



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 320 287**

② Número de solicitud: 200501201

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.05.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

Fecha de la concesión: **18.02.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **03.03.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**03.03.2010**

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada  
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES  
Universidad de Jaén**

⑱ Inventor/es: **Alba Aragüez, Francisco;  
Vives Montero, Francisco;  
Morales Gordo, Blas;  
Barrero Hernández, Francisco;  
Banegaqs Font, Inmaculada;  
Prieto Gómez, Isabel y  
Ramírez Sánchez, Manuel**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Parkinson.**

㉒ Resumen:

Método de diagnóstico serológico de la enfermedad de Parkinson basado en la determinación de actividad de aminopeptidasas séricas utilizando sustratos de aminopeptidasas como reactivos mediante la medida de la fluorescencia o absorbancia producida por los productos obtenidos por la acción hidrolítica de tales enzimas.

ES 2 320 287 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Parkinson.

5 **Sector de la técnica**

Diagnóstico Clínico.

**Estado de la técnica**

10

Los enzimas proteolíticos son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El término es básicamente sinónimo a los de proteasas, proteinasas y peptidasas, si bien este último se aplica preferentemente a aquellos enzimas que utilizan péptidos (breves cadenas de aminoácidos) como sustratos. Estos enzimas se suelen dividir en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actúan preferentemente sobre enlaces alejados de los extremos de dicha cadena. Debido a la amplia especificidad de sustrato de muchos de estos enzimas y a la aparición de proteinasas que forman parte de complejos multicatalíticos (proteasomas), se tiende a agrupar a estos enzimas de acuerdo con su actividad más que a definirlos por sus características estructurales, ya que un mismo enzima puede actuar sobre diferentes sustratos (Figura 1).

20

Las exopeptidasas que requieren un grupo alfa-amino libre de los péptidos se denominan aminopeptidasas (AP) si liberan aminoácidos individuales, dipeptidil aminopeptidasas, si liberan dipéptidos, y tripeptidil aminopeptidasas si liberan cadenas de tripéptidos. Además, las exopeptidasas que requieren un grupo carboxílico terminal no sustituido de los péptidos se denominan carboxipeptidasas, si liberan aminoácidos libres y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos intactos.

25

Los nombres dados a la mayoría de las AP se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un particular aminoácido N-terminal. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces donde la alanina sea el aminoácido N-terminal se denominaría alanil aminopeptidasa (o alanina aminopeptidasa). Similarmente, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos se utilizan para identificar sus requerimientos o preferencias por un residuo C-terminal.

30

Nuestro equipo de investigación ha observado que los niveles séricos de ciertas aminopeptidasas se alteran de manera significativa en pacientes con enfermedad de Parkinson. Estos enzimas tienen funciones reguladoras sobre diversos péptidos circulantes y además pueden ser útiles para el diagnóstico de enfermedades del sistema nervioso central. A continuación se describen algunas de ellos.

35

*Alanina aminopeptidasa* (AlaAP) (EC 3.4.11.14) (aminopeptidasa M). Cataliza la liberación de aminoácidos N-terminales de dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y diferentes aminoácil-2-naftilamidas (arilamidas), con preferencia por derivados de la alanina, metionina, fenilalanina y en menor medida, otros aminoácidos. Se encuentra en gran cantidad de tejidos y fluidos corporales y su pH óptimo es de 7.4. Varios isoenzimas órgano-específicos se localizan en suero. La mayoría de la actividad circulante se cree que procede del hígado, mientras que la actividad encontrada en orina, parece que tiene su origen en el riñón. Sus niveles séricos están elevados en ciertas patologías, como adenocarcinoma de colon y páncreas, síndrome nefrótico y también en el embarazo. Su actividad aumenta también significativamente en enfermedades hepato-biliares. Además la AlaAP puede hidrolizar bradicinina, encefalinas y también ha sido descrita como actividad angiotensinasa. La AlaAP está elevada durante la infancia y disminuye después de la pubertad. Sus valores son mayores en hombres que en mujeres y se ha descrito que su actividad se incrementa con el consumo de alcohol, drogas y tabaco.

40

45

50

*Cistina aminopeptidasa* (CysAP) (EC 3.4.11.3) hidroliza los enlaces peptídicos entre una cistina N-terminal y el residuo adyacente. En el caso de la oxitocina, su presunto sustrato fisiológico, el residuo adyacente es la tirosina. Por la acción de éste enzima se destruye la actividad biológica de esta hormona neurohipofisaria. Exhibe una amplia especificidad sobre diferentes aminoácil-2-naftilamidas. Es insensible a la bestatina y a aminoácidos hidrofóbicos, a diferencia de otras AP séricas. Se ha localizado exclusivamente en el plasma de mujeres embarazadas y en la placenta humana y de otros primates. Sin embargo, el suero fetal y el fluido amniótico están libres de esta actividad enzimática. Sólo se han encontrado trazas en sangre de mujeres no embarazadas y ninguna en sangre de hombres. La placenta es una fuente rica en enzimas, pero la cistinil aminopeptidasa es una de las pocas relativamente específicas de este tejido. Se cree que estos niveles elevados de CysAP son los responsables de prevenir un comienzo prematuro de las contracciones uterinas mediante la destrucción de la oxitocina. En los embarazos anormales, el aumento de la actividad de CysAP es a menudo inadecuado y errático. Cada vez se piensa más que la medida de actividad de CysAP sérica en mujeres embarazadas durante el curso de su embarazo puede servir como indicador de la función feto-placentaria y su desarrollo, y que esta medida podría reemplazar otros métodos laboriosos que requieren la determinación de estrógenos totales urinarios o de pregnandiol. En este sentido, la aspartato aminopeptidasa, que también posee actividad angiotensinasa, muestra un descenso significativo en casos de pre-eclampsia. También se ha descrito que la CysAP aumenta en sueros de mujeres con adenocarcinoma ovárico, pero esto no está del todo demostrado. Hay que indicar además, que se ha descrito la actuación de la CysAP sobre la vasopresina neurohipofisaria, aunque también podríamos sugerir su actuación sobre otros péptidos cuyo residuo N-terminal es la cistina, como es el caso de las endotelinas.

60

65

## ES 2 320 287 B1

*Glutamato aminopeptidasa* (GluAP) (EC 3.4.11.7) (aminopeptidasa A) (angiotensinasa A). Cataliza específicamente la hidrólisis de residuos no sustituidos de Glutamil- y Aspartil-2-naftilamidas y de péptidos. Se inhibe por agentes quelantes como EDTA y EGTA así como por amastatina. También la inhiben  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ . Es activada por  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  y ligeramente por  $Mg^{2+}$  y su pH óptimo es de 7.5. Se encuentra en suero y diferentes órganos de animales y es probablemente la aminopeptidasa responsable de la rápida destrucción de la angiotensina II. El incremento de la angiotensinasa observado durante el embarazo puede atribuirse probablemente al aumento de la síntesis de este enzima por la placenta. La aminopeptidasa A parece estar fundamentalmente unida a membrana y muy distribuida en tejidos corporales pero es especialmente abundante a nivel renal. La única aminopeptidasa que ha sido descrita como específica para aminoácidos dicarboxílicos es la GluAP y no hidroliza derivados de arilamidas que contengan aminoácidos diferentes al glutámico o al aspártico, siendo esta actividad extensible a las angiotensinas naturales.

*Aspartato aminopeptidasa* (AspAP) (EC 3.4.11.-) (angiotensinasa). Cataliza la hidrólisis del aminoácido N-terminal de péptidos y arilamidas, siempre que éste sea un aminoácido dicarboxílico. Los restos aspartilos son hidrolizados más rápidamente que los restos glutamilos y no afecta a otros aminoácidos. Tiene un pH óptimo de actuación, de 7.5 y es activada por  $Mn^{2+}$ , pero, a diferencia de la GluAP, no se afecta por  $Ca^{2+}$ , ni es inhibida por EDTA. Al igual que la GluAP, la AspAP parece ser un enzima fundamentalmente unido a membrana y muy abundante a nivel renal. Su rápida acción sobre los residuos de ácido aspartilos N-terminales de los péptidos sugiere, al igual que la GluAP, una posible función fisiológica en la degradación de la angiotensina II y su conversión en angiotensina III. Pero además, la AspAP tiene el potencial de actuar sobre residuos de Asp amino-terminales de péptidos diferentes a la Ang II, como podrían ser el octapéptido colecistocinina (26-33) o el tetrapéptido colecistocinina (26-29). Por último, como señalábamos anteriormente, la aspartato aminopeptidasa muestra un descenso significativo en casos de pre-eclampsia.

Los enzimas proteolíticos gozan de un interés muy extendido entre la comunidad científica debido a que pueden ser utilizados como herramientas muy valiosas desde diversos puntos de vista. Para los químicos y clínicos, las proteasas son herramientas o sondas para estudiar la estructura de las proteínas, o para relacionarlas con procesos patológicos. Para los bioquímicos o fisiólogos, su interés se dirige hacia el estudio de las propiedades intrínsecas de éstos enzimas y para el análisis de las modificaciones que inducen en los sistemas fisiológicos. Los enzimas proteolíticos están implicados en múltiples e importantes procesos fisiológicos que van desde la activación o inactivación de péptidos biológicamente activos, hasta la completa disolución proteica en sus componentes amino ácidos y han llegado a ser objetivos de un amplio rango de investigaciones básicas y también aplicadas a la terapéutica.

Hay que destacar que, en condiciones fisiológicas, el origen de las aminopeptidasas séricas es hasta ahora desconocido y no hay evidencias de que exista una secreción activa desde uno o diversos tejidos. La aminopeptidasa A o actividad similar, parece estar mayoritariamente unida a la membrana celular, se encuentra muy distribuida en tejidos corporales, siendo especialmente abundante a nivel renal. Sin embargo, esta actividad está también presente a nivel plasmático, aunque su origen es aún incierto. Dado que este enzima parece ser monotópico de membrana y la mayor parte de su estructura encontrarse en contacto con el líquido extracelular (ectoenzima) se ha sugerido que, mediante la escisión de su porción externa (shedding), éste puede llegar a ser soluble en plasma, como también ocurre con el enzima convertidor de angiotensina, que aparece en plasma tras escisión del enzima unido al endotelio vascular. Por otro lado, la mayor parte de la actividad circulante de alanina aminopeptidasa se cree que procede del hígado, probablemente debido al mismo fenómeno de shedding del enzima unido a membrana. Al igual que estos ejemplos, podemos incluir el resto de aminopeptidasas plasmáticas cuyo origen es aún desconocido.

### Descripción de las figuras

Figura 1.- Esquema de la reacción catalizada por aminopeptidasas. AA-2-naftilamida: Aminoacil-2-naftilamida.

Figura 2.- Actividad de aminopeptidasas séricas expresadas en pmoles/minuto/mg de proteínas. Al: Alanil-aminopeptidasa; Cy: Cistinil-aminopeptidasa; As: Aspartil-aminopeptidasa; Gl: Glutamil- aminopeptidasa. \* indica  $p < 0.05$ ; \*\* indica  $p < 0.01$ ; y \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Las barras blancas indican los valores en sujetos controles y las barras rayadas en pacientes con enfermedad de Parkinson.

Figura 3.- Actividad de aminopeptidasas séricas expresadas en pmoles/minuto/mg de proteínas. Gl: Glutamil-aminopeptidasa. C: Valores obtenidos en sujetos controles; T: Pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con L-DOPA; NT: Pacientes de Parkinson no tratados con L-DOPA. \*\*\* indica  $p < 0.001$ .

### Descripción de la invención

#### Técnica

##### I.- Determinaciones enzimáticas

Las actividades enzimáticas de AlaAP y CysAP, se miden fluorimétricamente utilizando como sustratos L-Ala-2-naftilamida y L-Cys-2-naftilamida de acuerdo con el método de Greenberg [Greenberg L. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9:430-455 (1962)], modificado por Alba y cols. [Alba F *et al.* Br. Res. Bull. 31:393-396 (1993)]. Para ello, se utilizan placas negras de 96 pocillos, añadiendo a cada pocillo 25  $\mu$ l de suero. Se incuban a una temperatura entre 20°C y 40°C (preferentemente a 37°C) en 100  $\mu$ l de disolución en dimetilsulfóxido del sustrato (ver tabla 1). A los 30 min. de incubación, la reacción enzimática se detiene mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón acetato 0.1 M (pH 4.2).

## ES 2 320 287 B1

La 2-naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática (Figuras 1 y 2) se cuantifica fluorimétricamente a 412 nm de emisión, con una excitación de 345 nm.

Los valores de fluorescencia obtenidos se transforman en pmoles de 2-naftilamina liberada mediante la lectura en una recta de calibración previamente obtenida tras la determinación de concentraciones crecientes de 2-naftilamina en un medio de solución igual al de la solución sustrato más 100  $\mu$ l de tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. Las actividades se expresan como pmoles de 2-naftilamina liberados por minuto de incubación y por mg de proteínas contenida en la muestra.

Las actividades de GluAP y AspAP se determinan fluorimétricamente utilizando L-Glu-2-naftilamida y Asp-2-naftilamida como sustrato respectivamente.

Se utilizan placas negras de 96 pocillos y en cada pocillo se pipetea 50  $\mu$ l de muestra. Se incuban durante 30 min. a una temperatura entre 20°C y 40°C (preferentemente a 37°C) con 100  $\mu$ l de disolución en dimetilsulfóxido del sustrato (Tabla 1) y a los 30 minutos de incubación, la reacción enzimática se detiene mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón acetato 0.1 M pH 4.2. La 2-naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se cuantifica fluorimétricamente a 412 nm de emisión con una excitación de 345 nm. Los valores obtenidos se calculan en la recta previamente descrita. Las actividades de GluAP y AspAP se expresan como pmoles de 2-naftilamina liberados por minuto de incubación y por mg de proteínas.

Previamente nos aseguramos que la actividad de AlaAP, CysAP, GluAP y AspAP eran lineales frente al tiempo de hidrólisis y frente al contenido en proteínas de la muestra.

### Soluciones sustrato

TABLA 1

*Composición de las soluciones sustrato utilizadas para las determinaciones enzimáticas. NA indica Naftilamida*

	COMPONENTES		TAMPÓN
AlaAP	Ala-2-NA	2.14 mg/100ml	Fosfato 50 mM (pH 7.4)
	Albúmina Bovina	10 mg/100ml	
	DTT	10 mg/100 ml	
CysAP	Cys-2-NA	5.63 mg/100ml	Tris HCl 50 mM (pH 6)
	Albúmina Bovina	10 mg/100ml	
	DTT	10 mg/100ml	
GluAP	Glu-2-NA	2.72 mg/100 ml	Tris HCl 50 mM (pH 7.4)
	Albúmina Bovina	10 mg/100ml	
	DTT	10 mg/100 ml	
	CaCl <sub>2</sub>	0.555 g/100 ml	
AspAP	Asp-2-NA	2.58 mg/100ml	Tris HCl 50 mM (pH 7.4)
	Albúmina Bovina	10 mg/100ml	
	MnCl <sub>2</sub>	39.4 mg/100 ml	

## II.- Determinación de proteínas

Para determinar las proteínas se utiliza el método de Bradford (1976), basado en la afinidad de un colorante (Coomasie azul brillante) por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de absorción de aquel, que se puede medir espectrofotométricamente a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se transforman en mg de proteína, mediante la utilización de una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

## III.- Análisis estadístico

El estudio de las variaciones en la actividad aminopeptidasa entre los pacientes sanos y enfermos de Parkinson se ha realizado mediante el test de la t-Student. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos (como se describe en las Figuras 2 y 3, marcados con \*, \*\* y \*\*\*).

## 15 Resultados de la invención

Las actividades de aminopeptidasas séricas, medidas con los sustratos Ala-2-NA, Cys-2-NA, Asp-2-NA y Glu-2-NA, en individuos normales (n=43) y afectados de Enfermedad de Parkinson (n=57) se muestran en la Figura 2. La actividad media de aminopeptidasas descendió en los enfermos para todos los sustratos determinados, pero sólo la actividad de Cistinil y Glutamil aminopeptidasa fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente). Porcentualmente, la actividad medida con Ala-2-NA en los controles ( $145,05 \pm 15,8$  pmol/min/mg de proteínas) descendió un 21% con respecto a los pacientes controles ( $114,5 \pm 11,8$  pmol/min/mg de proteínas), 38% en el caso de Cys-2-NA ( $57,1 \pm 5,1$  frente a  $35,6 \pm 4,4$  pmol/min/mg de proteínas), 20% para Asp-2-NA ( $80,7 \pm 5,7$  frente a  $64,6 \pm 5,4$  pmol/min/mg de proteínas) y un 31% cuando el sustrato utilizado era Glu-2-NA ( $167,7 \pm 14,4$  frente a  $115,7 \pm 6,3$  pmol/min/mg de proteínas) (Figura 2).

La actividad de aminopeptidasas medidas con los sustratos Cys-2-NA y Glu-2-NA desciende en los casos de enfermedad de Parkinson y su determinación en suero podría discriminar a los individuos enfermos de los normales. Disponemos, por primera vez, de una determinación analítica que cumple tal objetivo, lo cual resulta de enorme importancia sobre todo para el diagnóstico diferencial con otros tipos de afecciones neurodegenerativas.

Por otro lado, los decrementos de actividad de aminopeptidasas séricas no se deben a un efecto de la administración de L-DOPA a éstos pacientes, puesto que tanto los enfermos tratados como los no tratados experimentan un descenso de la actividad enzimática en suero (Figura 3).

**REIVINDICACIONES**

5 1. Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas que utiliza la determinación de la actividad de aminopeptidasas séricas para el diagnóstico **caracterizado** por utilizar aminoacil-2-naftilamidas como reactivos de diagnóstico.

10 2. Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas **caracterizado** por utilizar aminoacil-2-naftilamidas como reactivos de diagnóstico mediante la detección de la fluorescencia de la 2-naftilamina liberada por la acción hidrolítica de aminopeptidasas.

15 3. Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque una disolución en dimetilsulfóxido del sustrato empleado, debidamente suplementada, se mezcla con la cantidad apropiada de suero o plasma a analizar, incubando a una temperatura de entre 20° y 40°C un tiempo adecuado, tras el cual se detiene la reacción por adición de buffer acetato.

4. Kit de diagnóstico serológico de la enfermedad de Parkinson que comprende los siguientes componentes:

- 20 a. Aminoacil-2-naftilamidas
- b. Albúmina bovina
- c. Ditioneitol (DTT)
- 25 d. Cloruro cálcico (Ca Cl<sub>2</sub>)
- e. Cloruro de manganeso (Mn Cl<sub>2</sub>)
- f. Tampón Fosfato 50 mM (pH 7.4)
- 30 g. Tampón Tris HCl 50 mM (pH 6)
- h. Tampón Tris HCl 50 mM (pH 7.4)
- 35 i. Tampón acetato 0.1 M (pH 4.2).

40

45

50

55

60

65

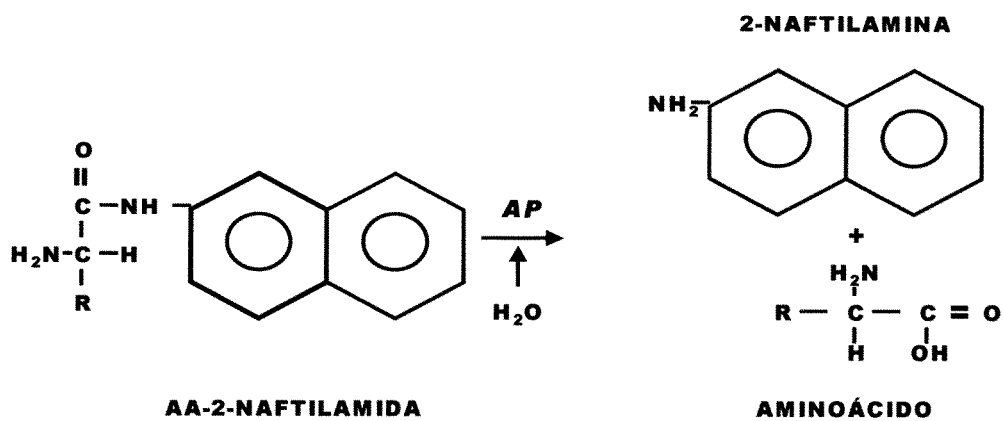


Figura 1

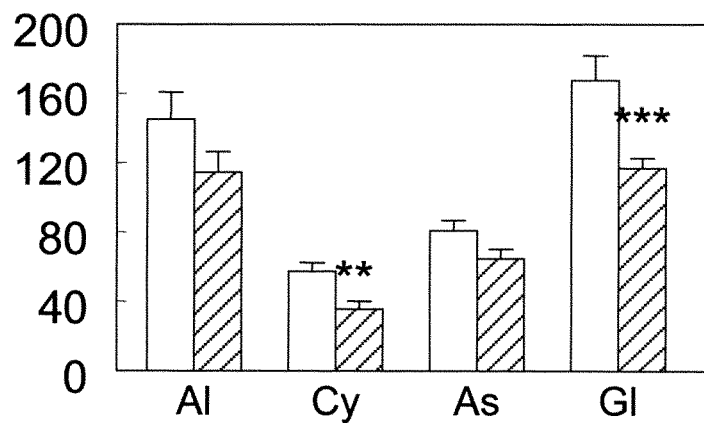


Figura 2

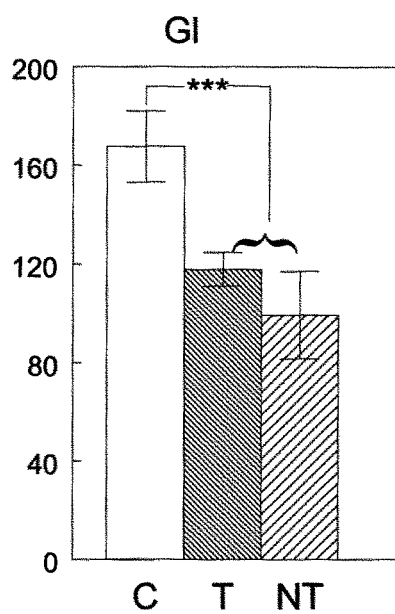


Figura 3





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 320 287

② Nº de solicitud: 200501201

③ Fecha de presentación de la solicitud: **06.05.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/37** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BANEGAS, I., PRIETO, I., VIVES, F. et al. Plasma aminopeptidase activities in rats after left and right intrastratial administration of 6-hydroxydopamine. Neuroendocrinology. 2004, Vol. 80, Nº 4, páginas 219-224. ISSN 0028-3835.	1-4
X	BANEGAS, I., RAMÍREZ, M., VIVES, F. et al. Aminopeptidase activity in the nigrostriatal system and prefrontal cortex of rats with experimental hemiparkinsonism. Enero 2005, Vol. 37, Nº 1, páginas 53-55. ISSN 0018-5043.	2
A		1,3,4
A	ES 2070715 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.06.1995, todo el documento.	1-4

#### 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  
27.04.2009

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/1