



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 316 544**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02703426 .3**

(96) Fecha de presentación : **01.03.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1414991**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

(54) Título: **Procedimiento para ensayar la actividad acetiladora de amantadina de la espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa (SSAT).**

(30) Prioridad: **02.03.2001 US 272322 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

(73) Titular/es: **The University of Manitoba
Industry Liaison Office, 631 Drake Centre
Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, CA**

(72) Inventor/es: **Sitar, Daniel, S. y
Bras, Alvaro, P., M.**

(74) Agente: **López Martínez, José Antonio**

ES 2 316 544 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

Procedimiento para ensayar la actividad acetiladora de amantadina de la espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa (SSAT).

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para ensayar la actividad de la enzima espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) usando un sustrato de la SSAT detectando las formas acetiladas del sustrato de la SSAT. El sustrato de la SSAT es la amantadina, en el que el metabolismo de la amantadina se produce en parte por acción de la enzima inducible SSAT para producir el metabolito acetilado M-acetilamantadina.

Antecedentes de la invención

La amantadina se sintetizó por primera vez en los laboratorios Du Pont en 1960 (Davies y col., 1964) y tiene una estructura alifática policíclica única, con una amina primaria acquiral que hace que sea una base débil (pKa = 10,1). A pH fisiológico, existe principalmente en forma catiónica. La amantadina se ha usado como un adyuvante en el alivio sintomático de la enfermedad de Parkinson y para la profilaxis y tratamiento de la infección por el virus influenza A, las dos indicaciones clínicas aprobadas para la adamantina en Canadá.

La primera publicación que se dirigía al metabolismo de la amantadina era de Bleidner y col. Exponían que no había pruebas de las formas acetiladas o metiladas de la amantadina en la orina humana u otros picos extraños que se pudieran atribuir a metabolitos del fármaco (Bleidner y col., 1965). Este criterio se aceptó y formó la base de opinión relativa al metabolismo de la amantadina y la suposición de que la absorción oral incompleta podía dar cuenta de parte de la dosis no recuperada. Más recientemente, las pruebas han indicado que la amantadina es acetilada por una acetiltransferasa específica.

Metabolismo de la amantadina

Koppel y Tenczer (1985) proporcionaron la primera prueba de la disposición metabólica de la amantadina en seres humanos. Estos investigadores publicaron que de 5 a 15% de la dosis administrada (200 mg) se recuperaba en la orina como acetilamantadina en tres voluntarios varones jóvenes sanos. Además, publicaron la existencia de otros metabolitos minoritarios, que no fueron cuantificados. Sugerían que otras rutas metabólicas minoritarias podían estar implicadas en la N-metilación, formación de bases de Schiff y N-formiatos. No había pruebas de la oxidación del anillo de adamantano (Koppel y Tenczer, 1985). Esta observación fue ampliada por Sitar y col., cuando publicaron que la acetilación de la amantadina no se correlacionaba con el fenotipo acetilador de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2). Esta observación sugería, que la NAT2 no era la enzima acetiltransferasa que catalizaba esta reacción de conjugación (Sitar y col., 1991). Además, Bras y col. (1998) publicaron que la acetilación de la amantadina podía ser efectuada por acetiltransferasas distintas de la N-acetiltransferasa 1 (NAT1) o la NAT2.

Espermidina/espermina acetiltransferasa (SSAT)

La espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) está distribuida de forma ubicua en los tejidos de mamíferos y tiene una función en el catabolismo y eliminación de poliaminas de las células (Cohen, 1998; Morgan, 1998). Sin embargo, en los tejidos de mamíferos normales o no inducidos, la SSAT está presente en niveles muy bajos (Casero y Pegg, 1993; Cohen, 1998). La SSAT es una enzima inducible que cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la acetil-coenzima A al resto aminopropilo de poliaminas. Esta acción de la SSAT facilita la degradación de la poliamina, excreción, ciclación y/o ciclación intracelular (Casero y Pegg, 1993). De esta forma la SSAT participa en el mantenimiento de la homeostasis de poliaminas en células de mamíferos.

Regulación de la SSAT

La inducción de la SSAT puede ser causada por diferentes fármacos, factores de crecimiento, poliaminas, análogos de poliaminas, sustancias tóxicas, hormonas y estímulos fisiológicos (Casero y Pegg, 1993). Todos podrían causar la inducción, pero la inducción se produce en diferentes tiempos para cada compuesto individual. La regulación de la expresión de la SSAT se produce a los niveles de la transcripción, estabilidad del ARNm, traducción del ARNm y estabilidad de la proteína (Fogel-Petrovic y col., 1997).

El gen de la SSAT contiene un elemento sensible a poliamina situado en una región que está en -1522 a -1492 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de SSAT (Wang y col., 1998). En esta secuencia de 31 pares de bases, el elemento de respuesta a poliamina se identificó como una secuencia de 9 pares de bases. El elemento de respuesta a poliamina media la inducción de transcripción de la SSAT por el análogo de poliamina N¹,N¹²-bis(etil)espermina o poliaminas naturales (Wang y col., 1998).

La SSAT, la enzima limitante de la velocidad en la ruta catabólica, tiene una función reguladora en el mantenimiento de la homeostasis de espermidina y espermina. Se ha calculado que están presentes menos de 1000 moléculas de SSAT en un hepatocito de rata, comparado con 60.000 moléculas en una célula inducida (Matsui y, Pegg, 1981; Pegg y

col., 1982). La inducción de tejidos de mamíferos por diferentes inductores puede dar como resultado niveles elevados de SSAT que a su vez pueden servir como un potencial acetilador de compuestos que contienen amina primaria.

La inducción o sobreexpresión de SSAT normalmente es necesaria para que haya presente suficiente enzima SSAT en las células o el líquido sobrenadante de 100.000 x g, antes de que se puedan llevar a cabo satisfactoriamente experimentos *in vitro* (Casero y Pegg, 1993; Fogel-Petrovic y col., 1997; Matsui y Pegg, 1980; Pietilla y col., 1997).

Por lo tanto, aunque la bibliografía enseña que la SSAT es una enzima de acetilación específica para sustratos que incluyen la espermina y la espermidina o sus análogos, no se entendió la actividad de la SSAT, la cinética enzimática de la SSAT y la metodología de ensayo para sustratos de la SSAT no espermina/espermidina. Existen procedimientos actuales para cuantificar la actividad de la SSAT, sin embargo, estas técnicas dependen de personal muy experto e implican procedimientos experimentales complicados. Más específicamente, es necesaria una metodología de ensayo que cuantifique la actividad de SSAT por la detección de formas acetiladas de sustratos de la SSAT no espermina/espermidina, incluyendo la amantadina que se puede usar para detectar diferentes afecciones patológicas.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la actividad de la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) en un mamífero, que comprende la etapa de ensayar en una muestra obtenida del mamífero el nivel de una forma acetilada de un sustrato de la SSAT no espermina/espermidina en la muestra y en el que el sustrato de la SSAT es la amantadina y la forma acetilada de un sustrato de la SSAT es la acetiladamantina. El procedimiento puede incluir incubar el sustrato de la SSAT con el mamífero o tejido o células de mamífero con un nivel de dosificación de sustrato de la SSAT específico, preferiblemente en el intervalo de 1-4 mg/kg y más preferiblemente 3 mg/kg. Las muestras que se van a ensayar pueden ser muestras de orina y/o sangre del mamífero que se pueden recoger a las 2-24 h después de incubación del sustrato y preferiblemente a las 8 horas después de incubación.

El nivel relativo del sustrato de la SSAT no espermina/espermidina en la muestra preferiblemente se correlaciona con una curva patrón que representa los niveles de actividad conocidos, y se puede ensayar mediante una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a cromatografía de gases, radiomarcaje, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de capa fina.

En otra realización de la invención, el procedimiento de ensayo se usa para correlacionar la actividad de la SSAT con afecciones patológicas en el mamífero, que incluyen carcinoma gástrico, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de pecho, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de próstata o consumo de alcohol.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe con referencia a los dibujos en los que:

La Figura 1 representa la disposición metabólica de la amantadina (adaptado de Köppel y Tenczer (1985)). 1. Amantadina, 2. N-acetilamantadina (metabolito mayoritario), 3. N-metilamantadina, 4. N,N¹-dimetilamantadina, 5. N-metilenamantadina, 6. N-formilamantadina, 7. y 8. posible oxidación por pasos de la N-dimetilamantadina (4), 9. N-etilidenamantadina, 10. acetato de 1-adamantol.

La Figura 2 es una gráfica de la excreción urinaria de acetilamantadina de ratones transgénicos que sobreexpresan la SSAT y a los que se ha inyectado amantadina. HCl (3 mg/kg). Los ratones no transgénicos de control que sufren los mismos procedimientos no excretaban acetilamantadina en su orina. Los valores indicados son la media $\pm$ E.T. de 4 experimentos separados.

La Figura 3 es una gráfica representativa de V frente a S que demuestra la acetilación de la espermidina por el líquido sobrenadante de 100.000 x g de hígado de ratón transgénico que contiene SSAT con K_m aparente = 263 μ M y $V_{m\acute{a}x}$ = 0,010 nmol/min/mg de proteína (r^2 = 0,99). La adición de una concentración terapéutica (2,5 μ M) de amantadina (A) produce la inhibición de la acetilación de la espermidina y un aumento de la K_m aparente a 542 μ M y de $V_{m\acute{a}x}$ a 0,014 nmol/min/mg de proteína (r^2 = 0,99).

La figura 4 es una gráfica representativa de la inhibición de la producción de acetilespermidina por concentraciones crecientes de amantadina en presencia de espermidina 50 μ M. La acetilación de la espermidina es inhibida completamente por amantadina 10.000 μ M.

La Figura 5A es una gráfica de Dixon representativa de 1/v frente a [I], que muestra la inhibición de la producción de acetilespermidina por concentraciones [I] crecientes de amantadina en presencia de espermidina 50 μ M y 200 μ M. La intersección de las dos líneas a la izquierda del eje y, y por encima del eje x negativo indica que la inhibición podría ser competitiva o inhibición mixta.

La Figura 5B es una gráfica de Cornish-Bowden representativa de S/v frente a [I] de los mismos datos mostrados en la Figura 5A. Las dos líneas paralelas en la gráfica indican inhibición competitiva.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención y con referencia a las figuras, se describe un procedimiento para ensayar la actividad de la SSAT para modelos *in vitro* e *in vivo*.

Experimentos

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la SSAT es una enzima responsable de la acetilación de la amantadina.

Estudios con animales transgénicos

Se generaron ratones transgénicos CD2F1 que sobreexpresaban la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) en el A.I. Virtanen Institute for Molecular Sciences (University of Kuopio, Kuopio, Finlandia). La construcción transgénica para estos ratones era de una secuencia genómica aislada de la biblioteca genómica de ratón 129 SVJ como se ha descrito previamente (Marko Pietilä y col., 1997). Los ratones transgénicos se reprodujeron y se mantuvieron en el Grace Cancer Drug Center (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York). Los ratones no transgénicos CD2F1 se obtuvieron de Charles River Laboratories (St. Cinstant, Quebec, Canadá).

Experimentos in vivo

Se inyectó a ratones CD2F1 tanto transgénicos como no transgénicos por vía subcutánea una dosis de 3 mg/kg de amantadina-HCl (0,5 mg/ml). La solución madre de amantadina para inyección se preparó disolviendo la amantadina-HCl en solución salina normal para inyección. Después, la solución se filtró en un vial estéril usando un filtro de 0,22 μ GV Millex (Millipore Canada, Ontario) y se almacenó a 4°C. Los ratones se pusieron en jaulas metabólicas separadas. Se recogió la orina total y se lavó de los lados de las jaulas metabólicas con DDW a las 3, 6, 9 y 24 h después de la inyección de fármaco. La orina se congeló a -20°C hasta que se analizó la acetilamantadina.

Cromatografía de gas-líquido modificada

La acetilamantadina se cuantificó por cromatografía de gas líquido como se ha descrito previamente (Bras y col., 1998), y se modificó para mejorar la sensibilidad. Los procedimientos modificados usaban extracción en fase sólida como sigue: se cebaron tubos SupelcleanTM ENVITM-18 SP, 3 ml (Supelco, Bellefonte, PA) con 2 ml de metanol y 2 ml de DDW, seguido de 2 ml de tampón de fosfato sódico 0,2 M pH 7,4. Las muestras de orina de ratón de 1,0 ml se mezclaron con 50 μ l de acetanilida (5 mg/ml, disuelta en DDW) como patrón interno y 1,0 ml de tampón. Las muestras se cargaron en las columnas y se dejó que permearan. Las columnas se lavaron con 2 ml de tampón de fosfato sódico 0,2 M seguido de dos lavados de 2,5 ml de DDDW. El exceso de agua se separó a baja presión. La columna se eluyó con 2 ml de acetato de etilo para extraer la acetilamantadina y el patrón interno, y se evaporó con una corriente de nitrógeno a sequedad en una campana extractora de humos a temperatura ambiente. El residuo se reconstituyó con tolueno (35 μ l), se dejó reposar durante 30 min, y se mezcló durante 2 min. Las muestras (1 μ l) del residuo reconstituido se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie II usando helio como gas vehículo y una columna capilar de película fina Hewlett Packard de alto rendimiento (goma de metil-silicona reticulada) de 25 m x 0,2 mm x 0,3 μ m. La temperatura del detector era 250°C, la del puerto de inyección 250°C y la temperatura del horno se programó de modo que la temperatura inicial era de 150°C durante 2 min, y después aumentaba 10°C/min a 200°C y se mantenía durante 1 min, aumentaba 70°C/min hasta 240°C y se mantenía durante 15 min. Se usó un detector específico de nitrógeno.

Las curvas patrón para la acetilamantadina se obtuvieron del blanco de orina (diluida 1:10) con DDW o de plasma (para estudios de metabolismo subcelular), a los que se añadieron cantidades conocidas de acetilamantadina. El intervalo de concentración de las curvas de calibración tanto para la orina como para el plasma eran de 6,25 - 800 ng/ml. Los ensayos de plasma y orina para cuantificar la acetilamantadina se llevaron a cabo por duplicado. Los duplicados que diferían en más de 10% se volvieron a analizar. Las muestras de orina fuera del intervalo de calibración se diluyeron y se volvieron a analizar. En la orina r^2 era 0,99 y C.V. = 10% (n = 6). En el plasma, r^2 era 0,98 y C.V. = 16% (n = 3) a lo largo de un periodo de 11 meses.

Se pueden incorporar otros procedimientos de ensayo para medir los niveles de acetilamantadina como puede entender el experto en la materia, incluyendo el radiomarcaje, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de capa fina.

Preparación de la enzima

Se anestesiaron ratones CD2F1 macho transgénicos y no transgénicos que pesaban 25 a 38 g, con pentobarbital sódico (200 mg/kg) inyectado por vía intraperitoneal. Se llevó a cabo una laparotomía mediante la cual se sacrificaron los ratones seccionando la aorta, y se sacó inmediatamente el hígado y se puso en tampón de Tris enfriado con hielo que contenía sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5 (pH ajustado usando NaOH)), KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM y se modificó para incluir EDTA 1 mM y DTT 2,5 mM para mejorar la estabilidad enzimática en la homogeneización del hígado. El hígado se secó con papel secante, se pesó y se picó fino con un cortador de tejidos (Mickle Lab. Engineering Co. Ltd., Gomshall, Surrey, Reino Unido) a 4°C. El tejido picado se puso en dos volúmenes de tampón

de Tris y se homogeneizó usando un homogenizador Polytron (Kinematica GMBH, Lucerne, Suiza) durante 2 min con un ajuste de la potencia a 6. El homogeneizado se centrifugó a 100.000 x g durante 1 h a 4°C (ultracentrífuga refrigerada automática Beckman L8-80M, con rotor de centrifuga T80) y el líquido sobrenadante sirvió como fuente de espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT). La proteína del líquido sobrenadante se determinó usando un procedimiento con reactivo de Biuret, como sigue: se mezclaron 30 µl de líquido sobrenadante con 120 µl de DDW y 600 µl de reactivo de Biuret, proporcionando una dilución de cinco veces del líquido sobrenadante, y se comparó con una curva patrón construida usando albúmina de suero bovino cristalina con un intervalo de concentraciones entre 1 y 10 mg/ml. Se dejó que se desarrollara el color durante 30 min y después se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Pharmacia Biotech Ultraspec 4000, Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd., Milton Road, Cambridge, Reino Unido). La dilución del líquido sobrenadante era necesaria para prevenir que el tampón de homogeneización de Tris interfiriera con el ensayo de Biuret. Para confirmar que no se producía interferencia, se llevó a cabo un experimento en el que la albúmina de suero bovino se mezcló con tampón de homogeneización de Tris o agua para dar la misma concentración de proteína (10 mg/ml). La mezcla de albúmina de suero bovino y tampón de Tris se diluyó 5x como se ha descrito antes y se comparó con la albúmina mezclada con agua después de mezclar con reactivo de Biuret y se dejó que revelar durante 30 min. Los resultados eran idénticos para ambos (no se muestran los datos), lo que indicaba que este procedimiento proporcionaba resultados sin interferencia del tampón de Tris.

Procedimientos de ensayo de acetilación de espermidina

Los ensayos de acetilación de espermidina se completaron midiendo la incorporación de radiactividad de [acetil-1-¹⁴C]-acetil-CoA como sigue: se prepararon tubos por triplicado por adición de 20 µl de espermidina disuelta en tampón de Tris-HCl de modo que las concentraciones en un volumen final de incubación de 100 µl eran entre 50 y 1000 µM para la espermidina, y Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 a 37°C (pH ajustado con NaOH). Se añadió a los tubos una solución (20 µl) que contenía 40 nCi de [acetil-1-¹⁴C]-acetil-CoA disuelta en DDW. El líquido sobrenadante se ajustó con tampón de Tris para dar una concentración de proteína en el medio de incubación de 1 mg/ml en un volumen final de incubación de 100 µl. Se prepararon blancos de ensayo en ausencia de espermidina. El ensayo se inició con la adición de líquido sobrenadante de 100.000 x g (60 µl) a los tubos y se incubaron durante 10 min en un baño de agua a 37°C con agitación (80 oscilaciones/min) en un incubador Haake SWB 20 (Fisons Instruments, Haake Mess-Technik GmbH, Karlsruhe, Alemania). La reacción se terminó por adición de 20 µl de solución acuosa enfriada con hielo de hidroxilamina-HCl 1 M; los tubos se mezclaron brevemente con un mezclador de tipo vortical, y se pusieron sobre hielo. Después la mezcla de reacción se puso en un baño de agua hirviendo durante 3 min. Los tubos se centrifugaron a 12.000 x g durante 3 min para sedimentar la proteína (microcentrífuga Fisher Scientific modelo 235c). Se aplicó una parte alícuota del líquido sobrenadante resultante de la incubación (50 µl) y se dejó que permeara en discos de papel de fosfato de celulosa de 2,5 cm (Whatman, P-81, Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido) que previamente se había humedecido con DDW y se pusieron en una caja de vacío. Se aplicó presión negativa y los discos se lavaron 5 veces con DDW, seguido de tres veces con 1,0 ml de etanol al 95% en v/v. Los discos secados se pusieron en viales de centelleo que contenían 4 ml de líquido de centelleo Ready Safe (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) y se hizo el recuento en un contador de centelleo Beckman modelo LS6000TA (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Para determinar la actividad de SSAT, se restó la radiactividad no específica de los blancos de la radiactividad total de las muestras que contenían la espermidina añadida.

Estudios de inhibición

La inhibición de la acetilación de la espermidina por la SSAT se determinó por la adición de amantadina, 1 a 10.000 µM, a concentraciones fijadas de espermidina, de 50 a 80 µM. Se añadieron el sustrato selectivo de NAT1 PABA con un intervalo de concentraciones de 200, 500 y 1000 tM o el sustrato selectivo de NAT2 SMZ con un intervalo de 200, 500 y 700 µM a tubos que contenían espermidina (200 µM) y los reactivos de acetilación descritos antes. Se disolvieron el PABA y la SMZ en solución de tampón de Tris-HCl con DMSO al 4%. El PABA y la SMZ se disolvieron primero en DMSO al 100% y después se diluyeron usando tampón de Tris-HCl a la concentración deseada de los sustratos; la concentración final de DMSO dependía del volumen de tampón usado para la dilución. Para estar seguros de que el DMSO no interfería con la SSAT, se llevaron a cabo simultáneamente dos controles que contenían espermidina 200 µM disuelta en tampón de Tris-HCl con y sin DMSO. Se cuantificó la acetilación de la espermidina como se ha descrito antes. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Ensayo de acetilación de la amantadina in vitro

La amantadina se incubó con líquido sobrenadante de 100.000 x g de hígado de ratón transgénico como fuente de SSAT. Se usó un sistema de regeneración de acetil-CoA como fuente de acetato (Andres y col., 1985). El ensayo se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. El tampón de ensayo contenía Tris-HCl 225 mM, EDTA 4,5 mM y DTT 4,5 mM (pH 7,5 a 37°C). En resumen, se añadieron a los tubos 100 µl de acetil-CoA (1 mM en DDW) y 100 µl de sistema de regeneración de acetil-CoA (acetil-DL- carnitina-HCl 5,4 mg/ml y 1 U/ml de carnitina acetiltransferasa disuelta en tampón de ensayo). Después se disolvieron 200 µl de amantadina (50, 100, 20011M) o una mezcla de amantadina y SMZ (2500 µM) en tampón de Tris-HCl (pH 7,8), y se añadieron de forma que la concentración final de incubación del tampón fuera 100 mM en el volumen final de 100 µl. Para iniciar la reacción, se añadieron 600 pi de líquido sobrenadante y se incubaron durante 10 min a 37°C. La reacción se paró por la adición de 200 µl de solución acuosa enfriada con hielo de hidroxilamina-HCl 1 M y se puso sobre hielo. La proteína se separó como se ha descrito previamente en la sección de procedimientos de acetilación de espermidina. El líquido sobrenadante resultante de la incubación se congeló a -20°C, hasta que se analizó la acetilamantadina usando cromatografía de gas-líquido.

Análisis de datos

Los datos se expresan como la media $\pm$ ET de al menos tres experimentos. Los valores de K_m y V_{max} aparentes se determinaron por ajuste de regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten con el programa de ordenador (versión 6.0a, Biosoft, Ferguson, MO). Los valores de CI_{50} para la inhibición de la acetilación de la espermidina se determinaron usando procedimientos gráficos de análisis de probit regresivos, para evaluar el tipo de inhibición producida por la amantadina. Se evaluó la excreción urinaria de acetilamantadina en ratones transgénicos por el ensayo t de Student de dos colas. El análisis de regresión se usó para evaluar la actividad inhibidora de PABA y SMZ frente a la acetilación de la espermidina. Las diferencias entre medias con valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas. Se usó el análisis de varianza (ANOVA) para detectar significancia entre múltiples grupos.

Productos químicos y reactivos

La sacarosa, cloruro sódico, ditiotreitól (DTT), cloruro magnésico ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), ácido perclórico, ácido acético glacial, dimetilsulfóxido anhidro, acetonitrilo e hidroxilamina-HCl se adquirieron en Fisher Scientific, (Fisher Chemical, Fair Lawn, New Jersey). La espermidina, Tris-HCl, EDTA, acetyl-coenzima-A (sal sódica), acetyl-DL-carnitina-HCl, carnitina acetyl-transferasa (de músculo pectoral de paloma), sulfametazina (SMZ), ácido p-aminobenzoico (PABA), ácido N-acetyl-p-aminobenzoico (AcPABA), trietanolamina-HCl, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, hidroxitolueno butilado, trietilamina, albúmina de suero bovino y la metil-glioxal-bis-(guanilhidrazona) (MGBG) se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) y la [acetyl-1- ^{14}C]-acetyl-CoA (58,9 mCi/mmol) se adquirió en New England Nuclear (Boston, MA). La amantadina-HCl la proporcionó Dupont Canada Inc. (Mississauga, Ontario, Canadá). La albúmina humana cristalizada se adquirió en Miles Scientific (Naperville, Illinois). La N-acetyl-sulfametazina (AcSMZ) se sintetizó de acuerdo con un procedimiento publicado previamente (Svensson y col., 1991).

Resultados*Experimentos usando ratones transgénicos que sobreexpresan la SSAT Estudios in vivo de acetilación de la amantadina*

Las muestras de orina de ratones transgénicos CD2F1 tratados con amantadina que sobreexpresaban la SSAT demostraron de modo consistente el metabolismo del compuesto original a la acetilamantadina en todos los periodos de tiempo de recogida (Fig. 2). La acetilamantadina excretada en la orina como porcentaje acumulativo de la dosis administrada a las 24 h estaba en el intervalo de 2-6% con una media de $4,5 \pm 1,0\%$.

Estudios in vitro de acetilación de la espermidina

En la figura 3 se muestra una gráfica representativa de velocidad no lineal frente a concentración de sustrato para la acetilación de la espermidina por el líquido sobrenadante de 100.000 x g de hígado de ratón transgénico que contenía SSAT. Los parámetros cinéticos obtenidos indican una K_m aparente de $267 \pm 46 \mu M$ y una V_{max} de $0,009 \pm 0,002$ nmol/min/mg de proteína ($n=10$, ratones diferentes). Usando el líquido sobrenadante de hígado de ratón no transgénico como fuente de SSAT, no se detectó la acetilación de la espermidina.

Estudios de inhibición de la amantadina

Se evaluó la capacidad de la amantadina para inhibir la acetilación de espermidina incluyéndola en incubaciones de espermidina. La adición de una concentración terapéutica de amantadina ($2,5 \mu M$) impedía la acetilación de la espermidina, indicando que podía servir como un sustrato para la enzima SSAT (Fig. 3). Posteriormente, se completaron los estudios de inhibición usando concentraciones fijas de espermidina ($50 \mu M$) y diferentes concentraciones de amantadina en el intervalo de 1 a $10.000 \mu M$. Un perfil de inhibición representativo (Fig. 4) mostraba la inhibición completa de la enzima SSAT con amantadina $10.000 \mu M$. Se usaron los perfiles de inhibición de la amantadina para determinar los valores de CI_{50} para la acetilación de la espermidina. A partir de los valores de CI_{50} , se calculó la constante de disociación del inhibidor (K_i). Los análisis de Dixon y Cornish-Bowden apoyaban la interpretación de que la inhibición por la amantadina de la acetilación de la espermidina estaba de acuerdo con la inhibición competitiva (Fig. 5A y 5B), y el uso de los valores de CI_{50} para calcular K_i . Los valores de CI_{50} y K_i aparentes eran $935 \pm 191 \mu M$ y $738 \pm 157 \mu M$, respectivamente ($n = 13$).

Estudios de acetilación de la amantadina

Los datos *in vivo* mostraron que sólo los ratones macho transgénicos que sobreexpresaban la SSAT excretaban acetilamantadina en su orina. Estos ratones contienen al menos 20 copias del transgén de SSAT, y tienen un nivel de actividad de SSAT en el hígado que es 4 veces mayor que la vista en el hígado de ratones no transgénicos (Pietila y col., 1997), lo que sugiere fuertemente que la SSAT es la enzima que cataliza la acetilación de la amantadina y posiblemente de otros fármacos y xenobióticos que contienen amina primaria.

Además, previamente se publicó que ratas Sprague-Dawley que recibían la misma dosis terapéutica de amantadina no excretaban acetilamantadina en su orina (Goralski y col., 1999). Estos resultados son similares a estudios que muestran que los ratones no transgénicos de la misma cepa que los ratones transgénicos tampoco excretaban acetilamantadina en su orina. Estas observaciones sugieren fuertemente la necesidad de que haya niveles incrementados de

SSAT presentes antes de que se pueda producir la acetilación de la amantadina. El porcentaje de la dosis administrada excretada por el ratón transgénico en su orina como acetilamantadina era similar al mostrado en publicaciones previas en seres humanos (Bras y col., 1998; Koppel y Tenczer, 1985).

Los datos *in vitro* usando el líquido sobrenadante de hígado de ratón transgénico como fuente de SSAT, la implican como enzima que acetila la amantadina, apoyando las observaciones *in vivo*. Los datos demostraron que cuando se incubaba la amantadina con el hígado de ratón transgénico obtenido de líquido sobrenadante en ausencia de espermidina, se producían cantidades modestas de acetilamantadina. Esta observación estaba de acuerdo con que se produjeran cantidades bajas de acetilación en seres humanos cuando ingerían amantadina (Bras y col., 1998; Koppel y Tenczer, 1985). Estas observaciones están apoyadas además por los datos *in vitro* que mostraban que ni NAT1 ni NAT2 podían explicar la acetilación de la amantadina (Bras y col., 1998), lo que sugería que la amantadina es un sustrato específico para la SSAT. En contraste, los ratones no transgénicos tienen niveles bajos inherentes de SSAT en sus hígados; se llevaron a cabo experimentos *in vitro* y no se detectó acetilación de espermidina. Además, la amantadina no se acetiló en otros experimentos *in vitro* usando líquido sobrenadante de pulmón de cerdo como fuente de SSAT. Apoyan estos descubrimientos, los estudios previos usando líquido sobrenadante de hígado obtenido de rata no transgénica y no inducida, que pusieron de manifiesto que no se produjeron niveles detectables de acetilputrescina o acetilespermidina (Blankenship y Walle, 1997; Seiler y al-Therib, 1974). La investigación de la acetilación de la amantadina condujo al descubrimiento de que la SSAT es una enzima de acetilación de fármacos no reconocida previamente. Estos datos sugieren que la amantadina es un sustrato de fármaco nuevo que se puede usar para evaluar y detectar la actividad de la SSAT. La amantadina, que es un sustrato específico para la SSAT, se podría usar para evaluar la contribución de la SSAT a la acetilación de fármaco.

Los fármacos que contienen la estructura de diaminopropano sustituido que se parece a parte de la espermidina, han sido acetilados por la SSAT. Para los experimentos *in vitro* usando SSAT humana expresada en *E. Coli*, Parry y col., demostraron que la SSAT acetiló el agente antitumoral e inmunosupresor 1-desoxiespergualina, un metabolito de la amifostina, el agente radioprotector y quimio protector S-2-(3-aminopropilamino)etanotiol (WR1065), y el inhibidor de la espermina sintasa N-(butil)-1,3-diaminopropano (Parry y col. 1995). Sin embargo, aparte de estos fármacos, no se han publicado otros estudios que examinen fármacos que no sean de diaminopropano sustituido como potenciales sustratos de la SSAT.

Además, en estados patológicos los niveles de poliamina celular aumentan junto con los niveles elevados de N¹-acetilespermidina y poliaminas excretadas en la orina (Morgan, 1998; Russell, 1971; Suh y col., 1997). Los niveles elevados de N¹-acetilespermidina observados en la orina de pacientes de cáncer sugiere una actividad de la SSAT incrementada. Los niveles de actividad de SSAT en tejidos malignos son muy elevados comparados con tejidos normales. Los cánceres con niveles elevados de N¹-acetilespermidina incluyen carcinoma gástrico, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de próstata y otros (Kingsnorth y Wallace, 1985; Pine y col., 1989; Sessa y Perin, 1991; Suh y col., 1997; Takenoshita y col., 1984). La expresión y actividad elevadas de la SSAT vistas en células de cáncer evita que las poliaminas alcancen niveles que serían tóxicos para la célula (Bettuzzi y col., 2000). Las observaciones anteriores apoyan la interpretación de que el aumento de acetilación de sustratos de NAT2 observado en tumores malignos probablemente se debe a niveles elevados de la enzima SSAT.

Referencias

Andres, H.H. & Weber, W.W. (1986). N-acetylation pharmacogenetics. Michaelis-Menten constants for arylamine drugs as predictors of their N-acetylation rates *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.*, 14, 382-5.

Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Carani, C., Madeo, B., Tampieri, A., Corti, A., Saverio, B., Pierpaola, D., Serenella, A., Cesare, C., Bruno, M., Auro, T. & Arnaldo, C. (2000). Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res.*, 60, 28-34.

Blankenship, J. & Walle, T. (1977). Acetylation of spermidine and spermine by rat liver and kidney chromatin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 179, 235-42.

Bleidner, W.E., Harmon, J.B., Hewes, W.E., Lynes, T.E. & Hermann, E.C. (1965). Absorption, distribution and excretion of amantadine hydrochloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150, 484-90.

Bras, A.P., Hoff, H.R., Aoki, F.Y. & Sitar, D.S. (1998). Amantadine acetylation may be effected by acetyltransferases other than NAT1 or NAT2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76, 701-6.

Casero, R.A. & Pegg, A.E. (1993). Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase-the turning point in polyamine metabolism. *Faseb J.*, 7, 653-61.

Cohen, S.S. (1998). A guide to the polyamines. New York: Oxford University Press, Inc. Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., McGahen, J.W., Neumayer, E.M., Paulshock, M., Watts, J.C., Wood, T.R., Hermann, E.C. & Hoffinan, C.E. (1964). Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science*, 144, 862-863.

- Dupret, J.M. & Grant, D.M.** (1992). Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine N-acetyl-transferase expressed in *Escherichia coli*. Evidence for direct involvement of Cys68 in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J. Biol. Chem.*, 267, 7381-5.
- 5 **Fogel-Petrovic, M., Kramer, D.L., Ganis, B., Casero, R.A., Jr. & Porter, C.W.** (1993). Cloning and sequence analysis of the gene and cDNA encoding mouse spermidine/spermine N¹-acetyltransferase--a gene uniquely regulated by polyamines and their analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1216, 255-64.
- 10 **Fogel-Petrovic, M., Kramer, D.L., Vujcic, S., Miller, J., McManis, J.S., Bergeron, R.J. & Porter, C.W.** (1997). Structural basis for differential induction of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase activity by novel spermine analogs. *Mol. Pharmacol.*, 52, 69-74.
- 15 **Goralski, K.B., Smyth, D.D. & Sitar, D.S.** (1999). *In vivo* analysis of amantadine renal clearance in the uninephrectomized rat: functional significance of *in vitro* bicarbonate-dependent amantadine renal tubule trans-port. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290, 496-504.
- 20 **Hickman, D., Palamanda, J.R., Unadkat, J.D. & Sim, E.** (1995). Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Pharmacol.*, 50, 697-703.
- Kingsnorth, A.N. & Wallace, H.M.** (1985). Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancers. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 21, 1057-62.
- 25 **Koppel, C. & Tenczer, J.** (1985). A revision of the metabolic disposition of amantadine. *Biomed. Mass Spectrom.*, 12, 499-501.
- Matsui, I. & Pegg, A.E.** (1980). Effect of thioacetamide, growth hormone or partial hepatectomy on spermidine acetylase activity of rat liver cytosol. *Biochim. Biophys. Acta*, 633, 87-94.
- 30 **Matsui, I. & Pegg, A.E.** (1980). Increase in acetylation of spermidine in rat liver extracts brought about by treatment with carbon tetrachloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 1009-15.
- 35 **Matsui, I., Wiegand, L. & Pegg, A.E.** (1981). Properties of spermidine N-acetyltransferase from livers of rats treated with carbon tetrachloride and its role in the conversion of spermidine into putrescine. *J. Biol. Chem.*, 256, 2454-9.
- Morgan, D.M.L.** (1998). Polyamines. In Polyamine Protocols, ed. Morgan, D.M.L. pp. 3-30. Totowa: Humana Press.
- 40 **Parry, L., Balana Fouce, R. & Pegg, A.E.** (1995). Post-transcriptional regulation of the content of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase by N¹N₁₂-bis(ethyl)spermine. *Biochem J.*, 305, 451-8.
- Pegg, A.E., Seely, J.E., Poso, H., della Ragione, F. & Zagon, I.A.** (1982). Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Fed. Proc.*, 41, 3065-72.
- 45 **Pegg, A.E., Stanley, B.A., Wiest, L. & Casero, R.A., Jr.** (1992). Nucleotide sequence of, hamster spermidine/spermine-N¹-acetyltransferase cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1171, 106-8.
- 50 **Pietila, M., Alhonen, L., Halmekyto, M., Kanter, P., Janne, J. & Porter, C.W.** (1997). Activation of polyamine catabolism profoundly alters tissue polyamine pools and affects hair growth and female fertility in transgenic mice overexpressing spermidine/spermine N¹-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 272, 18746-51.
- 55 **Pine, M.J., Huben, R.P. & Pegg, A.E.** (1989). Production of N¹-acetyl spermidine by renal cell tumors. *J. Urol.*, 141, 651-5.
- Russell, D.H.** (1971). Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nat. New Biol.*, 233, 144-5.
- 60 **Seiler, N.** (1987). Functions of polyamine acetylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65, 2024-35.
- Seiler, N. & al-Therib, M.J.** (1974). Acetyl-CoA: 1,4-diaminobutane N- acetyltransferase. Occurrence in vertebrate organs and subcellular localization. *Biochim. Biophys. Acta*, 354, 206-12.
- 65 **Sessa, A. & Perin, A.** (1991). Increased synthesis of NI-acetylspermidine in hepatic preneoplastic nodules and hepatomas. *Cancer Lett.*, 56, 159-63.
- Sitar, D.S., Hoff, H.R. & Aoki, F.Y.** (1991). Amantadine acetylation in man is not predicted by acetylator phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 49, 156.

Suh, J.W., Lee, S.H., Chung, B.C. & Park, J. (1997). Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 688, 179-86.

Takenoshita, S., Matsuzaki, S., Nakano, G., Kimura, H., Hoshi, H., Shoda, H. & Nakamura, T. (1984). Selective elevation of the N¹-acetylspermidine level in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 44, 845-7.

Tannen, R.H. & Weber, W.W. (1979). Rodent models of the human isoniazid-acetyltransferase polymorphism. *Drug Metab. Dispos.*, 7, 274-9.

Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T.M. & Casero, R.A., Jr. (2001). Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochem. J.*, 355, 45-9.

Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T.M. & Casero, R.A., Jr. (1999). Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional co-factor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene. *J. Biol. Chem.*, 274, 22095-101.

Wang, Y., Xiao, L., Thiagalingam, A., Nelkin, B.D. & Casero, R.A., Jr. (1998). The identification of a cis-element and a trans-acting factor involved in the response to polyamines and polyamine analogues in the regulation of the human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 273, 34623-30.

Xiao, L., Celano, P., Mank, A.R., Griffin, C., Jabs, E.W., Hawkins, A.L. & Casero, R.A., Jr. (1992). Structure of the human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene (exon/intron gene organization and localization to Xp22.1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 1493-502.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar la actividad de no espermina/espermidina de la espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa (SSAT) en un mamífero, **caracterizado** porque comprende la etapa de ensayar en una muestra obtenida del mamífero el nivel de una forma acetilada de un sustrato no espermina/espermidina de la SSAT en la muestra, y en el que el sustrato de la SSAT es la amantadina y la forma acetilada de un sustrato de la SSAT es la acetilamantadina.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque antes de la etapa de ensayar el nivel de una forma acetilada del sustrato de la SSAT, el sustrato de la SSAT se ha incubado con un mamífero, tejido de mamífero o células de mamífero con un nivel de dosificación del sustrato de SSAT específico.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la dosificación del sustrato de la SSAT es equivalente a 1-4 mg/kg.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el sustrato de la SSAT se ha incubado con un mamífero y la muestra es una muestra de sangre o de orina.
- 25 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la muestra de orina se recoge 2-24 horas después de incubación del sustrato de la SSAT con el mamífero.
- 30 6. Un procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la muestra de orina se recoge 8 horas después de la incubación del sustrato de la SSAT con el mamífero.
- 35 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el nivel de una forma acetilada del sustrato no espermina/espermidina de la SSAT en la muestra se correlaciona con un patrón para determinar el nivel relativo de actividad de la SSAT en el mamífero.
- 40 8. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el nivel de una forma acetilada del sustrato no espermina/espermidina de la SSAT se ensaya usando cromatografía de gases.
- 45 9. Un procedimiento para determinar la actividad de la espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa (SSAT) en un mamífero, **caracterizado** porque comprende la etapa de ensayar en una muestra obtenida del mamífero el nivel de una forma acetilada de un sustrato de la SSAT no sustituido con diaminopropano en la muestra, y en el que el sustrato de la SSAT es la amantadina y la forma acetilada de un sustrato de la SSAT es la acetilamantadina.
- 50 10. El uso del procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque correlaciona la actividad de la SSAT con afecciones patológicas en el mamífero, incluyendo carcinoma gástrico, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de pecho, cáncer renal, cáncer colorrectal o cáncer de próstata.

Figura 1

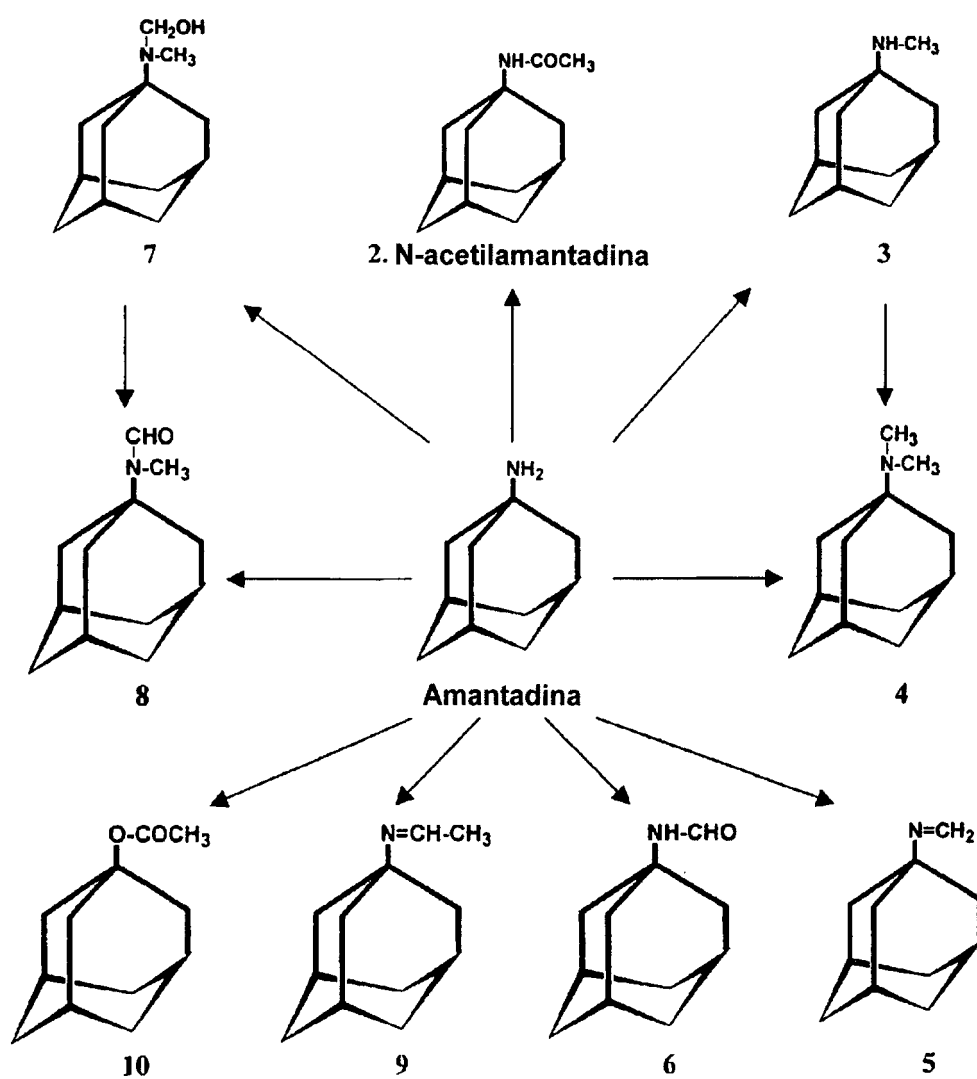


Figura 2

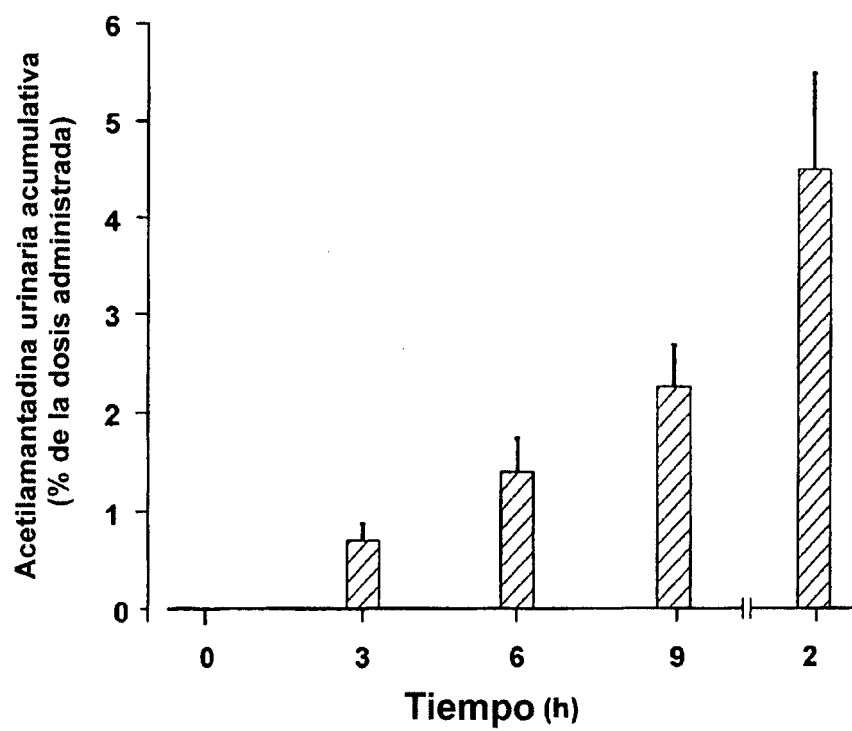


Figura 3

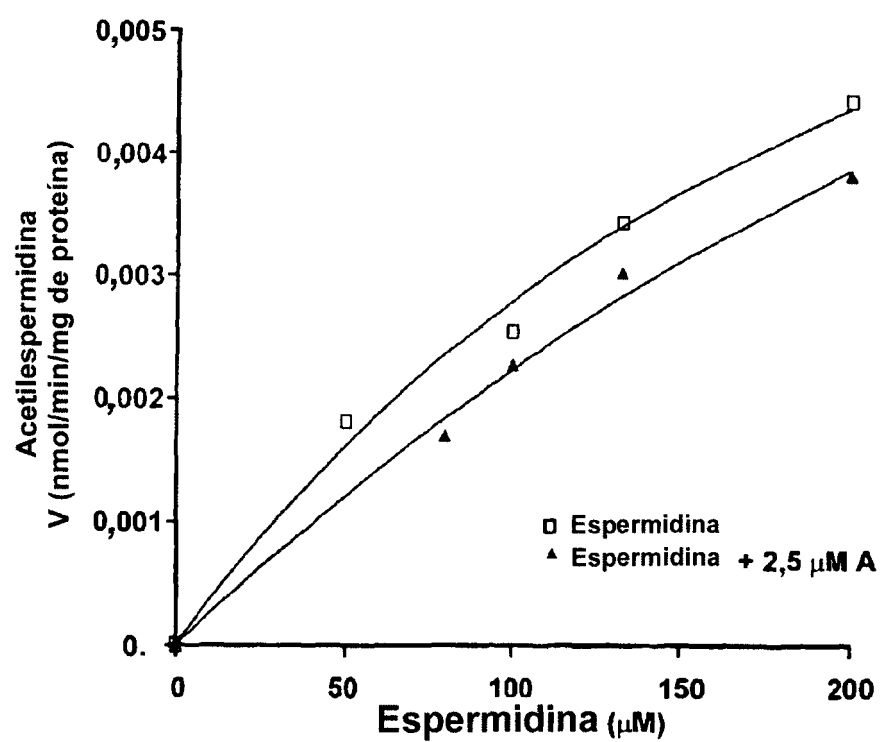


Figura 4

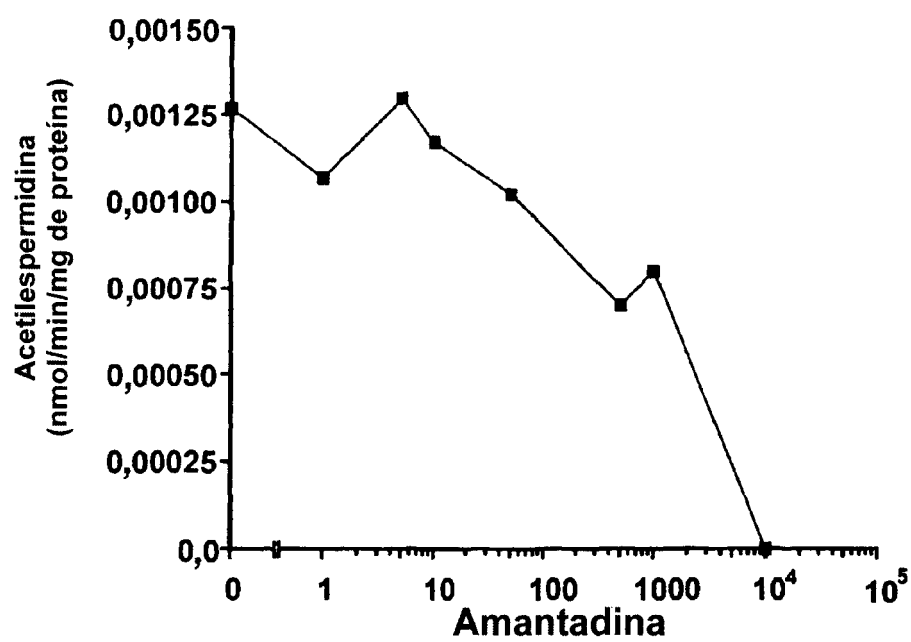


Figura 5

