

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 382 960**

21) Número de solicitud: 201031699

51) Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22) Fecha de presentación:  
**18.11.2010**

43) Fecha de publicación de la solicitud:  
**15.06.2012**

Fecha de la concesión:  
**24.04.2013**

45) Fecha de publicación de la concesión:  
**08.05.2013**

73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE JAÉN (33.3%)  
Campus Las Lagunillas S/N  
23071 Jaén (Jaén) ES;  
UNIVERSIDAD DE GRANADA (33.3%) y  
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)**

72) Inventor/es:

**WANGENSTEEN FUENTES, Rosemary;  
OSUNA ORTEGA, Antonio;  
VARGAS PALOMARES, José Felix y  
RAMIREZ SANCHEZ, Manuel**

74) Agente/Representante:

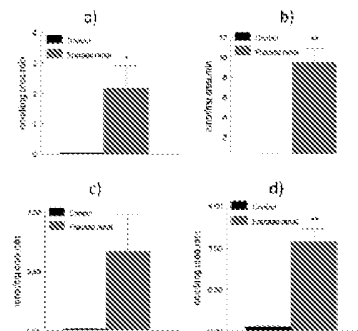
**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54) Título: **AMINOPEPTIDASAS COMO MARCADORES DE DAÑO RENAL**

57) Resumen:

Aminopeptidasas como marcadores de daño renal.  
La presente invención se refiere a un método y a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente y determinar la actividad de al menos una aminopeptidasa seleccionada de entre aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa.

Fig. 3



ES 2 382 960 B1

## DESCRIPCIÓN

Aminopeptidasas como marcadores de daño renal.

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuadra en general dentro del campo de la biomedicina y en particular se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico del daño renal agudo.

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La Acute Kidney Injury Network (AKIN) describe el daño renal agudo como las “anormalidades funcionales o estructurales o en los marcadores de daño renal, incluyendo anomalías en sangre, orina, pruebas tisulares o estudios de imagen presentes en los últimos tres meses” (Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 463-493).

15 Normalmente el daño renal agudo se asocia con la retención de creatinina, urea y otros productos metabólicos de desecho que son normalmente excretados por el riñón. Aunque en los casos más severos se observa oliguria o, incluso, anuria, el volumen de orina puede ser también normal o alto (Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcome in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11: R31).

20 El daño renal agudo tiene diversas etiologías, pudiendo ser ocasionado por una disminución en la perfusión renal o intrarrenal, por una agresión tóxica u obstrucción del túbulo renal, por inflamación tubulointersticial y edema, o por una reducción en la capacidad de filtración del glomérulo (Chertow GM, Lee J, Kuperman GJ, Burdick E, Horsky J, et al. Guided medication dosing for inpatients with renal insufficiency. *JAMA* 2001; 286: 2839-2844). Se trata de una patología compleja cuya tasa de mortalidad (50-70 %) ha permanecido bastante invariable en los últimos 50 años (Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 294: 813-818.).

25 Diversos mecanismos fisiopatológicos contribuyen al desarrollo y progresión del daño renal agudo: aumento de la vasoconstricción renal, disfunción tubular y muerte celular por apoptosis o necrosis, descamación celular, anomalías en el transporte de iones que conducen a un desequilibrio en el balance tubuloglomerular, y producción local de mediadores de inflamación que ocasionan inflamación intersticial y congestión vascular (Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2199-2210; Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114: 5-14.).

30 Los marcadores más utilizados en la práctica clínica para la detección del daño renal son la urea y la creatinina séricas, que presentan bastantes limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad. Además, el daño renal debe afectar a más del 50 % de la función renal para que se produzca una elevación de la urea y de la creatinina séricas (Devarajan, P. Emerging biomarkers of acute kidney injury. *Acute kidney Injury* 2007; 156: 203-212; Bonventre JV, Vaidya VS, Schmoeder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 436-440.)

35 La detección precoz del daño renal continúa siendo un reto en la actualidad, tanto en la práctica clínica como en ensayos de toxicidad farmacológica, y se necesitan biomarcadores que permitan su diagnóstico temprano, así como su evolución, siendo los biomarcadores urinarios los más prometedores en este sentido.

40 Un marcador urinario ideal debe ser altamente órgano-específico, debe permitir el reconocimiento de la etiología del daño renal (hipoxia, toxinas, sepsis, etc.), debe correlacionar con los hallazgos histológicos en biopsias renales, debe detectar el daño precoz e identificar cambios patológicos en los diferentes segmentos tubulares, debe correlacionar con el grado de daño tubular y tener alta sensibilidad para la detección precoz tanto de cambios mínimos como de la aparición de un daño más severo (el marcador debería ser detectable a lo largo del transcurso del daño renal con valores umbral definidos para monitorizar la progresión y regresión del daño renal; hasta la fecha, no hay ningún método adecuado para diferenciar entre disfunción renal benigna, ligera, moderada o severa), su análisis no debe ser invasivo y, por último, los análisis de laboratorio deberían ser sencillos y rápidos de llevar a cabo, seguros, reproducibles, baratos y que permitan la determinación en serie de un gran número de muestras (Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarker of acute kidney injury. *Blood purif* 2010; 29: 357-365.).

45 La caracterización de estos marcadores urinarios debe servir para dilucidar si son herramientas útiles en el diagnóstico precoz, si identifican el mecanismo del daño renal, y/o si indican el sitio y la severidad del daño, ayudando a monitorizar la respuesta al tratamiento.

50 Los marcadores de daño renal agudo pueden clasificarse como (Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarker of acute kidney injury. *Blood purif* 2010; 29: 357-365.):

- 1) Enzimas liberadas de las células tubulares dañadas, disfuncionales o con necrosis/apoptosis: fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltanspeptidasa, alanina aminopeptidasa, isoenzimas de la glutatión transferasa, N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG).
- 5 2) Proteínas de bajo peso molecular (<40 kDa) (α<sub>1</sub>-microglobulina, β<sub>2</sub>-microglobulina, proteína transportadora de retinol (RBP), cistatina C), cuya presencia en orina refleja una disminución en la reabsorción por parte de las células del túbulo proximal,
- 3) Proteínas específicamente producidas en el riñón durante el transcurso del daño renal: proteína 61 rica en cisteína, lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL), molécula de daño renal (KIM-1), citoquinas y quimoquinas (Gro-α, IL-18), y
- 10 4) Proteínas estructurales y funcionales de los túbulos renales: F-actina, intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-3).

Se han determinado distintos marcadores de daño renal agudo, Nguyen Mai T et al. "Biomarkers for the early detection of acute kidney injury". *Pediatric Nephrology*. Dic. 2008. Vol. 23. Nº. 12, páginas 2151-2157. describe como marcadores de daño renal agudo la NGAL, IL-18, kim-1 y la Cistatina C.

- 15 En Ferguson et al. "Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury". *TOXICOLOGY*. 04.01.2008. Vol. 245, Nº. 3, páginas 182 - 193. Se cita a la Alanil aminopeptidasa como una de las proteínas con actividad enzimática como marcador de daño renal agudo.

- 20 Trof Ronald J. et al. "Biomarkers of acute renal injury and renal failure". *Shock*. Sep. 2006. Vol. 26. Nº. 3, páginas 245 - 253. Se refiere a marcadores serológicos y urinarios para la detección de la disfunción y el daño renal agudo, dentro de los marcadores urinarios cita a la Ala-(Leu-Gly) aminopeptidasa.

Nomura M. et al. "Possible involvement of aminopeptidase A in hypertension and renal damage in Dahl salt-sensitive rats". *American Journal of Hypertension*. 01.04.2005. Vol. 18. Nº. 4, páginas 538 - 543. describe que la glutamil aminopeptidasas se encuentra disminuida en el tejido renal en ratas DS y en DR y esta disminución podría estar implicada en la evolución de la hipertensión y del daño renal.

- 25 Scherberich J. E. et al. "Immunological and ultrastructural analysis of loss of tubular membrane-bound enzymes in patients with renal damage". *Clinica chimica acta*. 15 Dic. 1989. Vol.185, Nº 3, páginas 271 - 282. describe a la aminopeptidasas M, también llamada (Ala-(Gly-leu)-aminopeptidasa o Alanil-aminopeptidasa, como marcador de disrupción de membrana en el túbulo proximal.

- 30 En Solis-Herruzo J.A. et al "Urinary excretion of enzymes in cirrhotics with renal failure". *Journal of Hepatology*. 1986. Vol. 3, Nº. 1, páginas 123-130, los autores confirman que la medida de enzimas urinarias, entre las que se encuentra la leucina aminopeptidasa, tiene valor diagnóstico de daño renal en pacientes cirróticos.

Serrera Contreras J. L. et al. "Enzimología del daño renal agudo". *Rev Clin Esp*. 1972 Vol. 30; Nº. 127(4), páginas 855-862. describe que la leucina aminopeptidasas tiene valor diagnóstico en el fracaso renal agudo.

- 35 Todo lo expuesto anteriormente justifica la necesidad de identificar y validar nuevos biomarcadores de daño renal más precisos, cuya determinación además sea rápida, sencilla y sin necesidad de biopsiar al paciente.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método no invasivo para diferenciar entre disfunción renal benigna, ligera, moderada o severa, fácilmente utilizable en la práctica clínica diaria, mediante un test sencillo, rápido y económico que permite la determinación en serie de un alto volumen de muestras.

- 40 Así pues, en un primer aspecto, la presente invención al uso de al menos una aminopeptidasa seleccionada de entre aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.

- 45 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende determinar en una muestra aislada la actividad de al menos una aminopeptidasa seleccionada del grupo que comprende: aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida, se determina simultáneamente la actividad de las aminopeptidasas aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa. En una realización particular, la actividad de la o las aminopeptidasas se determina mediante análisis fluorométrico.

- 50 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente, determinar la actividad de al menos una aminopeptidasa seleccionada del grupo que comprende: aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa, o cualquiera de sus combinaciones, y comparar dicha actividad con

un valor control, donde la alteración de dicha actividad es indicativa de daño renal. En una realización preferida, se determina simultáneamente la actividad de las aminopeptidasas aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y leucil-cistinil aminopeptidasa.

5 Por daño renal en la presente invención nos referimos, sin limitarnos, a cualquier anomalía funcional o estructural de diversa etiología ya sea por una disminución en la perfusión renal o intrarrenal, por una agresión tóxica u obstrucción del túbulo renal, por inflamación tubulointersticial y edema o por una reducción en la capacidad de filtración del glomérulo.

En una realización más preferida de la presente invención, el daño renal que se puede diagnosticar y/o pronosticar es un daño renal agudo.

10 Por daño renal agudo en la presente invención nos referimos a un daño renal cuya anomalía funcional o estructural que lo produce está presente durante al menos tres meses consecutivos.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra que se analiza es una muestra de orina.

En otra realización más preferida la actividad de las aminopeptidasas se determina mediante análisis fluorométrico.

15 En otra realización preferida, el análisis fluorométrico se lleva a cabo mediante la utilización de un sustrato que es seleccionado de entre el glutamil-  $\beta$ -nafilamida, alanil-  $\beta$ -nafilamida, aspartil-  $\beta$ -nafilamida y/o cistinil- $\beta$ -nafilamida.

En otra realización preferida, el aumento de la actividad de la aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y/o leucil-cistinil aminopeptidasa con respecto al valor control es indicativo de daño renal.

20 En otra realización preferida, el aumento de la actividad de la glutamil aminopeptidasa y/o de la alanil aminopeptidasa con respecto al valor control es indicativo de daño renal precoz.

Por daño renal precoz en la presente invención nos referimos a daño renal en los primeros estadios de su evolución que se acompaña de cambios mínimos difícilmente detectables por los métodos analíticos habituales, y que se traduce en una disfunción renal benigna o ligera.

25 En otra realización preferida, cuando el paciente ha sido diagnosticado de daño renal precoz según el método de la presente invención, la disminución de la actividad de la glutamil aminopeptidasa y/o de la alanil aminopeptidasa es indicativa de recuperación de la función renal.

Por tanto, la presente invención en una realización particular se refiere a la glutamil aminopeptidasa y/o a la alanil aminopeptidasa como marcadores para el diagnóstico precoz de daño renal.

30 En otra realización preferida, el aumento de la actividad de la aspartil aminopeptidasa y/o de la leucil-cistinil aminopeptidasa es indicativo de disfunción renal grave.

En la presente invención por disfunción renal grave nos referimos a daño renal en una fase avanzada de su evolución que se acompaña de alteraciones hematológicas, urinarias e histológicas y conlleva una disminución moderada o severa de la función renal.

35 Por tanto, una realización preferida se refiere a la aspartil aminopeptidasa y/o a la leucil-cistinil aminopeptidasa como marcadores para el pronóstico de daño renal.

En otra realización preferida, el paciente padece otra enfermedad de etiología diferente al daño renal, en otra realización preferida, el paciente sufre una enfermedad seleccionada de entre hipertiroidismo, hipertensión, diabetes, trasplante, efectos secundarios de medicamentos que provoquen daño renal.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal según el método descrito anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para determinar la actividad de la aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y/o leucil-cistinil aminopeptidasa.

45 En una realización preferida, el kit comprende los sustratos necesarios para determinar la actividad de la aspartil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, alanil aminopeptidasa y/o leucil-cistinil aminopeptidasa mediante un método fluorométrico. En una realización preferida, el kit comprende glutamil-  $\beta$ -nafilamida, alanil-  $\beta$ -nafilamida, aspartil-  $\beta$ -nafilamida y/o cistinil- $\beta$ -nafilamida.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit descrito anteriormente para el diagnóstico y pronóstico de daño renal.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Figura 1: Muestra a) proteinuria, b) actividad GluAp, c) actividad AlaAp, d) actividad AspAp y e) actividad CysAp, en

ratas control, ratas con un 8 % de sal en la dieta (Sal), ratas hipotiroideas tratadas con metimazol 300 mg/l en agua de bebida (Metimazol), ratas con 8 % de sal + metimazol (Metimazol+Sal), ratas hipertiroideas tratadas con tiroxina 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  (T4) y ratas con 8 % de sal + tiroxina (T4+Sal). **1**  $p<0.05$ , **2**  $p<0.01$ , **3**  $p<0.001$  frente a su respectivo grupo Control o Sal; **4**  $p<0.05$ , **5**  $p<0.01$ , **6**  $p<0.001$  frente a su respectivo grupo tratado con Metimazol o con T4.  $n = 6$  en cada grupo.

Figura 2: Muestra a) Proteinuria, b) actividad GluAp, c) actividad AlaAp, d) actividad AspAp y e) Actividad CysAp en ratas tratadas con cisplatino a las dosis de 3.5 y 7 mg/kg. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  versus basal.  $n = 5$  en cada grupo.

Figura 3: Muestra a) Actividad GluAp, b) AlaAp, c) AspAp y d) CysAp en controles sanos y pacientes con fracaso renal. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  versus control. Control ( $n = 5$ ). Pacientes ( $n = 6$ ).

Figura 4: Muestra a) actividad GluAp, b) AlaAp, c) AspAp y d) CysAp en los días 2, 4 y 5 después del trasplante renal en dos pacientes.

Figura 5: Muestra la evolución de a) actividad GluAp, b) actividad de AlaAp, c) actividad de AspAp y d) actividad de CysAp en los días 2, 4 y 5 después del trasplante renal. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  versus control. Control ( $n = 5$ ). Trasplantados ( $n = 4$ ).

## EXPOSICION DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

### Ejemplo 1: Determinación analítica de las actividades GluAp, AlaAp, AspAp y CysAp en modelos animales.

Por un lado, 42 ratas Wistar macho de 250 g de peso procedentes del animalario de la Universidad de Valladolid fueron distribuidas en 6 grupos ( $n = 7$ ) con los siguientes tratamientos: Control, Sal (8 % de NaCl en la dieta), Hipotiroideas (metimazol, 300 mg/l en agua de bebida), Hipotiroideas + Sal, Hipertiroideas (inyección s.c. diaria de tiroxina (T4) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ), y Hipertiroideas + Sal.

Todos los tratamientos se mantuvieron durante 6 semanas.

Al final del experimento, y tras un período de 2 días de adaptación a las jaulas metabólicas, cada animal fue introducido en una jaula metabólica durante 24 horas. Se determinó la diuresis, y la orina fue centrifugada 10 min a 1.000 g, alícuotada y congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En otro experimento, se utilizaron 15 ratas Wistar macho de 250 g de peso proporcionadas por Harlan Laboratories, que se distribuyeron en 3 grupos ( $n=5$ ): Control, Cisplatino 3.5 (una única inyección s.c. el primer día del experimento de cisplatino a la dosis de 3,5 mg/kg de peso), y Cisplatino 7 (inyección s.c. de cisplatino 7.5 mg/kg).

Tras un período de 2 días de adaptación a las jaulas metabólicas, se realizó una toma basal de diuresis previa al tratamiento, y a continuación se recogió orina a los grupos tratados los días 2, 3, 7 10 y 14, realizando también dos tomas a las ratas control, al inicio y al final del experimento.

Las actividades GluAp, AlaAp, AspAp y CysAp se determinaron por duplicado mediante un análisis fluorimétrico utilizando glutamil-, alanil-, aspartil- y cistinil- $\beta$ -naftilamida como sustratos, respectivamente.

Para ello se incubaron 20  $\mu\text{l}$  de orina durante 60 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 90  $\mu\text{l}$  de su correspondiente solución de sustrato:

- glutamil- $\beta$ -naftilamida 2.72 mg/dl, BSA 10 mg/dl, DTT 10 mg/dl y  $\text{CaCl}_2$  555 mg/dl en Tris-HCl 50 mM pH 7.4,
- alanil- $\beta$ -naftilamida 2.14 mg/dl, BSA 10 mg/dl, DTT 10 mg/dl en Tris-HCl 50 mM pH 7.4,
- aspartil- $\beta$ -naftilamida 2.58 mg/dl, BSA 10 mg/dl,  $\text{MnCl}_2$  39.4 mg/dl en Tris-HCl 50 mM pH 7.4,
- cistinil- $\beta$ -naftilamida 5.63 mg/dl, BSA 10 mg/dl; DTT 10 mg/dl en Tris-HCl 50 mM pH 6.

Los sustratos habían sido disueltos previamente en 1 ml de DMSO y almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La cantidad de  $\beta$ -naftilamina liberada como resultado de las actividades aminopeptidásicas se midió fluoriméricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm con excitación a 345 nm, realizando una medida de la fluorescencia a los 60 minutos, tras detener la reacción con 90  $\mu\text{l}$  de tampón acetato 0,1 M.

Se realizó un blanco por duplicado para cada muestra. Para ello se siguió un procedimiento idéntico al anterior, pero utilizando una solución de incubación que no contenía el sustrato correspondiente. La diferencia de fluorescencia entre ambas medidas se cuantificó utilizando una curva estándar de  $\beta$ -naftilamina disuelta en agua a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 nmol/ml. A 20  $\mu\text{l}$  de esta disolución se añadieron 90  $\mu\text{l}$  de la solución de incubación correspondiente a cada enzima sin el sustrato, se incubaron durante 60 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se añadieron 90  $\mu\text{l}$  de tampón acetato 0.1 M. Se comprobó que la presencia de sustrato en las soluciones de incubación no

modificaba en absoluto la fluorescencia del estándar. Todas las medidas se realizaron por duplicado, y se comprobó la linealidad de la fluorescencia obtenida en el rango de la curva (0-200 nmol/ml).

5 Tanto para las determinaciones de las muestras como para los blancos de muestra se realizaron blancos de reacción que contenían 20 µl de agua destilada, 90 µl de solución de incubación con o sin sustrato, respectivamente, y 90 µl de acetato sódico.

La actividad específica de cada aminopeptidasa se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por mg de creatinina. Se comprobó la linealidad de la fluorescencia obtenida con respecto al tiempo de hidrólisis y al contenido de creatinina de una misma muestra.

10 La creatinina urinaria se determinó mediante el método cinético de Jaffé, basado en la reacción de la creatinina con picrato sódico.

La proteinuria se determinó mediante un kit comercial de Bio-Rad (DC Protein Assay kit) basado en el método de Lowry.

15 Tras realizar un análisis de varianza, se realizó una prueba *t* para datos no pareados suponiendo varianzas iguales. En los casos en que las muestras no se ajustaban a la normalidad se realizó la modificación de Fischer para varianzas desiguales. Se tomó como diferencia significativa cuando  $p < 0.05$  versus grupo control.

En el caso de las ratas sometidas a tratamiento con cisplatino, se realizó una prueba *t* para datos pareados con respecto a la toma basal de cada animal. Se tomó como diferencia significativa cuando  $p < 0.05$  versus basal.

20 Los resultados mostraron que las ratas tratadas con Sal al 8 % presentaban un aumento significativo en dos de las cuatro enzimas analizadas: GluAp y AlaAp. El aumento en estas enzimas tubulares no se acompañaba de proteinuria (fig. 1) ni de aumento de creatinina plasmática.

En el hipotiroidismo no se observó modificación en la proteinuria ni en la actividad aminopeptidásica, excepto en el caso de la AlaAp que estaba disminuida significativamente. La administración de metimazol a las ratas tratadas con sal (hipotiroideas + sal) también produjo una disminución, tanto de GluAp como de AlaAp en comparación con las ratas tratadas con sal (fig. 1).

25 Las ratas tratadas con T4 presentaban al final del tratamiento un aumento significativo en la actividad urinaria de GluAp, así como del nivel de proteinuria excretada por mg de creatinina (fig 1). La administración simultánea de sal a las ratas hipertiroideas produjo una gran elevación de las 4 enzimas y de la proteinuria. GluAp y AlaAp se elevaron más de 10 veces, y CysAp y AspAp unas 5 veces sobre el valor de actividad de las ratas hipertiroideas.

30 En el caso de las ratas tratadas con cisplatino a la dosis de 3,5 mg/kg, a los 3 días del tratamiento se observa una ligera elevación en los niveles de proteinuria (1.5 veces sobre el nivel basal), que no llega a ser significativa estadísticamente, mientras que, sin embargo, las actividades GluAp y AlaAp se elevan 3 y 60 veces, respectivamente (fig.2)

En los animales tratados con la dosis de 7 mg/kg, al tercer día de tratamiento la proteinuria se duplica, mientras que la GluAp y la AlaAp se elevan 8 y 70 veces, respectivamente.

35 Sólo se observa elevación de la actividad CysAp y AspAp en el grupo tratado con cisplatino a la dosis de 7 mg/kg.

Ejemplo 2: Determinación analítica de las actividades GluAp, AlaAp, AspAp y CysAp en pacientes.

Se recogieron muestras de orina de pacientes con fracaso renal (n = 6) y de controles sanos (n = 5), y la orina fue centrifugada 10 min a 1.000 g, alícuotada y congelada a -80 °C.

40 En dos de estos pacientes, sometidos a trasplante renal, se recogió muestra de orina a los 2, 4 y 5 días del trasplante.

Las actividades GluAp, AlaAp, AspAp y CysAp fueron determinadas como se explica en el ejemplo 1.

En los 6 casos analizados se observó un aumento significativo de GluAp, AlaAp y CysAp, siendo la AlaAp la que alcanzó mayores valores de actividad (fig.3). La AspAp estaba aumentada en cinco de los seis pacientes analizados.

45 El nivel para el control para la GluAp fue  $0.038 \pm 0.009$  nmol/mg crea.min, para la AlaAp fue  $0.197 \pm 0.047$  nmol/mg crea.min, para la AspAp fue  $0.016 \pm 0.003$  nmol/mg crea.min y para la CysAp fue  $0.051 \pm 0.010$  nmol/mg crea.min.

Los dos pacientes en los que se determinó la actividad enzimática en los días posteriores al trasplante de riñón tenían estas enzimas muy aumentadas.

50 En el caso del paciente 1, a los 5 días del trasplante las enzimas comenzaron a descender, encontrándose tres de ellas por debajo del nivel que tenían a los 2 días. La creatinina en sangre se mantuvo elevada, pero se observó cierta mejora en aclaramiento de creatinina, así como disminución de proteinuria (fig. 4, tabla 1).

Tabla 1. Valores de creatinina en sangre, aclaramiento de creatinina y proteinuria en los días posteriores al trasplante renal de los dos pacientes estudiados.

<b>Paciente 1</b>	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 5</i>
Creatinina sangre (mg/dl)	7.70	9.60	8.76
Aclaramiento Crea (ml/min)	6.20	8.24	18.24
Proteinuria (mg/mg crea)	18.6	10.9	7.62
<b>Paciente 2</b>	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 5</i>
Creatinina sangre (mg/dl)	12.2	11.4	9.2
Aclaramiento Crea (ml/min)	5.09	8.14	10.8
Proteinuria (mg/mg crea)	12.1	9.75	10.3

5 En el caso del paciente 2, sólo se observa una clara disminución de CysAp al 5º día del trasplante, manteniéndose elevadas las otras tres enzimas. Sin embargo, se observa una disminución progresiva de la creatinina en sangre, y una muy ligera mejora del aclaramiento. La proteinuria se mantiene a niveles elevados (fig. 4, tabla 1).

10 El hecho de que en los animales tratados con cis-platino se produjera una gran elevación de GluAp y AlaAp a los 3 días de la inyección, con un ligero aumento en la proteinuria, y en las ratas tratadas con sal al 8 % también se produjera una elevación de estas dos enzimas sin que hubiera un aumento en la excreción de proteínas ni en la urea ni en la creatinina plasmáticas, indicó que estas aminopeptidasas, en concreto la GluAp y AlaAp fueron de gran utilidad a la hora de detectar precozmente el daño renal.

15 Las actividades AspAp y CysAp solamente se elevaron en caso de disfunción renal grave, siendo su elevación mucho mayor en las ratas hipertiroides tratadas con sal que en las ratas hipertiroides que seguían una dieta normal, en las ratas tratadas con cisplatino a la dosis de 7 mg/kg, y apareciendo niveles muy altos en los pacientes con fracaso renal estudiados, aunque en uno de los casos el nivel de AspAp estaba dentro de la normalidad.

Por otra parte, en las ratas tratadas con sal a las que se les administró metimazol (hipotiroideas + sal) se produjo una disminución en GluAp y AlaAp con respecto a las ratas tratadas con sal debido al efecto protector a nivel renal del metimazol. Además, en los pacientes trasplantados, observamos cómo estas enzimas descendían conforme se iba recuperando la función renal.

20 Los resultados mostrados en los ejemplos de la presente invención indicaron que estas enzimas fueron indicadores de la progresión y regresión del daño renal, diferenciando entre daños ligeros o severos en multitud de situaciones patológicas que afectan al riñón: glomerulonefritis, nefropatías crónicas, insuficiencia renal, tratamientos con antitumorales, pacientes diabéticos, pacientes hipertensos, etc.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de la glutamil aminopeptidasa, para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.
2. Método para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende determinar en una muestra aislada la actividad de la glutamil aminopeptidasa.
- 5 3. Método según la reivindicación 2, donde la actividad de la aminopeptidasa se determina mediante análisis fluorométrico.
4. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende el método según las reivindicaciones 2- 3 y comparar dicha actividad con un valor control, donde la alteración de dicha actividad es indicativa de daño renal.
5. Método según la reivindicación 4, donde el daño renal es un daño renal agudo.
- 10 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la muestra es orina.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la actividad de la aminopeptidasa se determina mediante análisis fluorométrico.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde el sustrato utilizado es glutamil-  $\beta$ -nafilamida.
- 15 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde el aumento de la actividad de la glutamil aminopeptidasa, con respecto al valor control es indicativa de daño renal.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde el aumento de la actividad de la glutamil aminopeptidasa con respecto al valor control es indicativa de daño renal precoz.
- 20 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde el paciente sufre una enfermedad seleccionada de entre hipertiroidismo, hipertensión, diabetes, trasplante, efectos secundarios de medicamentos que provoquen daño renal.
12. Kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal según el método de las reivindicaciones 2-11, que comprende los reactivos necesarios para determinar la actividad de la glutamil aminopeptidasa.
13. Kit según la reivindicación 12, que comprende glutamil-  $\beta$ -nafilamida.
14. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.



Fig. 1

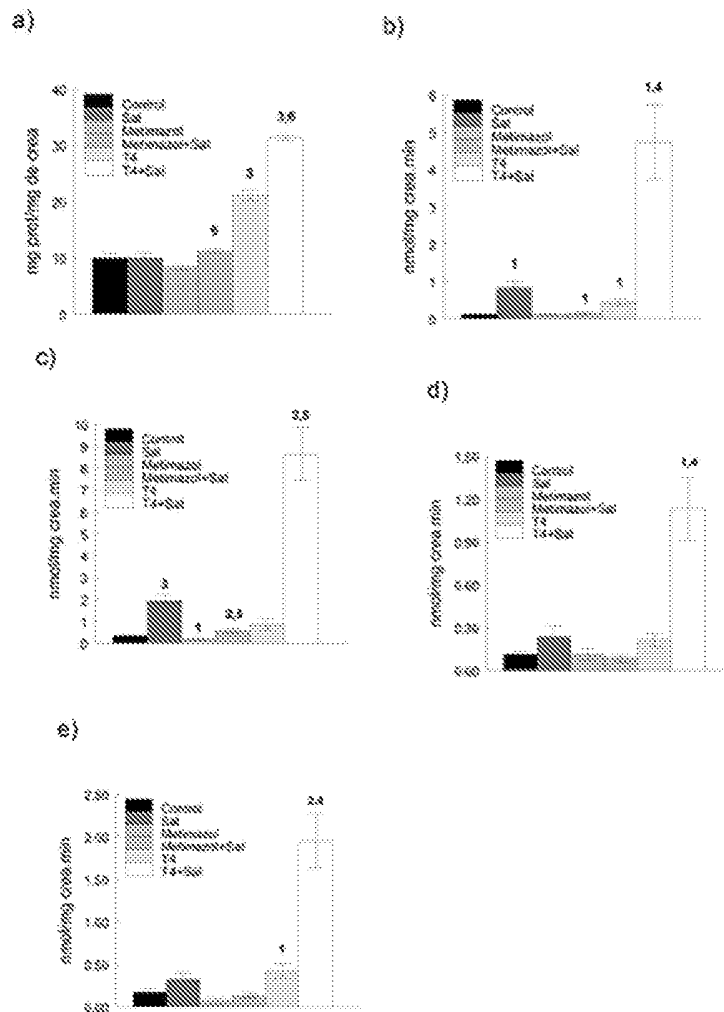


Fig. 2

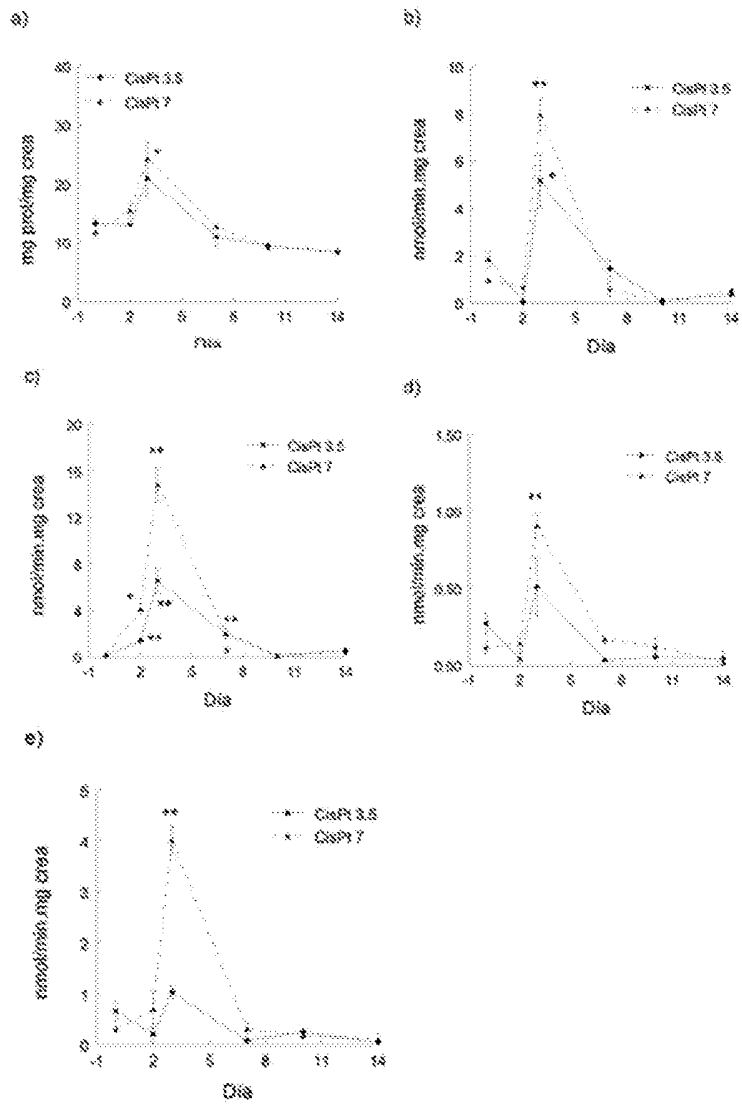


Fig. 3

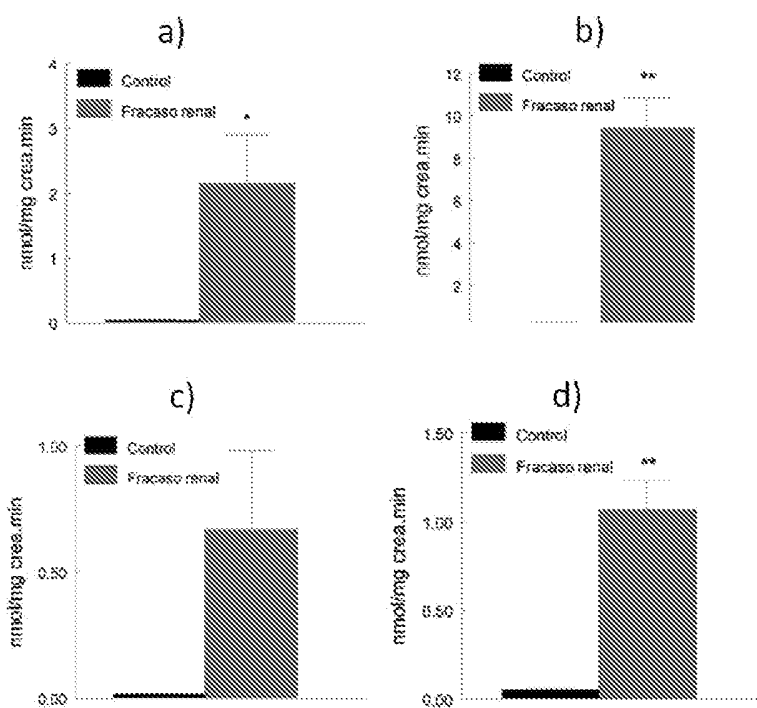


Fig. 4

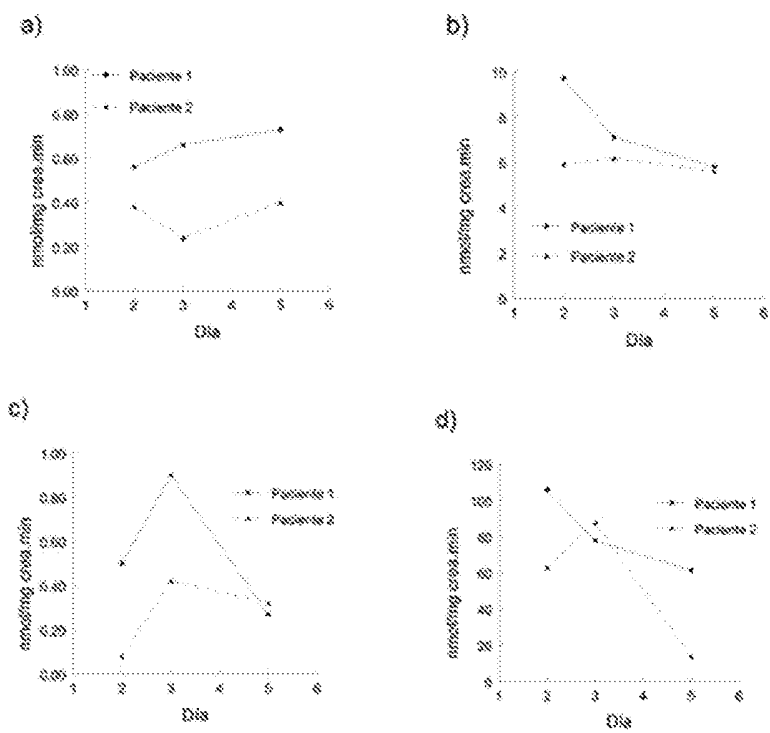
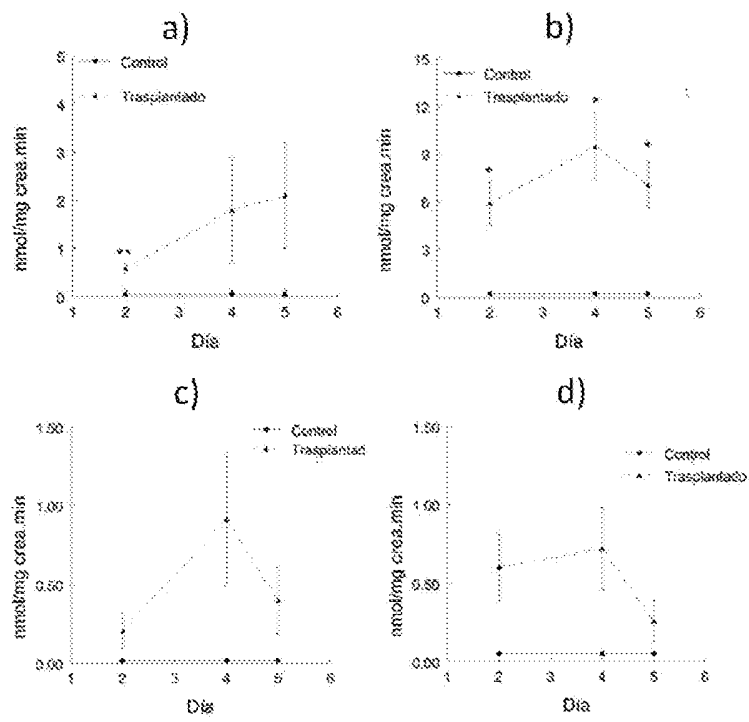


Fig. 5





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031699

22 Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : C12Q1/37 (2006.01)  
G01N33/52 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007141005 A1 (BAYER HEALTHCARE AG.) 13-12-2007, página 45, líneas 15 - 27.	1, 2
Y	página 51, línea 22 - página 52, línea 6; reivindicación 18,	2-14
Y	ALBA, F. et al, 'Un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas cerebrales. [A fluorimetric method for the determination of brain aminopeptidasas]', ARCHIVOS DE NEUROBIOLOGÍA, 1989, Vol. 52, No. 4, páginas 169-173, ISSN: 0004-0576 (Print), Materiales y Métodos, Discusión.	2-14
A	LISOWSKA-MYJAK, B., 'Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury', BLOOD PURIFICATION, May 2010, Vol. 29, No. 4, páginas 357-365, ISSN: 0253-5068 (print), ISSN: 1421-9735 (electronic) Epub: 14-04-2010, todo el documento.	1-14
A	BAGSHAW, S.M. et al., 'Urinary biomarkers in septic acute kidney injury.', INTENSIVE CARE MEDICINE, 2007, Vol. 33, No. 7, páginas 1285-1296, ISSN: 0342-4642 (print), todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
14.05.2012

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031699

22 Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2010

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : **C12Q1/37** (2006.01)  
**G01N33/52** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TROF, R.J. et al., 'Biomarkers of acute renal injury and renal failure.', SHOCK, 2006, Vol. 26, No. 3, páginas 245-253, ISSN: 1073-2322 (print), todo el documento.	1-14
A	ENDRE, Z.H. et al., 'Early detection of acute kidney injury: emerging new biomarkers., NEPHROLOGY, 2008, Vol. 13, No. 2, páginas 91-98, ISSN: 1320-5358 (print), ISSN: 1440-1797 (electronic), todo el documento.	1-14
A	WO 2010057184 A2 (THE BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL INC.) 20-05-2010, todo el documento.	1-14
A	WO 2010022210 A2 (PXBIOSCIENCES LLC) 25-02-2010, todo el documento.	1-14

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
14.05.2012

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/6

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.05.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 2-14	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007141005 A1	13.12.2007
D02	ALBA, F. et al, <i>Arch. Neurobiol.</i> , (1989), <u>52</u> (4): 169-73.	1989
D03	LISOWSKA-MYJAK B., <i>Blood Purif.</i> , (May 2010), <u>29</u> (4): 357-65. Epub: 14-04-2010.	14-04-2010
D04	BAGSHAW, S.M. et al., <i>Intensive Care Med.</i> , (2007), <u>33</u> (7): 1285-96.	2007
D05	TROF, R.J. et al., <i>Shock</i> , (2006), <u>26</u> (3): 245-53.	2006
D06	ENDRE, Z.H. et al., <i>Nephrology (Carlton)</i> , (2008), <u>13</u> (2): 91-8.	2008
D07	WO 2010057184 A2	20.05.2010
D08	WO 2010022210 A2	25.02.2010

En D1 se divulga el uso de la glutamil aminopeptidasa humana como diana para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades urológicas.

En D2 se describe un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas.

En D3-D7 se analizan diferentes biomarcadores para el diagnóstico del daño renal agudo.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes)****1.1. Reivindicaciones independientes 1 y 2.**

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 2 consiste en el uso de la glutamil aminopeptidasa para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal y en un método de diagnóstico y/o pronóstico de daño renal basado en la determinación de la actividad glutamil aminopeptidasa en una muestra aislada. En el documento D1 se describe el uso de la glutamil aminopeptidasa humana (también denominada ENPEP, aminopeptidasa A / APA o antígeno de diferenciación renal gp160) como biomarcador para el diagnóstico de diferentes patologías entre las que se incluyen enfermedades urológicas y más concretamente el daño renal agudo. Además, se divulga un método para el diagnóstico de las enfermedades indicadas basado en la cuantificación de la enzima glutamil aminopeptidasa (c.f. D1: página 45, líneas 15-27; página 51, línea 22 - página 52, línea 6; reivindicación 18). Por consiguiente, se considera que el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1 y 2 no es nuevo sobre la base del documento D1.

1.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1 y 2, no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****2.1. Reivindicación 2 en combinación con las reivindicaciones 3-14.**

2.1.1. Se considera que los documentos D1-D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe un método para el diagnóstico de enfermedades urológicas basado en la cuantificación de la enzima glutamil aminopeptidasa mediante anticuerpos específicos y en D2 un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas (c.f. D1: página 51, línea 22 - página 52, línea 6. D2: Materiales y Métodos, Resultados).

2.1.2. 2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 2 en combinación con las reivindicaciones 3-14 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un método de cuantificación de la enzima glutamil aminopeptidasa.

2.1.3. La solución propuesta es el método de la reivindicación 3 basado en determinación de la actividad aminopeptidasa mediante análisis fluorométrico. En el estado de la técnica se ha descrito un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas basado en la hidrólisis de aminoacil-2-naftilamida mediada por una de dichas enzimas y la liberación del fluoróforo 2-naftilamina (cf. D2).

Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1-D2, junto con los conocimientos de uso y aplicación habitual en este campo de la biotecnología recogidos en D3-D8 se concluye que la solución propuesta por la solicitud al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por consiguiente, el objeto de reivindicación 2 en combinación con las reivindicaciones 3-14 se considera que no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 2-14 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.