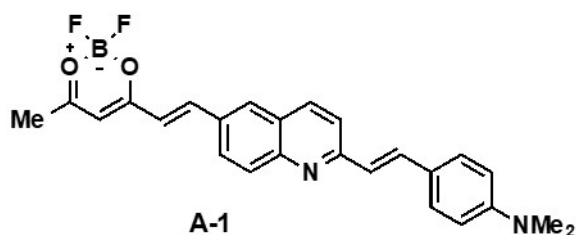
35



El precursor de quinolina correspondiente **X** (17-25 mg, 1 eq) o **Y** (20-35 mg, 1 eq), trifluoruro de boro dietil eterato (3 eq) y tolueno anhidro (5 mL) se añadieron a un matraz de fondo redondo bajo atmósfera inerte y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo sólido se lavó con éter etílico anhidro (2 x 5 mL) y el precipitado oscuro se disolvió en CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con agua (3 x 20 mL). En el proceso, se observó un cambio de color de azul oscuro a rojo oscuro en la capa orgánica. Se añadió Na₂SO₄ anhidro y se filtró, y el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener los correspondientes compuestos **A-1**, **A-2**, **A-3** y **A-4**, que se detallan a continuación, como sólidos negros.

4-((E)-2-(6-((E)-2-(2,2-difluoro-6-metil-2H-1λ³,3,2λ⁴-dioxaborinin-4-yl)vinil)quinolin-2-il)vinil)-N,N-dimetilanilina (**A-1**)

Precursor de quinolina: (E)-6-(2-((E)-4-(dimetilamino)estiril)quinolin-6-il)hex-5-en-2,4-diona (**X-1**), 17 mg. Rendimiento: 95%.

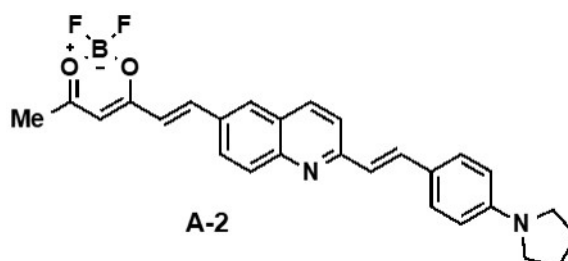


¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.17 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.92 – 7.81 (m, 2H), 7.68 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.75 – 6.66 (m, 3H), 6.03 (s, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.34 (s, 3H). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 191.77, 180.36, 158.95, 151.19, 150.14, 147.82, 136.82, 131.85, 130.87, 130.02, 129.15, 128.88, 127.41, 127.03, 124.30, 123.57, 120.44, 119.99, 112.24, 101.84, 40.39, 24.58. ¹⁹F NMR (235 MHz, CDCl₃) δ(ppm) -139.41, -139.47. P.f.: 240-242 °C. IR: 2909, 1739, 1588, 1517, 1369 cm⁻¹. Análisis elemental (%): calc. para C₂₅H₂₃BF₂N₂O₂: C, 69.46; H, 5.36; N, 6.48; obtenido: C, 69.31; H, 5.11; N, 6.16.

6-((E)-2-(2,2-difluoro-6-metil-2H-1λ³,3,2λ⁴-dioxaborinin-4-il)vinil)-2-((E)-4-(pirrolidin-1-il)estiril)quinolina (A-2)

Precursor de quinolina: (E)-6-(2-((E)-4-(pirrolidin-1-il)estiril)quinolin-6-il)hex-5-en-2,4-diona (X-2), 25 mg. Rendimiento: 70%.

10



15

20

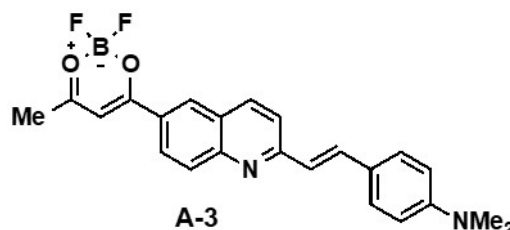
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.18 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.93 – 7.82 (m, 2H), 7.69 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 3.38 – 3.33 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.06 – 2.01 (m, 4H). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 192.02, 180.65, 159.86, 149.06, 148.13, 137.67, 137.13, 132.12, 131.10, 130.14, 129.69, 129.62, 127.78, 127.24, 123.80, 122.92, 120.72, 120.23, 112.21, 102.10, 47.99, 25.90, 24.86. ¹⁹F NMR (235 MHz, CDCl₃) δ(ppm) -139.56, -139.63. P.f. >300 °C. IR: 2910, 1715, 1592, 1513, 1386 cm⁻¹. Análisis elemental (%): calc. para C₂₇H₂₅BF₂N₂O₂: C, 70.76; H, 5.50; N, 6.11; obtenido: C, 70.84; H, 5.18; N, 6.50.

25

(E)-4-(2-(6-(2,2-difluoro-6-metil-2H-1λ³,3,2λ⁴-dioxaborinin-4-il)quinolin-2-il)vinil)-N,N-dimetilanilina (A-3)

Precursor de quinolina: (Z)-4-(2-((E)-4-(dimetilamino)estiril)quinolin-6-il)-4-hidroxibut-3-en-2-ona (Y-1), 20 mg. Rendimiento: 71%.

30



35

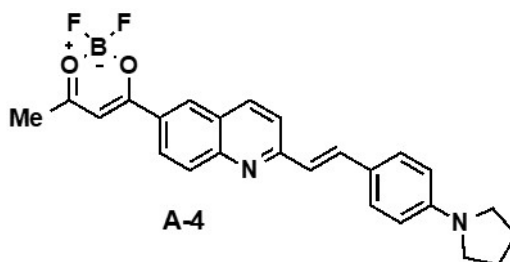
40

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 8.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.17 – 8.03 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 3.04 (s, 6H), 2.44 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 192.30, 181.89, 160.50, 151.62, 151.41, 138.06, 137.66, 131.34, 129.83, 129.41, 127.70, 127.58, 126.44, 124.10, 123.17, 121.02, 112.23, 97.78, 40.38, 24.98. ¹⁹F NMR (235 MHz, CDCl₃) δ(ppm) -139.25, -139.31. P.f. >300 °C. IR: 2919, 1738, 1526, 1381 cm⁻¹. Análisis elemental (%): calc. para C₂₃H₂₁BF₂N₂O₂: C, 68.00; H, 5.21; N, 6.90; obtenido: C, 68.03; H, 5.47; N, 6.89.

Información de (E)-6-(2,2-difluoro-6-metil-2H-1λ³,3,2λ⁴-dioxaborinin-4-il)-2-(4-(pirrolidin-1-il)stiril)quinolina (A-4)

- 5 Precursor de quinolina: (Z)-4-hidroxi-4-(2-((E)-4-(pirrolidin-1-il)estiril)quinolin-6-il)but-3-en-2-ona (Y-2), 35 mg. Rendimiento: 87%.

10



- 15 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.17 – 8.01 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.41 – 3.31 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.08 – 2.00 (m, 4H). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 192.18, 181.83, 160.60, 151.64, 148.95, 138.42, 137.57, 131.33, 129.73, 129.62, 127.69, 127.40, 126.36, 123.35, 122.39, 121.00, 111.96, 97.75, 47.72, 25.62, 24.97. ¹⁹F NMR (235 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 20 -139.26, -139.32. P.f. >300 °C. IR: 2913, 1728, 1598, 1550, 1389 cm⁻¹. Análisis elemental (%): calc. para C₂₅H₂₃BF₂N₂O₂: C, 69.46; H, 5.36; N, 6.48; obtenido: C, 69.65; H, 5.63; N, 6.55.

Ejemplo 2

25

En este ejemplo se detalla la preparación del compuesto **A-3**.

Los reactivos y disolventes utilizados (*Sigma Aldrich*, *Thermo Fischer*, *Alpha Aesar*, *Scharlau*) fueron de calidad comercial y empleados sin tratamiento previo.

30

- Se mezclaron 2-metilquinolina-6-carboxilato de etilo (1000 mg, 1 eq), 4-dimetilaminobenzaldehído (1,1 eq), cloruro de zinc (0,05 eq) y anhídrido acético (2,5 mL) en un vial y la reacción se introdujo en un reactor de microondas focalizadas, calentándose a 150 °C durante 35 minutos. La mezcla de reacción se disolvió en 35 CH₂Cl₂ (20 mL) y se neutralizó con 20 mL de una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se separó y la acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, y el filtrado se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante

cromatografía en columna con un gradiente de hexano:acetato de etilo (75:25) para obtener (*E*)-2-(4-(dimetilamino)estirilo)quinolina-6-carboxilato con un 55% de rendimiento.

5 En un matraz de fondo redondo, sumergido en un baño de hielo y bajo atmósfera inerte de argón, se mezclaron 8,66 mL de una disolución 1.0 M de diisopropilamiduro de litio (6 eq) en THF/hexanos y 0,37 mL de acetoacetato de etilo (2 eq) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadió una disolución de (*E*)-2-(4-(dimetilamino)estirilo)quinolina-6-carboxilato (500 mg, 1 eq) en THF anhidro (18 mL) y
10 la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en atmósfera inerte. Para cortar la reacción, se añadió lentamente una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (40 mL). Se realizó una extracción con acetato de etilo (3 x 40 mL), se añadió Na₂SO₄ anhidro y se filtró, y el filtrado se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna con un gradiente de hexano:acetato de etilo (50:50) para
15 obtener (*Z*)-5-(2-((*E*)-4-(dimetilamino)estiril)quinolin-6-il)-5-hidroxi-3-oxopent-4-enoato de etilo con un 40% de rendimiento.

El producto de la reacción anterior (240 mg, 1 eq), cloruro de litio (4 eq), agua (2,4 eq) y DMF anhidro (2 mL) se añadieron a un vial de microondas, en el que se creó una
20 atmósfera inerte cebándolo con argón. El vial se introdujo en el reactor de microondas durante 2,5 h a 100 °C. La mezcla resultante, una vez enfriada, se disolvió en CH₂Cl₂ (20 mL) y se lavó con agua (3 x 20 mL); se añadió Na₂SO₄ anhidro a la fase orgánica, se filtró y se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna con un gradiente de hexano:acetato de etilo (50:50) para
25 obtener (*Z*)-4-(2-((*E*)-4-(dimetilamino)-estirilo)quinolin-6-il)-4-hidroxibut-3-en-2-ona con un 36% de rendimiento.

El producto de la reacción anterior (20 mg, 1 eq), trifluoruro de boro dietil eterato (3 eq) y tolueno seco (5 mL) se añadieron a un matraz de fondo redondo bajo atmósfera
30 inerte y la mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo sólido se lavó con éter etílico seco (2 x 5 mL) y el precipitado oscuro se disolvió en CH₂Cl₂, que se lavó con agua (3 x 20 mL); en el proceso, se observó un cambio de color de azul oscuro a rojo oscuro en la fase orgánica. Se añadió Na₂SO₄ anhidro y se filtró, y el filtrado se evaporó a presión
35 reducida para obtener el compuesto **A-3** con un 71% de rendimiento.

Ejemplo 3

En este ejemplo se muestra la preparación de agregados A β ₄₀ y A β ₄₂.

5

Sobre un vial comercial que contiene A β ₄₀ liofilizada en TFA (1.0 mg) (rPeptide Cat. no. A-1001-2) fueron añadidos 30 μ L de una solución acuosa de hidróxido amónico al 30% y 890 μ L de PBS. Esta solución tiene una concentración de beta amiloide de 250 μ M en una solución de hidróxido amónico al 1% en PBS, y fue diluida para obtener una concentración de 25 μ M en PBS añadiendo 9 mL de PBS. Posteriormente, la mezcla fue agitada durante tres días a temperatura ambiente para obtener los agregados de A β ₄₀. Esta solución contiene 25 μ M de agregados de A β ₄₀ en PBS. Para verificar la correcta formación de los agregados de A β ₄₀ se realizó un ensayo de fluorescencia con Tioflavina T (ThT) (λ_{ex} = 430 nm, λ_{em} = 480-490 nm, utilizando PBS, 500 nM de ThT y 500 nM de agregados A β ₄₀) y se observó un aumento significativo de la fluorescencia de Tioflavina T (alrededor de 5 veces, antes de restar la señal de fondo) tras interaccionar los agregados de A β ₄₀.

10
15

Sobre un vial comercial que contiene A β ₄₂ liofilizada en TFA comercial (1.0 mg) (rPeptide Cat. no. A-1002-2) fueron añadidos 29 μ L de una solución acuosa de hidróxido amónico al 30% y 851 μ L de PBS. Esta solución tiene una concentración de beta amiloide de 250 μ M en una solución de hidróxido amónico al 1% en PBS, y fue diluida para obtener una concentración de 25 μ M en PBS añadiendo 7,92 mL de PBS. Posteriormente, la mezcla fue agitada durante tres días a temperatura ambiente para obtener los agregados de A β ₄₂. Esta solución contiene 25 μ M de agregados de A β ₄₂ en PBS. Para verificar que los agregados se habían formado correctamente, se realizó un ensayo de fluorescencia de ThT de la misma manera descrita para los agregados de A β ₄₀.

20
25

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro FluoroMax-4P con software FluorEssence 2.1. (Horiba Jobin Yvon). El ancho de rendija empleado fue de 10 nm. Todos los espectros están corregidos por la señal de fondo de PBS.

30

35

Ejemplo 4

Se muestra la caracterización por espectrofluorimetría de los compuestos **A-3** y **B**.

5 Se prepararon disoluciones de **A-3** y de CRANAD-2 en concentración $1,0 \times 10^{-3}$ M. A partir de estas disoluciones “stock” se prepararon disoluciones más diluidas ($1,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-6}$ y $2,5 \times 10^{-7}$ M) para obtener los espectros de fluorescencia. Se obtuvieron los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia tanto de **A-3** como de CRANAD-2 en tampón fosfato (PBS).

10

Ejemplo 5

Estudio del FRET entre **A-3** (A) y CRANAD-2 (B) en presencia de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo.

15

Se prepararon disoluciones de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en tampón fosfato y en concentración $1 \mu\text{M}$. Se tomaron alícuotas de 2 mL de las disoluciones de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ según la proteína a estudiar y se les adicionó el compuesto A en concentración 250 nM. Se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia. En paralelo se tomaron alícuotas de 2 mL de las disoluciones de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ $1 \mu\text{M}$ según la proteína a estudiar y se les adicionó el compuesto B en concentración 250 nM. Se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia.

20

Finalmente se tomaron alícuotas de 2 mL de las disoluciones de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ $1 \mu\text{M}$ según la proteína a estudiar y se les adicionaron los compuestos **A-3** y **B** en concentración 250 nM. Se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia.

25

El compuesto **A-3** en PBS y en presencia de agregados de $A\beta_{40}$, presenta fluorescencia con un máximo, en torno a 575 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 415$ nm) y un aumento significativo respecto a lo observado en ausencia de proteína. Es conocido que el compuesto B, CRANAD-2, con $A\beta_{40}$, cuando se excita a una longitud de onda de 570 nm emite alrededor de 630-640 nm con un hombro en torno a 700 nm. Por otra parte, cuando se excita el compuesto B a la longitud de onda de excitación del compuesto **A-3** ($\lambda_{\text{ex}} = 415$ nm), no emite fluorescencia significativa en presencia $A\beta_{40}$. En

35

disoluciones independientes de los compuestos **A-3** y **B** con agregados de $A\beta_{40}$ se observa un aumento de la fluorescencia y el desplazamiento de los máximos de emisión de ambos compuestos, lo que demuestra su interacción y su unión a beta amiloide mal plegada específicamente para cada uno de ellos.

5

La disolución de los compuestos **A-3** y **B** en PBS y en presencia de agregados de $A\beta_{40}$, muestra un máximo de emisión a $\lambda_{em} = 575$ nm ($\lambda_{ex} = 415$ nm) para el compuesto **A-3** con un solapamiento significativo con el espectro de excitación del compuesto **B** ($\lambda_{ex} = 596$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm), de este modo se satisface uno de los requisitos para la transferencia de energía (donador-aceptor) implicada en el fenómeno FRET. El entorno de la $A\beta_{40}$ posibilita la colocalización de los sensores y la proximidad espacial de ambos, satisfaciendo así otro de los requisitos (distancia de 1-10 nm) necesarios para la existencia de FRET.

10

Así en presencia de agregados de $A\beta_{40}$, la mezcla de compuestos **A-3** y **B** excitados en los máximos de excitación del compuesto **A-3** ($\lambda_{ex} = 415$ nm) muestra un espectro de emisión diferente al de los compuestos **A-3** o **B** por separado, y también diferente a la suma de ambos espectros de emisión, correspondiendo a la emisión de fluorescencia del par FRET que desencadena dicho fenómeno. En estas condiciones, se observa en el espectro de emisión de fluorescencia, una disminución de la intensidad de emisión en las longitudes de onda más cortas correspondientes a la fluorescencia del compuesto **A-3**, y un aumento en la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda más largas correspondientes al compuesto **B**, lo que demuestra una transferencia de energía del compuesto **A-3** al compuesto **B** (Figura 1).

20

25

El comportamiento descrito anteriormente para $A\beta_{40}$ es similar cuando se realiza el estudio con agregados de $A\beta_{42}$: ambos sensores, **A-3** y **B**, se unen a agregados de $A\beta_{42}$ y presentan un notable solapamiento espectral. Los compuestos **A-3** y **B** con agregados de $A\beta_{42}$ muestran en el espectro de emisión de fluorescencia, al excitar a $\lambda_{ex} = 415$ nm, una disminución de la señal en la región de 570 nm y un aumento de la intensidad de emisión fluorescente en el intervalo de longitudes de onda comprendidas entre 675 nm y 750 nm, lo que evidencia, en el caso de $A\beta_{42}$, (Figura 2) el proceso de transferencia de energía entre los compuestos **A-3** y **B**.

30

Al igual que con $A\beta_{40}$, el espectro de excitación del compuesto **B** con agregados de

35

$A\beta_{42}$ presenta un mínimo de emisión en torno a 415 nm, y esta es la longitud de onda de excitación del compuesto **A-3**. Este hecho garantiza que cuando se utiliza esta longitud de onda de excitación para **A-3**, si se observa la emisión de **B**, en la región de 670-730 nm se debe exclusivamente a la transferencia de energía vía FRET, ya que

5 **A-3** posee un máximo de emisión de notable intensidad en torno a 565 nm, utilizándose la energía correspondiente a esta radiación emitida para excitar a **B**. Se demuestra la idoneidad de este par de compuestos para la detección selectiva de FRET en presencia de β -amiloide con plegamiento beta anómalo. Cabe señalar, además, que el FRET se produce selectivamente en presencia agregados de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, sin

10 embargo, como se aprecia en las Figuras 2 y 3, el desplazamiento en los máximos de emisión como consecuencia del FRET así como las variaciones en la intensidad de fluorescencia (incremento o descenso) son diferentes según se trate de $A\beta_{40}$ o de $A\beta_{42}$.

Ejemplo 6

15

Preparación de las muestras de plasma humano.

Las muestras de plasma humano obtenidas de individuos sanos y exentos de cualquier patología, se sometieron a centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante resultante se tomó y se transfirió a tubos nuevos. En este experimento,

20 varias muestras de sangre se procesaron juntas y se mezclaron tras la centrifugación y la separación para obtener un conjunto de muestras homogeneizadas con el fin de reducir la variabilidad debida a las diferencias interindividuales entre individuos sanos

Ejemplo 7

25

Este ejemplo se refiere a la determinación de $A\beta$ en muestras fortificadas de suero humano mediante el par FRET de los señores **A-3** y **B**.

30 Se prepararon disoluciones que contenían los sensores del par FRET **A-3** - **B**, plasma humano en concentración final del 10%, y 500 nM de agregados de $A\beta_{40}$, y se midió su fluorescencia. A las disoluciones anteriores se añadieron concentraciones pequeñas, conocidas y crecientes de agregados de $A\beta_{40}$, se dejaron estabilizar y se leyó su fluorescencia. El resultado fue una disminución de la fluorescencia en la región

35 de 600-670 nm, correspondiente principalmente a la fluorescencia del compuesto

donador **A-3**, y un aumento de la intensidad de fluorescencia en la región de 740-780 nm, correspondiente a la fluorescencia del compuesto **B** unido a beta amiloide con plegamiento anómalo, lo que demuestra el FRET en presencia de A β ₄₀ (Figura 3) y en el entorno de una matriz biológica de plasma humano.

5

Al cuantificar y procesar las intensidades de emisión de fluorescencia a las dos longitudes de onda de emisión correspondientes al donador **A-3**, $\lambda_{em} = 640$ nm y al aceptor **B**, $\lambda_{em} = 750$ nm, empleando siempre y para la medida simultánea $\lambda_{ex} = 415$ nm, se obtiene una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de agregados de A β ₄₀ con un buen ajuste a un modelo de regresión lineal (Tabla 1).

10

Tabla 1

	<i>Aβ₄₀ anormalmente plegada</i>		<i>Aβ₄₂ anormalmente plegada</i>	
	$\lambda_{em} = 640$ nm	$\lambda_{em} = 750$ nm	$\lambda_{em} = 645$ nm	$\lambda_{em} = 780$ nm
<i>R² (r)</i>	0,9833 (0,9916)	0,9727 (0,9863)	0,9421 (0,9706)	0,9503 (0,9748)
<i>Pendiente</i>	-3251	165,6	-3677	162,1
<i>Ordenada</i>	4297391	488396	3882586	267820
<i>LOD (nM)</i>	12,62	16,20	23,98	22,12
<i>LOQ (nM)</i>	42,05	54,00	79,94	73,72

15

Así se determinó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), tanto a $\lambda_{em} = 640$ nm (relacionando la disminución de la fluorescencia del compuesto **A-3**, donador FRET con la concentración creciente de proteína A β ₄₀ anormalmente plegada) como a $\lambda_{em} = 750$ nm (relacionando el aumento de la fluorescencia del compuesto **B**, aceptor FRET con la concentración creciente de proteína A β ₄₀ anormalmente plegada). Se obtuvo una buena respuesta lineal entre las intensidades de fluorescencia y la concentración (Tabla 1). Cabe destacar que este fenómeno se produce en una disolución que contiene un 10% de plasma humano, con 6-8 mg/mL de proteínas (seroalbúmina y globulinas, principalmente) distintas de A β ₄₀. El rango lineal estudiado (0-120 nM de A β ₄₀) así como los valores de LOD obtenidos hacen que pueda detectarse A β ₄₀ con plegamiento anómalo dentro de una matriz biológica y clínicamente relevante. En paralelo se realizaron experimentos análogos a los anteriores para agregados de A β ₄₂ en muestras de plasma humano a las que se adicionó agregados de A β ₄₂ en concentraciones comprendidas entre 0-120 nM. Los resultados son similares a los obtenidos con A β ₄₀: hay una disminución significativa de la señal a $\lambda_{em} = 645$ nm y un aumento de la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{em} = 780$

20

25

30

nm, consecuencia del efecto FRET. Se comprobó que estos cambios en la fluorescencia mantenían una relación lineal con la concentración de $A\beta_{42}$ con un ajuste adecuado a un modelo lineal, y se determinó el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (Tabla 1). Puede detectarse $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo dentro de una matriz real de plasma humano con una concentración muy superior de proteínas séricas (seroalbúmina y globulinas) que de la proteína objeto de estudio.

Ejemplo 8

En este ejemplo se muestra el análisis estadístico de los datos obtenidos para el establecimiento de un modelo de la concentración de $A\beta$ en función de la respuesta de fluorescencia.

El procesamiento de datos, cálculos y elaboración de gráficas se hizo con el software *GraphPad Prism 8*. El análisis estadístico “*t de Student*” se hizo con el software *GraphPad Prism 8*.

La señal FRET del par **A-3** - **B** no produce una respuesta lineal a bajas concentraciones de agregados de $A\beta$, pero sí lo hace tras añadir una cantidad mínima de agregados de $A\beta$. Esta concentración de $A\beta$ se toma como base a partir de la cual se estudia si existe respuesta lineal entre la intensidad de fluorescencia del par FRET y la concentración de proteína con plegamiento anómalo. La concentración de beta amiloide necesaria para observar el FRET es de 500 nM. Se prepararon muestras que contenían el par FRET A-B en tampón fosfato (PBS) con una solución de plasma humano al 10%. Las muestras contenían 100 nM de compuesto **A-3**, 1000 nM de compuesto **B** y 10% de plasma en PBS. Estas muestras se incubaron hasta la estabilización de la señal de fluorescencia (30 min) y se leyó su fluorescencia. A continuación, se añadieron agregados de $A\beta_{40}$ (concentración final de 500 nM que se toma como punto de partida para las medidas), se incubaron las muestras hasta la estabilización de la señal de fluorescencia (10 min) y se midió la fluorescencia. Sobre estas muestras, se añadieron volúmenes pequeños de la disolución de agregados de $A\beta_{40}$, para lograr concentraciones conocidas y crecientes de agregados de $A\beta_{40}$, y se registró la fluorescencia con cada adición de agregados de $A\beta_{40}$ tras la estabilización de la muestra (10 minutos). Las concentraciones de proteína β -amiloide en las disoluciones medidas fueron 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 nM. Se siguió el mismo procedimiento en el caso de los agregados de $A\beta_{42}$. Se realizaron cuatro réplicas de

cada uno de los experimentos con el fin de promediar los valores y aportar una significación estadística a los mismos.

5 Las concentraciones crecientes de agregados de A β fueron bajas para asegurar la respuesta lineal, y el volumen total añadido se mantuvo por debajo del 1% del volumen total de la muestra para garantizar que no se produjera ninguna alteración de las concentraciones ni en el valor de la intensidad de fluorescencia medida como consecuencia de la dilución.

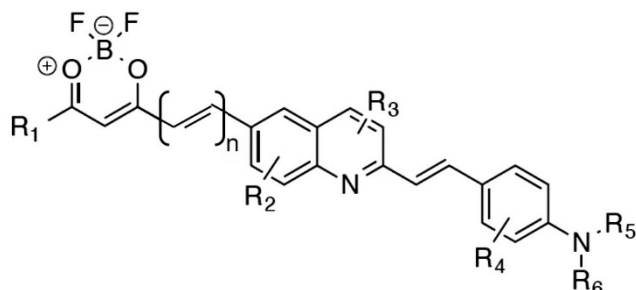
10 El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon realizando un ajuste lineal de la respuesta de fluorescencia frente a la concentración de A β mal plegado. Se obtuvo una ecuación ($Y = \text{pendiente} \cdot X + Y_0$). El LOD y el LOQ se calcularon de acuerdo con las siguientes expresiones.

15 $LOD = Y_0 + 3 \times \text{desviación estándar } (Y_0)$
 $LOQ = Y_0 + 10 \times \text{desviación estándar } (Y_0)$

REIVINDICACIONES

1. Compuestos derivados de difluorodioxaborinino y estililquinolina de fórmula I,

5



10

I

15

donde R₁ es un sustituyente alquilo o anillos aromáticos, carbocíclicos o heterocíclicos; R₂, R₃ y R₄ son H, OH, O-alquilo, O-arilo, SH, S-alquilo, S-arilo, NH₂, NH-alquilo, NH-arilo o un halógeno (F, Cl, Br o I); R₅ y R₆ son H, cadenas alquílicas o arílicas, anillos aromáticos, heterociclos, o formar parte de un mismo heterociclo; y n varía entre 0 y 1.

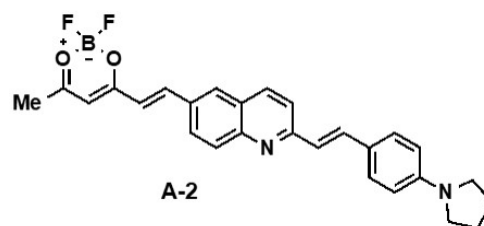
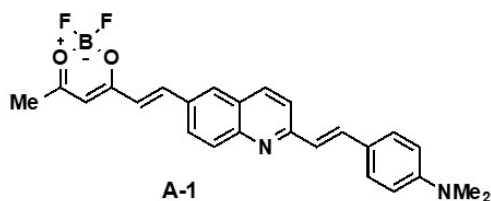
2. Compuestos, según reivindicación 1, donde R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno y R₁, R₅ y R₆ son metilo.

20

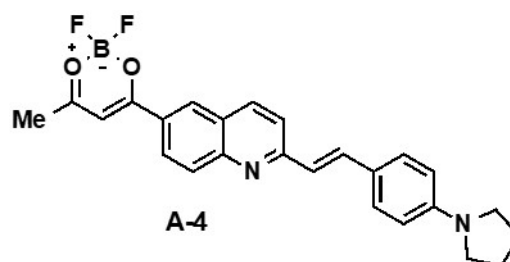
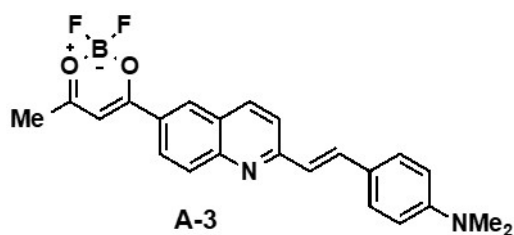
3. Compuestos, según reivindicación 1, donde R₁ es metilo; R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno; y R₅ y R₆ son metilo o forman pirrolidina.

4. Compuestos, según reivindicaciones 2 y 3, de fórmulas A-1, A-2, A-3 y A-4

25



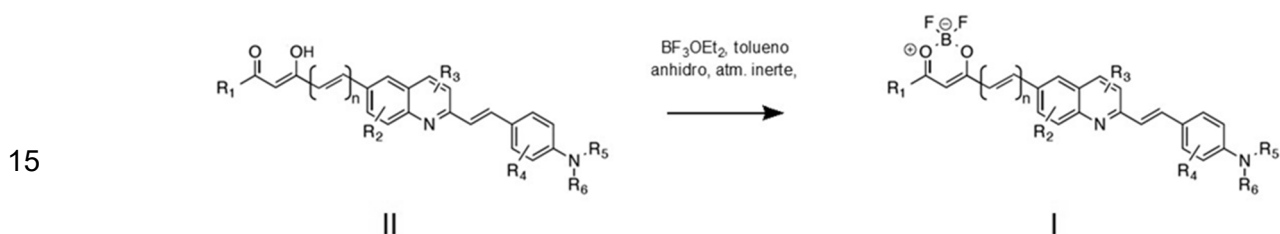
30



35

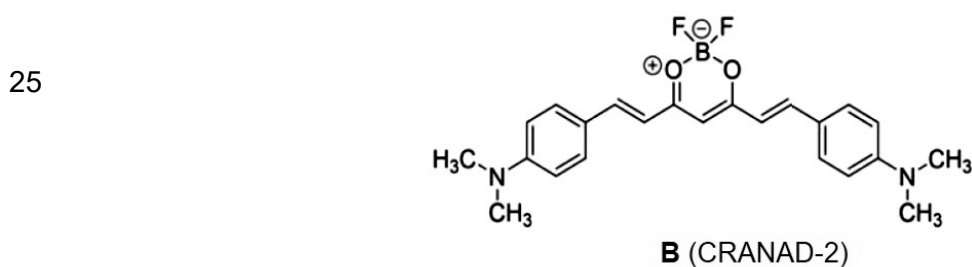
5. Método de preparación de los compuestos de fórmula I, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, a partir de un compuesto de fórmula general II que comprende:

- 5
- Añadir sobre el compuesto de fórmula II trifluoruro de boro dietil eterato y tolueno anhidro
 - Agitar la muestra a temperatura ambiente
 - Lavar el residuo sólido con éter etílico anhidro y disolver el precipitado oscuro en CH₂Cl₂
 - Lavar con agua la fase orgánica
- 10
- Realizar una evaporación a presión reducida para obtener un compuesto de fórmula general I en forma de sólido de color negro



Esquema 1

20 6. Par FRET (fluorescencia por transferencia de energía) formado por un compuesto **A** de fórmula general I y el compuesto de fórmula **B**.



30 7. Par FRET formado, según reivindicaciones 4 y 6, donde el compuesto **A** se elige entre los compuestos de fórmula I por un compuesto de fórmula A-1, A-2, A-3 o A-4.

35 8. Par FRET, según reivindicación 7, donde el compuesto **A** es el compuesto A-3.

9. Uso del par FRET, según reivindicación 6, para la detección de agregados $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ con plegamiento anómalo *in vitro* en muestras de plasma humano enriquecido con proteínas amiloides.
- 5 10. Uso del par FRET, según reivindicaciones 8 y 9, para la detección de agregados $A\beta_{40}$ en concentraciones comprendidas en un rango entre 0 y 120 nM con un límite de detección superior 12 nM y un límite de cuantificación superior a 42 nM.
- 10 11. Uso del par FRET, según reivindicaciones 8 y 9, para la detección de agregados $A\beta_{42}$ en concentraciones comprendidas en un rango entre 0 y 120 nM con un límite de detección superior 22 nM y un límite de cuantificación superior a 74 nM.

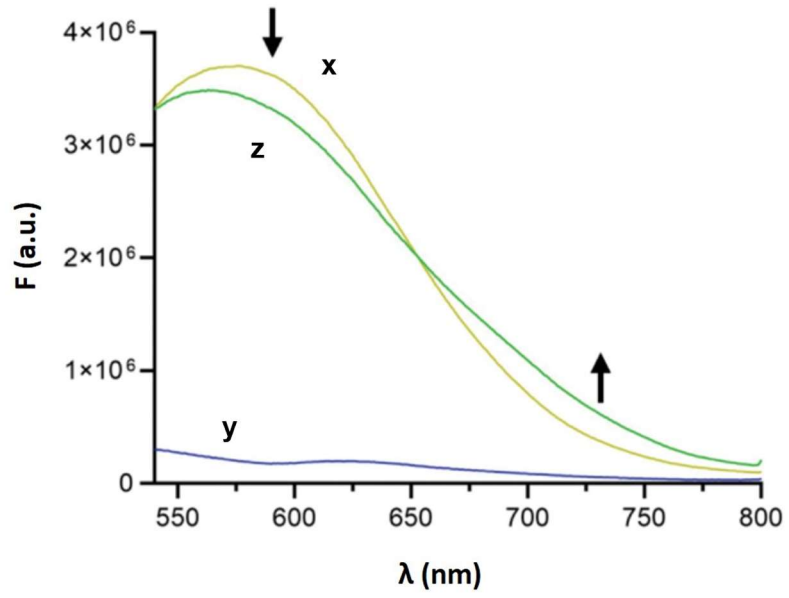


Figura 1

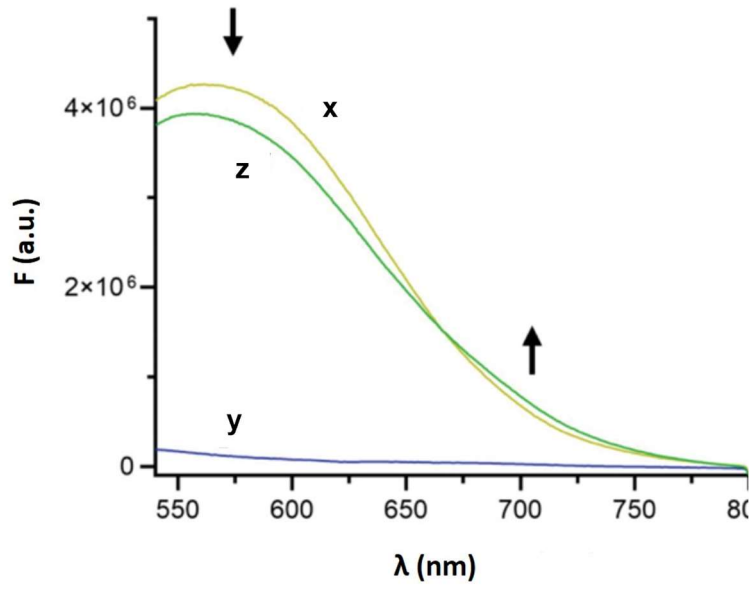
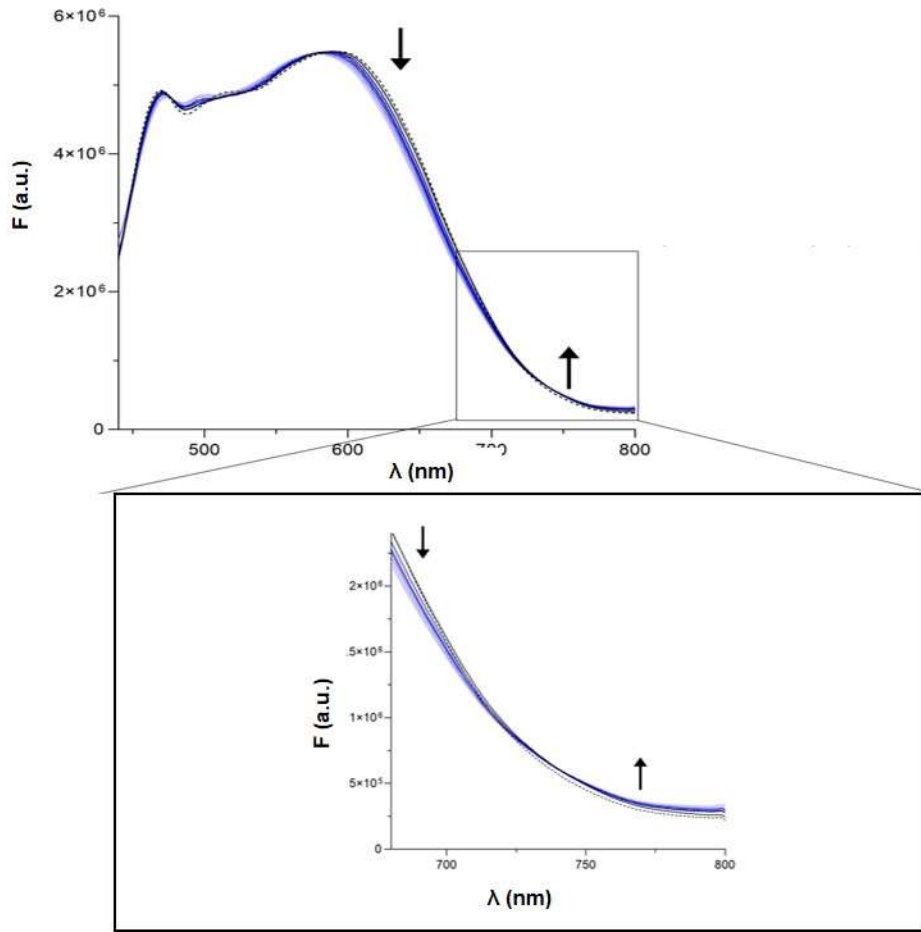
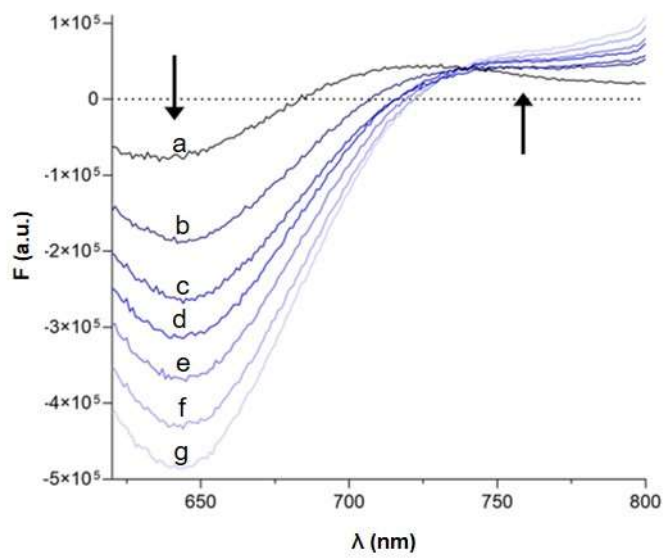


Figura 2



(A)



(B)

Figura 3