

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 986**

51 Int. Cl.:

G01N 33/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2012 PCT/EP2012/072063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14071973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12781125 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2917739**

54 Título: **Método y kit para la determinación de cobre libre en suero**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2018

73 Titular/es:
**CANOX4DRUG S.P.A. (100.0%)
Via C. Colombo Z.I. sn
70010 Capurso (BA), IT**

72 Inventor/es:
**COLABUFO, NICOLA ANTONIO y
SQUITTI, ROSANNA**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 669 986 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit para la determinación de cobre libre en suero

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo método para la determinación de cobre "libre", la parte de cobre en suero no unido estructuralmente a ceruloplasmina, recientemente llamado también cobre "lábil" en suero. En particular a un método con un alto grado de sensibilidad y precisión para la determinación de cobre libre en muestras de suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

La determinación de cobre en suero es de principal importancia en un gran número de enfermedades como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer (EA). La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurológico caracterizado por pérdida de memoria y demencia progresiva. La última forma de aparición de la enfermedad es esporádica y tiene una etiología de enfermedad compleja, con la familiaridad y la edad como los factores de riesgo más ampliamente aceptados. La causa de la enfermedad parece muy relacionada con la agregación dentro del cerebro del péptido beta-amiloide (A β) y las proteínas tau en ovillos neurofibrilares. Además, se ha probado que el alelo épsilon 4 del gen de la apolipoproteína E (APOE) incrementa el riesgo de enfermedad de Alzheimer y disminuye la edad de aparición, aunque representa solamente un porcentaje de heredabilidad de la enfermedad de Alzheimer, conduciendo a varios factores de riesgo genético a identificar. La "cascada amiloide", la cual se ha reivindicado como la hipótesis de Alzheimer más popular, hoy en día ha tomado muchas formas ya que surgen nuevos detalles sobre la enfermedad. De hecho, se ha postulado que las diversas rutas patógenas contribuyen a la aparición y la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, aparte de los oligómeros A β y los agregados tau tóxicos, se han señalado el daño oxidativo, la inflamación aberrante o el metabolismo de energía dañado entre las rutas patógenas implicadas en la cascada de la enfermedad a las que es necesario dirigirse. Hay abundante evidencia de que el estrés oxidativo, principalmente por reacciones redox de metal, pueden causar daño al cerebro con enfermedad de Alzheimer. Específicamente, se ha propuesto que la hipermetalización del péptido A β puede ser la base de los ciclos redox de estrés oxidativo y la producción de H₂O₂, formación de oligómero A β y precipitación. Un desarreglo de la homeostasis de metal que conduce a un pool lábil de cobre puede suministrar la reserva de cobre del cerebro que puede entrar en los ciclos de estrés oxidativo de A β , generando efectos pleiotrópicos sobre la cascada de la enfermedad de Alzheimer. Esta idea ahora está respaldada por varias líneas de evidencia que muestran que el cobre está ligeramente pero significativamente incrementado en la enfermedad de Alzheimer, que un incremento alto específico y relativo en el pool en suero de cobre no unido a ceruloplasmina (también llamado cobre "libre"), está asociado con algunas señales típicas y marcadores del fluido cerebroespinal de la enfermedad de Alzheimer y es ya evidente en sujetos que se quejan de deterioros cognitivos muy leves. Aunque la disfunción del cobre no se puede asumir como el único determinante de la enfermedad, se puede reivindicar su papel causativo, además de asociado, como factor de riesgo importante para la enfermedad de Alzheimer, puesto que parece respaldado por evidencias sólidas, clínicas, epidemiológicas, experimentales de metaanálisis y genéticas.

La ceruloplasmina es la principal proteína portadora de cobre en la sangre, es la principal proteína ferroxidasa en suero, y une estructuralmente 6 átomos de cobre, para formar una holoforma activa de la proteína, la cual puede representar el 85 a 95 % del cobre circulante, siendo el resto cobre libre. De hecho, en estudios anteriores los inventores usaron para estimular el cobre libre partiendo de medidas de cobre y ceruloplasmina, con el cálculo como sigue: la concentración de cobre en suero se comprobó dos veces midiéndolas o bien con la técnica de espectroscopía de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica A Analyst 300 de Perkin Elmer equipado con un horno de grafito con plataforma HGA 800, o según el método colorimétrico de Abe y col. *Clin. Chem.* 1989 (Randox Laboratories, Crumlin, GB); la ceruloplasmina se analizó por el ensayo de inmunoturbidimetría (Horiba ABX, Montpellier, Francia) según *Wolf Pl. Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 1982, para cada par de cobre y ceruloplasmina en suero se ha informatizado la cantidad de cobre unido a ceruloplasmina (CB) y la cantidad de cobre no unido a ceruloplasmina (cobre "libre") siguiendo los procedimientos estándar descritos en Walsh y col. *Ann. Clin. Biochem.* 2003. Este cálculo expresa el cobre "libre" en $\mu\text{mol/l}$ y se basa en la evidencia de que la ceruloplasmina contiene 0,3 % de cobre.

Además, recientemente los inventores han establecido un procedimiento automatizado para medir la actividad oxidada de la ceruloplasmina que utiliza un dihidrocloruro de o-diansidina como sustrato, según los métodos anteriores. De hecho, es bien conocido que los valores de ceruloplasmina obtenidos inmunológicamente, como los mostrados en nuestros estudios anteriores, dan como resultado valores mayores que los obtenidos enzimáticamente, es decir, haciendo un seguimiento de la actividad oxidada de la proteína. Esto es debido a que la apoforma de la ceruloplasmina es biológicamente inactiva. Como consecuencia se subestiman los valores de cobre libre derivados por el método y el cálculo informados anteriormente.

Sin embargo, se ha considerado en el estado de la técnica la cuantificación de la ceruloplasmina por el método enzimático basado en soluciones de ceruloplasmina patrón, debido a su coste, la pureza variable de la ceruloplasmina comercialmente disponible y la recomendación general de informar las enzimas en suero en

Unidades Internacionales (UI). Previamente los inventores han tratado de cuantificar la cantidad de ceruloplasmina partiendo de la actividad oxidasa de la proteína con un patrón comercial (Ceruloplasmina en Suero Humano, Sigma-Aldrich), pero la inspección espectroscópica de lo último reveló un declive en el pico proteico de absorbancia en los ensayos de día a día, disminuyendo la confianza en el uso de la detección enzimática para cuantificar la cantidad proteica, necesaria para estimar el valor de cobre libre.

Hyo Sung Jung y col. (*J. Am. Chem. Soc.* 2009) describió la síntesis y el uso de diferentes sondas de cumarina para la determinación de cobre libre en sistemas biológicos.

Zhaojaun Zhou y col (*Analytica chimica Acta Elsevier* vol. 702 2011) describe la determinación de cobre libre en muestras de suero por medio de un colorante de cumarina.

Sara Thorslund y col. (*Biomedical microdevices*, 2006) describe el microsistema para la filtración de sangre completa sobre chip optimizada por la detección de esteroide.

El alcance de la presente invención es proporcionar nuevos métodos y kits para medir directamente el cobre libre en suero evitando la subestimación o sobreestimación del cobre libre que se da en los métodos de la técnica anterior.

Compendio de la invención

La invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación de cobre libre en suero. Como también se muestra en los ejemplos, los inventores encontraron que al usar varios métodos para separar el suero de la sangre completa se da una pérdida de cobre libre entre 10 % y 20 %. Además, los inventores encontraron que al usar diferentes sondas fluorescentes aptas para unir cobre, se da interacción no específica entre las sondas y el suero.

La invención descrita en el presente documento se basa en la selección de varios parámetros para separar el suero de la sangre completa usando una membrana filtro y la selección de una clase específica de sonda fluorescente de apagado para detectar cobre libre. El uso de sonda fluorescente de cumarina bajo las condiciones fijadas por la presente solicitud permite la determinación de cobre libre en muestras de sangre con un alto grado de precisión y sensibilidad evitando la pérdida de cobre libre durante la separación del suero de la sangre completa.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es un método *in vitro* para determinar la concentración de cobre libre en una muestra de sangre según la reivindicación 1.

Un objetivo adicional de la invención es un método *in vitro* para determinar la concentración de cobre libre para la confirmación de un diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer que comprende las mismas etapas a) y b) y una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una concentración mayor de cobre libre confirma el diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer.

Un objetivo adicional de la invención es un método *in vitro* para determinar la concentración de cobre libre para la prognosis de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en el que las etapas a) y b) del método se repiten sobre muestras de sangre de dicho paciente recogidas en momentos posteriores y evaluando la progresión en el tiempo de la concentración del cobre libre en las muestras de suero de dicho paciente.

Un objetivo adicional de la invención es un método *in vitro* para determinar la concentración de cobre libre para la predicción de la conversión desde deterioro cognitivo leve (MCI) a enfermedad de Alzheimer en un paciente que padece de deterioro cognitivo leve que comprende las mismas etapas a) y b) y una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una mayor concentración de cobre libre indica la conversión desde deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer.

Descripción de las figuras

Figura 1. Curva de calibración de la sonda fluorescente de cumarina 7-(Dietilamino)-2-oxo-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromeno-3-carboxamida en presencia de Cu^{++} (10^{-4} M) en HEPES:DMSO 9:1 ($\lambda_{\text{ex}}=430$ nm, λ_{em} 490 nm).

Figura 2. Curva de calibración de la sonda fluorescente de cumarina 7-(Dietilamino)-2-oxo-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromeno-3-carboxamida en presencia de Cu^{++} (10^{-5} M) con HEPES:DMSO 95:5 ($\lambda_{\text{ex}}=430$ nm, λ_{em} 495 nm).

Figura 3. Curva de la característica operativa del receptor (ROC). Se han analizado 702 muestras según una realización de la presente invención. La curva muestra que usando la presente invención se puede obtener un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer con alta especificidad (80 %) y sensibilidad discreta (60 %).

La Figura 4 muestra un dispositivo filtro para su uso en una realización de la presente invención.

Figura 5. Modelo para predecir la probabilidad de empeoramiento del Mini Examen de Estado mental en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer según los niveles de cobre libre en suero. El círculo representa el valor de cobre libre en suero de los pacientes. La línea representa el modelo de la probabilidad prevista de empeoramiento de Mini Examen de Estado Mental E. Los niveles de cobre libre en pacientes con la enfermedad de Alzheimer se expresan en puntuación z, es decir, en términos de desviaciones estándar de su

valor medio. Aquellos pacientes del panel de estudio actual que tenían una puntuación z mayor de -0,138, correspondiente a un valor de cobre libre de 2,1 $\mu\text{mol/l}$, tenían una probabilidad incrementada de empeorar que aquellos pacientes que tenían valores de cobre "libre" por debajo de tales niveles.

Figura 6. El cobre libre distingue sujetos con deterioro cognitivo leve de controles sanos y pacientes con Alzheimer. Cuando también se consideraba el grupo de enfermedad de Alzheimer, el cobre y el cobre libre mostraban un gradiente claro de pacientes sanos a con enfermedad de Alzheimer pasando por sujetos con deterioro cognitivo leve. Este gradiente era más evidente para cobre libre (eta-cuadrado=14,5 %) que para cobre total (eta-cuadrado=4,9 %), debido al incremento brusco de cobre libre en el grupo con enfermedad de Alzheimer (Squitti y col *Journal Alz. Disease* 2011).

Figura 7. El cobre libre también puede predecir el porcentaje de sujetos que se quejan de deterioro cognitivo leve que desarrollarán diagnóstico completo de demencia por enfermedad de Alzheimer. Los sujetos con deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ tienen un porcentaje mayor de conversión a enfermedad de Alzheimer, es decir, 17 % por año, con respecto a aquellos sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$, es decir, 10 % por año. El análisis estadístico de Kaplan-Meier confirma que los sujetos con deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ tienen una tasa mayor de conversión a enfermedad de Alzheimer que aquellos con cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$, siendo su porcentaje de conversión en enfermedad de Alzheimer entre 24 a 35 % dentro de los primeros dos años, en comparación con 25 a 30 % de aquellos sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$ que se convierten en 3 años y medio. Digno de atención, limitando el análisis a los cinco años de seguimiento, el porcentaje de conversión a enfermedad de Alzheimer en los sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$ es menos del 50 %, mientras que en la cohorte de deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ la mitad de los pacientes se convierten en 4 a 6 años.

Descripción detallada de la invención

Como se indicó previamente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación de la concentración del cobre libre en una muestra de sangre. En la presente descripción el término "cobre libre" significa cobre en la circulación general que no está unido estructuralmente a ceruloplasmina. Recientemente también se llama cobre "lábil", refiriéndose a sus propiedades de estar unido de forma lábil a albúmina, péptidos pequeños, aminoácidos y otros micronutrientes y de ser fácilmente intercambiable entre otras. El cobre libre es un cobre de pequeño peso molecular que fácilmente puede alcanzar tejidos entre los cuales el cerebro, cruzando la barrera cerebral sanguínea también es uno de los siete marcadores utilizados para plantear el diagnóstico clínico de la enfermedad de Wilson, la enfermedad paradigmática para toxicosis o acumulación de cobre.

Para separar el suero de la sangre completa, el método comprende una primera etapa de (a) separación del suero de la sangre completa filtrando la muestra de sangre usando un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro entre 0,1 a 0,5 μm , preferiblemente entre 0,1 a 0,2 μm , más preferiblemente entre 0,1 a 0,15 μm . El filtro de membrana es un filtro de membrana de policarbonato.

La velocidad de filtración está entre 200 y 500 μl por minuto, por ejemplo 250, 300, 350, 400, 450 $\mu\text{l/min}$.

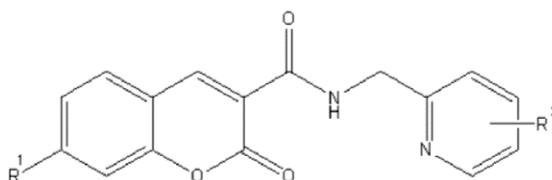
Según una realización de la presente invención el filtro de membrana es un dispositivo filtro. Los ejemplos de dispositivos filtro adecuados para su uso en el método de la presente invención (fig. 4) comprenden una parte inferior 2 que incluye uno o más microcanales, una cubierta 3, en los que dicho filtro de membrana 4 está incorporado dentro de dicha cubierta y sobre dichos microcanales. El filtro de membrana se incorpora en la cubierta antes de que se unan las dos capas juntas.

Según una realización de la presente invención el dispositivo filtro es un dispositivo moldeado en poli(dimetilsiloxano) (PDMS).

Según otra realización de la presente invención el dispositivo filtro es un dispositivo microfluidico descrito en Thorslund S. y col, *Biomed Microdevices* (2006) incorporado en el presente documento como referencia.

Antes de realizar la separación de la etapa a) la muestra de sangre se puede someter a una o más etapas opcionales conocidas en la técnica para obtener una muestra más adecuada para separar el suero de la sangre completa.

El método comprende una segunda etapa de (b) determinación del cobre libre en la muestra de suero obtenida en la etapa (a) usando una sonda fluorescente de cumarina. La sonda fluorescente de cumarina son sondas fluorescentes de quelación para las cuales se podría registrar un declive en la emisión de fluorescencia cuando se une a $[\text{Cu}^{++}]$. La sonda fluorescente de cumarina se puede seleccionar, por ejemplo, de los compuestos que tienen la siguiente fórmula estructural general:



en la que

- 5 R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n de 0 a 5;
 R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo;

Según una realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona del grupo anterior en el que R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n=1 y R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo o bien en posición orto-, para- o meta-.

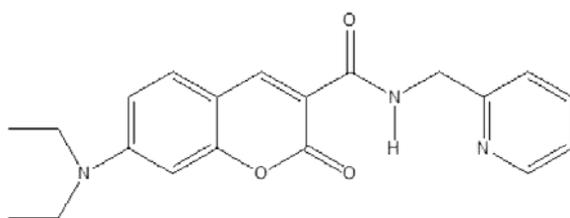
Según otra realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona del grupo anterior en el que R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n=2 y R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo o bien en posición orto-, para- o meta-.

Según otra realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona del grupo anterior en el que R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n=3 y R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo o bien en posición orto-, para- o meta-.

Según otra realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona del grupo anterior en el que R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n=4 y R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo o bien en posición orto-, para- o meta-.

Según otra realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona del grupo anterior en el que R^1 es $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ con n=5 y R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH₃, ciclohexilo o bien en posición orto-, para- o meta-.

Según otra realización de la presente invención dicha sonda fluorescente de cumarina es 7-(Dietilamino)-2-oxo-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromeno-3-carboxamida que tiene la siguiente fórmula estructural:



La sonda fluorescente de cumarina se puede usar, por ejemplo, en disolventes orgánicos como EtOH, MeOH, DMSO mezclados con soluciones tampón como PBS o Hepes. En una realización la sonda fluorescente de cumarina se usa en una solución de HEPES:DMSO.

Las sondas fluorescentes de cumarina se usarán preferiblemente en un intervalo de concentración entre 0,1 y 10 μ M, por ejemplo, 1, 2,5, 5,0, 9 μ M. Los inventores encontraron que en este intervalo hay una correlación directa entre la concentración de cobre libre en la muestra y la emisión de fluorescencia, la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) es, por ejemplo, de 430 nm y la longitud de onda de adsorción (λ_{em}) de 490 nm.

Para determinar la concentración del cobre libre en el suero la etapa b) puede comprender una etapa adicional de preparación de una curva de calibración que une el descenso de fluorescencia con la concentración de cobre libre. Para preparar la curva se pueden usar una o más alícuotas con una concentración conocida de cobre libre. Preferiblemente esta curva estará en el intervalo entre 0,1 y 10 μ M (véase fig. 1).

Como se informó previamente en los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, el cobre en suero no unido a ceruloplasmina (cobre "libre") parece elevado y el incremento, aunque ligero pero normalmente suficiente para distinguir pacientes con enfermedad de Alzheimer de sujetos de edad sanos (también en las fases tempranas de la enfermedad).

Por tanto, es un objetivo de la presente invención un método *in vitro* para la confirmación de un diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer que comprende las mismas etapas a) y b) y una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una mayor concentración de cobre libre confirma el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer.

El valor umbral (corte) del cobre libre se puede determinar, por ejemplo, por medio de curvas ROC (Característica operativa del Receptor) obtenidas procesando las concentraciones de un conjunto de muestras (estadísticamente significativas) de individuos sanos e individuos con enfermedad de Alzheimer. A través de dicho procesamiento se obtuvieron, por ejemplo, ciertos valores umbrales entre 0,5 y 50 μM , por ejemplo, 1, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45.

Preferiblemente dicho método de diagnóstico se usará como un ensayo de confirmación para un diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer con una "disfunción de fenotipo de cobre", la cual es mostrada por aproximadamente el 60 % de los pacientes con enfermedad de Alzheimer con la forma esporádica de la enfermedad.

Como se muestra en Squitti y col., *Neurology* (2009) para hacer un seguimiento de la prognosis de la enfermedad de Alzheimer en un paciente así como para predecir la conversión de deterioro cognitivo leve (deterioro cognitivo leve) a enfermedad de Alzheimer es importante determinar la concentración de cobre libre en el suero de dicho paciente. Específicamente, el cobre libre predice el cambio anual en el Mini Examen de Estado Mental (MMSE), ajustado para el Mini Examen de Estado Mental de referencia por medio de un modelo de regresión lineal: aumentó el 2,4 % de la probabilidad prevista del empeoramiento del Mini Examen de Estado Mental solamente por sexo, edad y educación, a una probabilidad prevista de empeoramiento de Mini Examen de Estado Mental del 23 %: (OR=1,23: 95 % CI=1,03-1,47; $p=0,22$), cuando el cambio anual en el Mini Examen de Estado Mental se dividió en <3 o ≥ 3 puntos; en este caso el cobre libre era el único indicador de una disminución más grave (Figura 5).

La afección clínica de deterioro cognitivo leve se caracteriza por deterioros de memoria, verificable por medidas objetivas, sin conceder aún la definición de demencia. La importancia de un diagnóstico preciso radica en el hecho de que, a pesar de la levedad de la afección, el deterioro cognitivo leve normalmente se considera como un precursor de la enfermedad de Alzheimer. Esto es debido a la alta tasa estadística de progresión desde deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer.

Normalmente la tasa de conversión anual de una condición sana a enfermedad de Alzheimer oscila de 0,17 % a 3,86 %. La tasa de conversión de deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer es notablemente superior, oscilando de 6 % a 40 % dependiendo de las series clínicas. En algunos casos, el deterioro cognitivo leve puede ser una afección benigna, sin progresión en demencia. El cobre libre discrimina los sujetos con deterioro cognitivo leve de los individuos control sanos, como se revela comparando los medios de los dos grupos (Figura 6). El cobre libre también puede predecir el porcentaje de los sujetos que se quejan de deterioro cognitivo leve que desarrollarán diagnóstico completo de demencia por enfermedad de Alzheimer. Los sujetos con deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ tienen un porcentaje mayor de conversión a enfermedad de Alzheimer, es decir, 17 % por año, con respecto a aquellos sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$, es decir, 10 % por año. El análisis estadístico de Kaplan-Meier confirma que los sujetos con deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ tienen una tasa mayor de conversión a enfermedad de Alzheimer que aquellos con cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$, siendo su porcentaje de conversión en enfermedad de Alzheimer entre 24 a 35 % dentro de los primeros dos años, en comparación con el 25 a 30 % de aquellos sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$ se convierten en 3 años y medio. Digno de atención, limitando el análisis a los cinco años de seguimiento, el porcentaje de conversión a enfermedad de Alzheimer en los sujetos con deterioro cognitivo leve con un cobre libre $\leq 1,6 \mu\text{M}$ es menos del 50 %, mientras que en la cohorte de deterioro cognitivo leve con cobre libre $>1,6 \mu\text{M}$ el 50 % de los pacientes se convierten en 4 a 6 años (Figura 7).

Por lo tanto es un objetivo adicional de la presente invención un método *in vitro* para determinar la concentración de cobre libre para la predicción de la conversión desde deterioro cognitivo leve (MCI) a enfermedad de Alzheimer en un paciente que padece de deterioro cognitivo leve que comprende las etapas a) y b) anteriormente descritas y una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una concentración mayor de cobre libre indica la conversión desde deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer. Este valor umbral está, por ejemplo, entre 0,5 y 3 μM , preferiblemente 1,6 μM .

Las etapas a) y b) de dicho método de predicción se pueden realizar según cualquier de las realizaciones de las etapas a) y b) descritas anteriormente.

Un objetivo adicional de la presente invención es un método *in vitro* para la prognosis de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en el que las etapas a) y b) del método según cualquiera de las reivindicaciones de las etapas a) y b) descritas anteriormente se llevan a cabo sobre más muestras de dicho paciente recogidas en diferentes momentos y la cuantificación de los datos obtenidos de cada muestra se comparan unos con otros construyendo así una progresión en el tiempo de la concentración del cobre libre en las muestras de suero de dicho paciente.

También se describe un kit para la detección de cobre libre en suero que comprende uno o más dispositivos filtro con un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro entre 0,1 a 0,5 μm , preferiblemente entre 0,1 a 0,2 μm , más preferiblemente entre 0,1 a 0,15 μm y una o más sondas fluorescentes de cumarina.

5 El dispositivo filtro del kit puede ser cualquiera de los dispositivos filtro descritos en la presente descripción como, por ejemplo, un dispositivo filtro con una parte inferior 2 que incluye uno o más microcanales, una cubierta 3, en el que el filtro de membrana 4 está incorporado dentro de dicha cubierta y sobre dichos microcanales. En el kit se pueden usar cualquiera de los filtros de membrana en combinación con cualquiera de las sondas fluorescentes de cumarina descritas en la presente descripción.

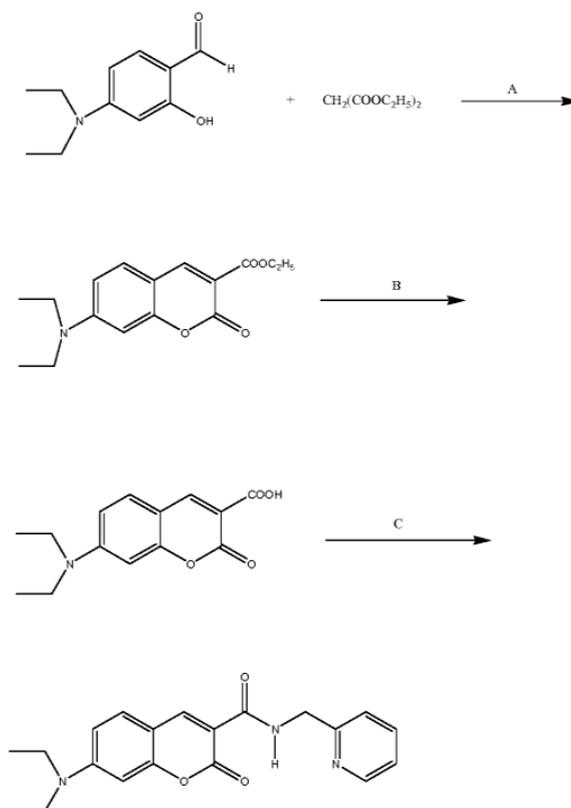
10 También se describe el kit que comprende además una o más alícuotas de controles que tienen una titulación conocida de cobre libre, estos controles se pueden usar para preparar una curva de calibrado.

Ejemplos

15 1. Síntesis de sonda fluorescente de cumarina

La síntesis de la sonda fluorescente de cumarina se llevó a cabo como se informa en Hyo Sung Jung y col. (*J. Am. Chem. Soc.* 2009), incorporado en el presente documento como referencia, usando el siguiente esquema:

20



Reactivos: A: Piperidina, Ácido acético; B: NaOH/H₂O; EtOH, HCl; C: 2-(aminometil)-piperidina, DCC/DMAP.

25 2. Evaluación de propiedades espectroscópicas de sonda fluorescente de cumarina

Los espectros de absorción y emisión de sonda se registraron con el espectrofluorímetro LS55 de PerkinElmer usando varios disolventes. Los disolventes orgánicos evaluados son EtOH, MeOH, DMSO en PBS, H₂O o tampones Hepes a pH 7,2. Considerando tanto el comportamiento de la sonda en una realización acuosa como la evaluación de los datos de los espectros, los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de Hepes:DMSO (95:5). Partiendo de estos datos, se llevaron a cabo varios ensayos para establecer la concentración apropiada de la sonda que podría ser útil para la unión de [Cu⁺⁺] en la muestra biológica. La curva de calibración de la sonda fluorescente en presencia de Cu⁺⁺ (10⁻⁴ M) en HEPES:DMSO 9:1 ($\lambda_{\text{ex}}=430$ nm, $\lambda_{\text{em}} 490$ nm) se muestra en la figura 1. Se ha demostrado la concentración útil para la sonda en la solución ensayada.

35

3. Optimización de las propiedades espectroscópicas y biológicas

Se pensó mejorar el método usando una placa de 96 pocillos. Esto permite tener tiempos de trabajo cortos y un método lo más práctico para las diferentes operaciones. Con este fin usamos Victor III, PerkinElmer, para comprobar las condiciones experimentales de la sonda. Las longitudes de onda de excitación y de absorción son obviamente similares a aquellas que previamente hemos determinado con el fluorímetro ($\lambda_{ex}=380$ nm, $\lambda_{em}=495$ nm). La dosis óptima es de 10^{-5} M. De hecho, la curva de calibración con la sonda a la concentración de 10^{-4} M, usando Victor III, dio una buena correlación pero una señal de fluorescencia demasiado alta y las diferencias no eran apreciables, especialmente a dosis inferiores. Por lo tanto, las curvas de calibración de sonda se construyeron con dosis crecientes de $CuCl_2$ para evaluar el apagado de la sonda y para encontrar una ecuación útil para determinar la concentración de ion de cobre. Se usaron estas dosis de $CuCl_2$: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20 μM . La curva de calibración para la sonda fluorescente en presencia de Cu^{++} (10^{-5} M) con HEPES:DMSO 95:5 ($\lambda_{ex}=430$ nm, λ_{em} 495 nm) se muestra en la figura 2. Se encontró una correlación muy buena en este límite de dosis: 0,1 μM a 10 μM .

4. Ejemplos comparativos que muestran diversos métodos para purificar cobre libre en muestra de suero:

Las muestras de sangre con concentraciones conocidas de cobre libre se trataron usando las siguientes etapas:

- A. Ultracentrífuga, 1 h, 40.000 rpm
- B. Tratamiento con acetonitrilo y ultracentrífuga
- C. Etapa 1: tratamiento de la muestra con acetonitrilo (10 %); etapa 2: centrifuga, 30 min, 14.000 rpm; etapa 3: dispositivos de filtración de diferente tipología:
 - Vivaspin500 membrana de PES (polietersulfona) de 5.000 Dalton de corte.
 - Vivaspin2 membrana de PES (polietersulfona) de 10.000 Dalton de corte.
 - Vivaspin2 membrana de RC Hydrosart (celulosa regenerada) de 10.000 Dalton de corte.

Hemos obtenido estos resultados con estos filtros:

- Número de muestra 1874 = 0,904 μM
- Número de muestra 1876 = 6,55 μM
- Número de muestra 2045 = 4,97 μM

Se han evidenciado varios aspectos usando estos filtros:

1. adhesión del filtro usado (pérdida de cobre estimada entre 10 % y 20 %, también para las muestras para las cuales se ha hecho la dosis);
2. interacción no específica entre sonda y suero.

Estos problemas se han superado usando, por ejemplo, el dispositivo microfluídico descrito en Thorslund S. y col, *Biomed Microdevices* (2006) 8:73-79 incorporado en el presente documento como referencia en el que se usa una membrana de policarbonato.

5. Evaluar la sensibilidad y la especificidad del método usando la curva ROC

El estudio fue aprobado por el "IRB" y todos los participantes o tutores legales firmaron un consentimiento informado. La Tabla 1 informó sobre las características demográficas, clínicas y moleculares de la población de estudio usada para establecer la curva de la característica operativa del receptor (ROC). Las 702 muestras se han analizado según una realización de la presente invención. La curva ROC muestra que usando la presente invención se puede obtener un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer con alta especificidad (80 %) y sensibilidad discreta (60 %). La muestra del paciente con la enfermedad de Alzheimer consistía en individuos con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer probable, (NINCDS-criterios RDA de enfermedad de Alzheimer), quienes tenían una puntuación de Mini Examen de Estado Mental de 25 o menos, quienes eran admitidos al Departamento de Neurociencia, Fatebenefratelli Hospital, Isola Tiberina, en Rome, concentrados entre enero de 2002 y junio de 2011. Aproximadamente, el 85 % de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer incluidos en esta investigación habían estado implicados en unos estudios previos. Los dos grupos estaban igualados por sexo, pero ligeramente se distinguían por edad, estando los pacientes sobre la media. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer se sometieron a evaluación neurológica, realización de neuroimagen (Realización de imagen por resonancia magnética o tomografía axial computerizada) y neuropsicológica extensiva así como ensayos de laboratorio rutinarios. La muestra control consistía en voluntarios de edad sin evidencia clínica de enfermedad neurológica y psiquiátrica. Se evaluó la presencia de afecciones conocidas por afectar el metabolismo de cobre en tanto los pacientes como los controles y se excluyeron las variables biológicas del estrés oxidativo (por ejemplo, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias, historia reciente de insuficiencia cardíaca o respiratoria, fallo renal o de hígado crónico, tumores malignos y un historial reciente de abuso de alcohol). Todos los pacientes se sometieron a ensayos de trazas de metal, variables biológicas de estrés oxidativo y genotipificación de APOE. La curva ROC (Figura 3) reveló que el

5 cobre libre tiene una buena fiabilidad como un ensayo de soporte para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Este concepto se refuerza cuando la sensibilidad y la especificidad del cobre libre se compara con aquellas de los dos ensayos de soporte más usados en la rutina clínica para plantear el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, es decir, atrofia de lóbulo temporal medio (MTA) y APOE (Tabla 2).

10 La separación del suero a partir de la sangre completa de dichas muestras se llevó a cabo usando el dispositivo microfluídico descrito en Thorslund S. y col, *Biomed Microdevices* (2006).

Estos datos sugieren que:

- este método es útil para un ensayo de soporte para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, según los criterios RDA de la enfermedad de Alzheimer de NINCDS recientemente revisados por Dubois y col. *Lancet Neurology* (2007).
- este método es mejor que otros métodos tales como APOE y MTA para definir el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer partiendo de la fase temprana de ambas patologías neurodegenerativas como se informa en la Tabla 2.

Tabla 1: Características demográficas, clínicas y moleculares de la población de estudio.

	Pacientes con enfermedad de Alzheimer (n=399)	Controles (n=303)	Significancia
Edad, años	74,9±8,1	66,5±10,5	p<0,001
Sexo (femenino), %	67,7	68,3	p=0,889
Puntuación de MMSE	19,5±4,5	28,6±1,3	p<0,001
Vehículos APOE e4, %	36,7	11,6	p<0,001
Educación, años	8,9±5,0	9,5±4,5	p=0,634
Cobre, µmol/l	14,98±3,14	13,05±2,98	p<0,001
Ceruloplasmina, mg/dl	26,88±5,09	26,90±5,20	p=0,959
Cobre libre, µmol/l	2,24±2,25	0,28±2,32	p<0,001

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de APOE de atrofia temporal media (MTA), cobre libre.

	Sensibilidad - Enfermedad de Alzheimer frente a controles (95 % CI)	Especificidad - Enfermedad de Alzheimer frente a controles (95 % CI)
MTA	37 % (27-47)	92 % (86-98)
APOE	37 % (27-47)	91 % (85-97)
Cobre libre	51 % (41-61)	88 % (81-95)

25 El cobre libre tiene una mayor fiabilidad que MTA y APOE para discriminar los pacientes con enfermedad de Alzheimer de los controles, los cuales son el ensayo de soporte de realización de neuroimagen (MTA) y genético (APOE) más usados y marcadores no invasivos usados para plantear el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la determinación de la concentración de cobre libre en una muestra de sangre que comprende las siguientes etapas:

a) separar el suero de la sangre completa de dicha muestra con un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro entre 0,1 a 0,5 μm usando una velocidad de filtración entre 200 y 500 microlitros por minuto, en el que dicho filtro de membrana es un filtro de membrana de policarbonato;

b) determinar la concentración de cobre libre en la muestra de suero obtenida en la etapa a) usando una sonda fluorescente de cumarina.

2. El método según la reivindicación 1 en el que dicho filtro de membrana tiene un tamaño de poro entre 0,1 a 0,2 μm .

3. El método según la reivindicación 1 o 2 en el que dicha sonda fluorescente de cumarina se usa en un intervalo de concentración entre 0,1 a 10 μM .

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicha sonda fluorescente de cumarina se usa en una solución de HEPES:DMSO.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicha etapa b) comprende una etapa adicional de preparación de una curva de calibración.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que en dicha etapa b) se usa una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 430 nm y una longitud de onda de adsorción (λ_{em}) de 490 nm.

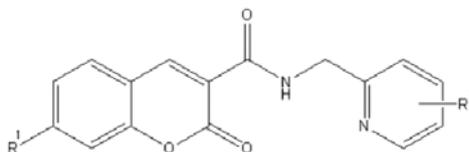
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicha etapa de separación se lleva a cabo usando un dispositivo filtro que comprende dicho filtro de membrana.

8. El método según la reivindicación 7 en el que dicho dispositivo filtro es un dispositivo moldeado con poli(dimetilsiloxano) (PDMS).

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 en el que dicho dispositivo filtro (1) comprende además:

- una parte inferior (2) que incluye uno o más microcanales;
- una cubierta (3), en el que dicho filtro de membrana (4) está incorporado en dicha cubierta y sobre dichos microcanales.

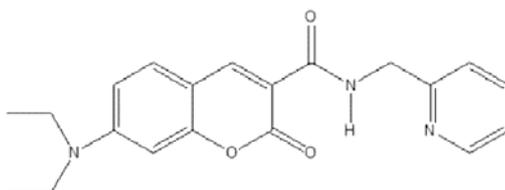
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona de compuestos que tienen la siguiente fórmula estructural general:



en la que

- R^1 es $\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ con n es de 0 a 5;
- R^2 es H, F, Cl, Br, NO_2 , OCH_3 , ciclohexilo.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que dicha sonda fluorescente de cumarina se selecciona de los compuestos que tienen la siguiente fórmula estructural:



- 5 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la confirmación de un diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer que comprende una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una concentración mayor del cobre libre confirma el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer.
13. El método según la reivindicación 12 en el que dicho valor umbral está entre 0,5 y 50 μM .
14. El método según la reivindicación 12 o 13 en el que dicho paciente tiene una disfunción de fenotipo de cobre.
- 10 15. El método según la reivindicación 12 para la prognosis de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en el que las etapas a) y b) del método se repiten sobre las muestras de sangre de dicho paciente recogidas en momentos posteriores y evaluando la progresión en el tiempo de la concentración de cobre libre en las muestras de suero de dicho paciente.
- 15 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la predicción de la conversión desde deterioro cognitivo leve (MCI) a enfermedad de Alzheimer en un paciente que padece de deterioro cognitivo leve que comprende una etapa adicional c) de comparación del valor determinado en la etapa b) con un valor umbral (corte), en el que una concentración mayor de cobre libre indica la conversión desde deterioro cognitivo leve a enfermedad de Alzheimer.
- 20 17. El método según la reivindicación 16 en el que dicho valor umbral se determina usando una curva de la característica operativa del receptor (ROC).
- 25 18. El método según la reivindicación 16 en el que dicho valor umbral está entre 0,5 y 3 μM .
19. El método según la reivindicación 18 en el que dicho valor umbral es de 1.6 μM .

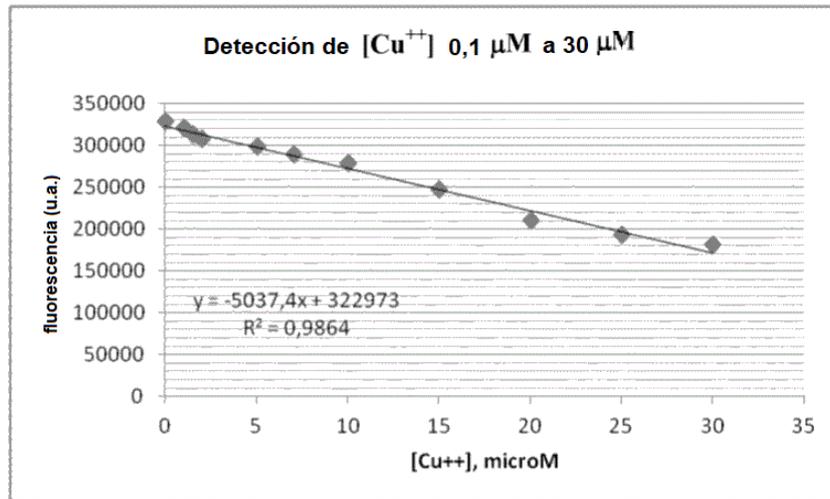


Fig. 1

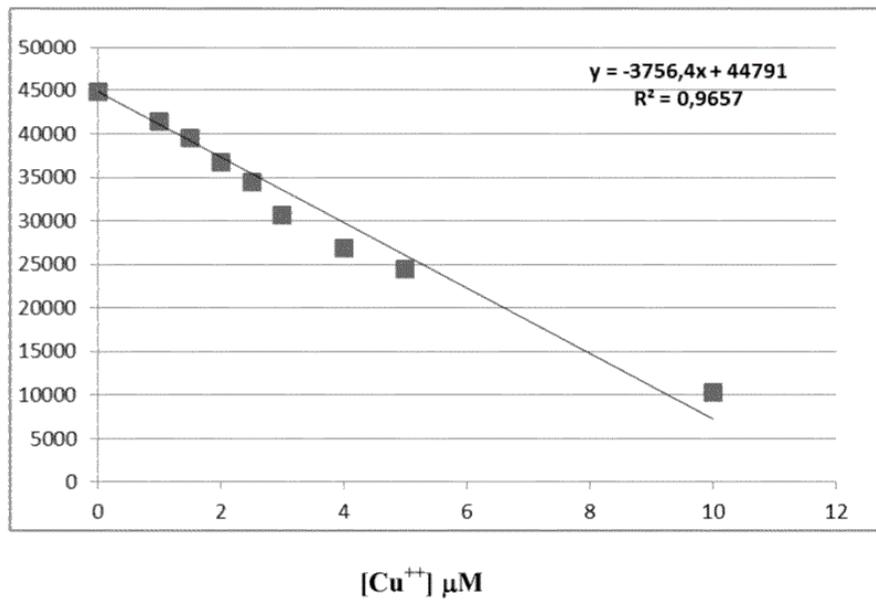


Fig. 2

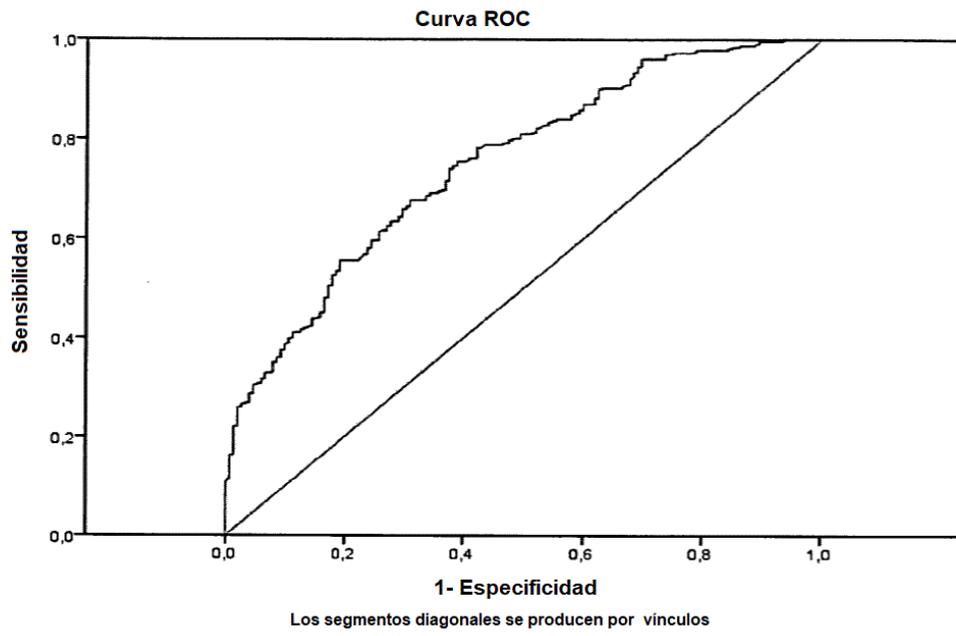


Fig. 3

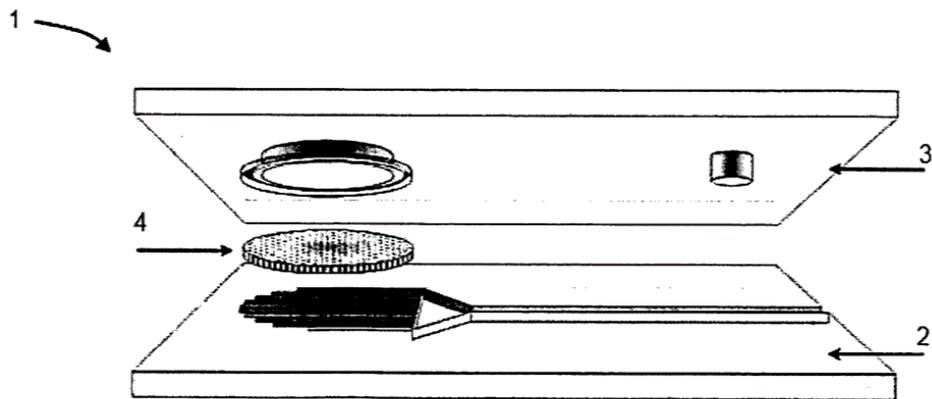


Fig. 4

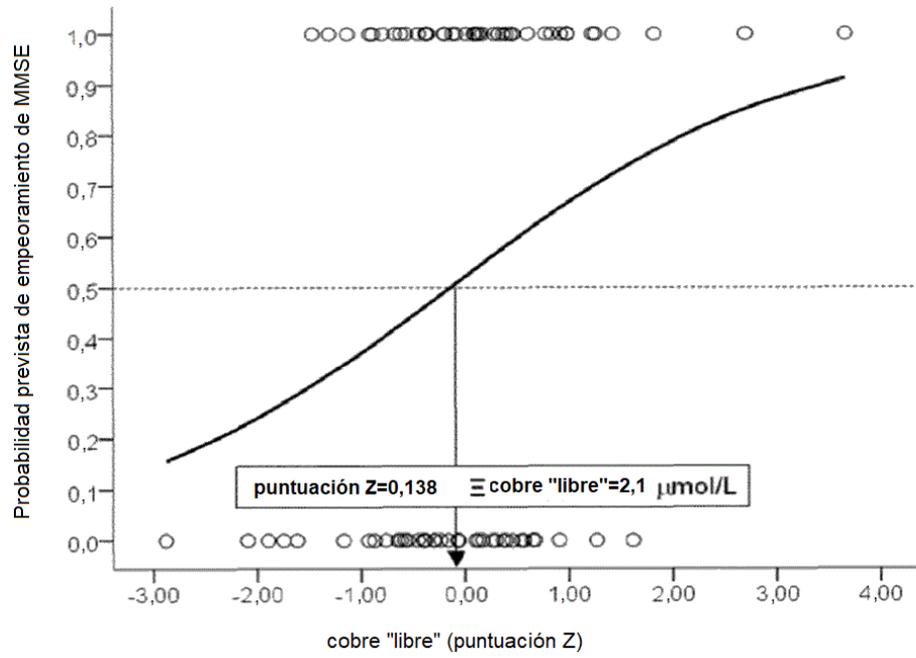


Fig. 5

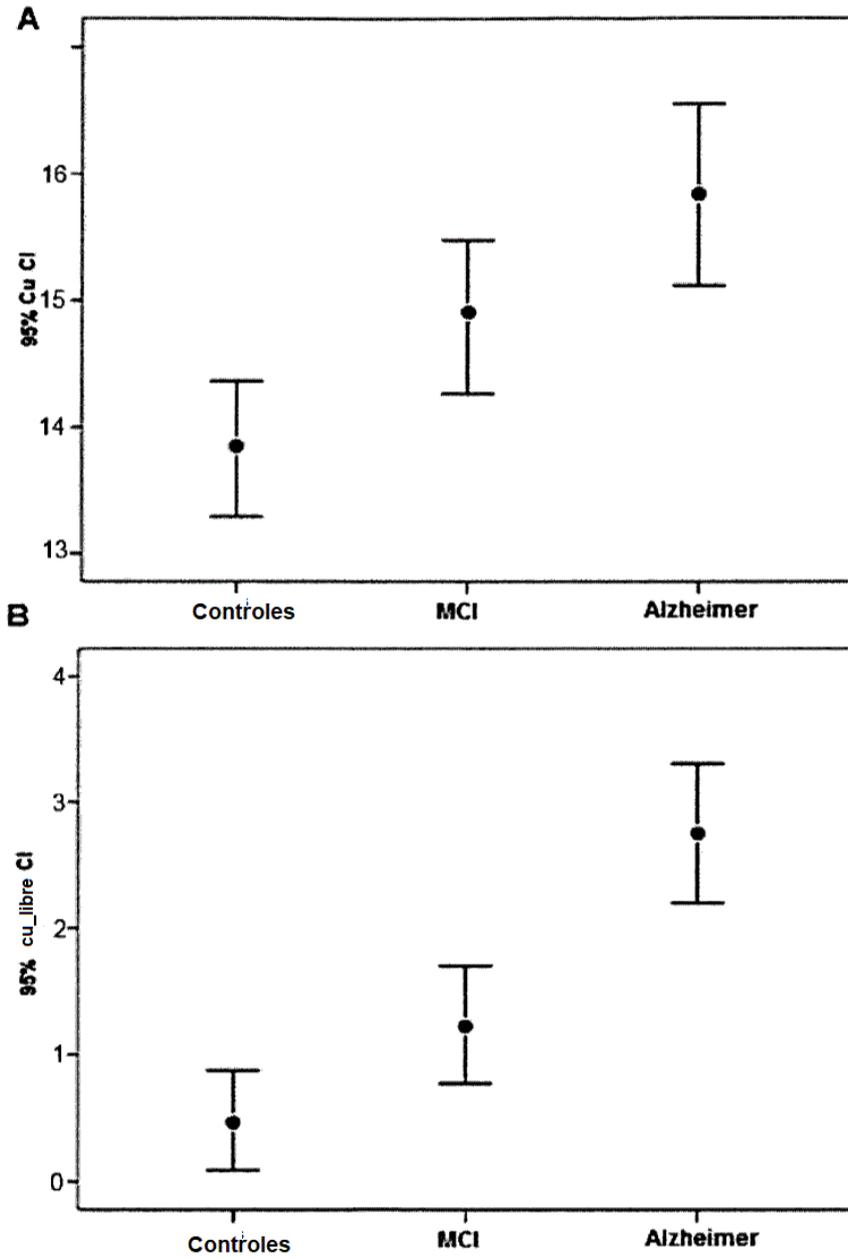


Fig. 6

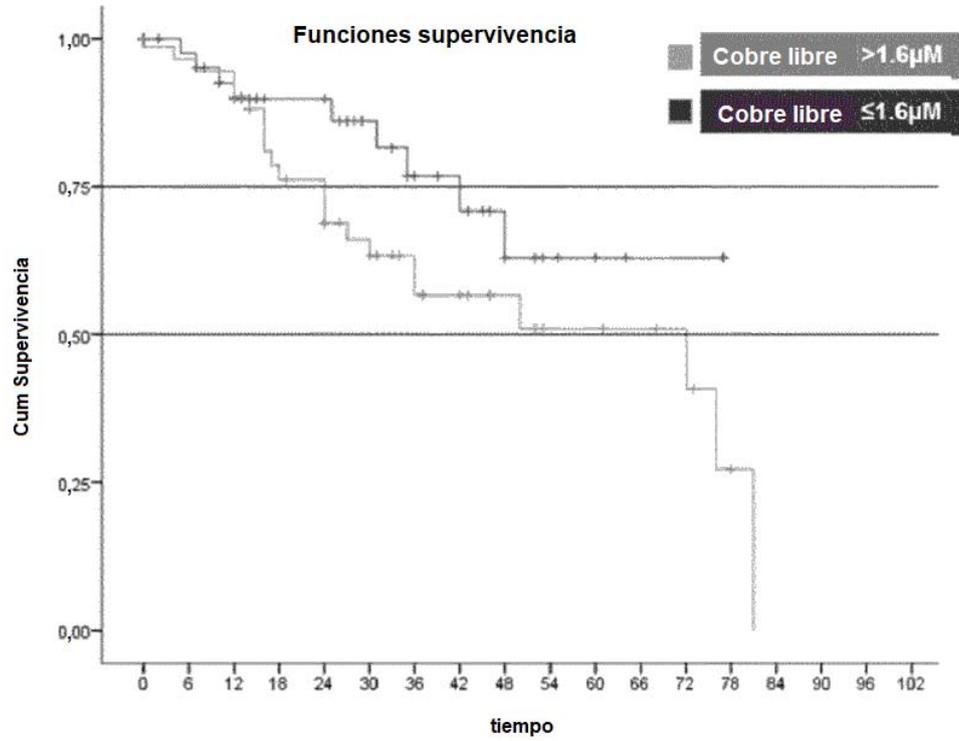


Fig. 7