

IN.-



ESPAÑA

(19) ES	(11) NÚMERO 440830	(10) A3
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 8-4-1.976	

PATENTE DE INTRODUCCION

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N
--------------------------	--

(54) TITULO DE LA INVENCIÓN PROCEDIMIENTO Y APARATO PARA LA DETERMINACION DE LIPOPROTEINAS DE PLASMA NORMALES Y ANORMALES EN HUMORES CORPOREOS HUMANOS.
(59) PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente austriaca nº 320.865

10 FEB 1977

(71) SOLICITANTE (S) IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FUR CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Industriestrasse 72, 1220 WIEN, Austria
(72) INVENTOR (ES)
(73) TITULAR (ES) El mismo solicitante
(74) REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 El invento tiene por objeto un procedimiento para
la determinación de lipoproteínas de plasma normales y
patológicas en humores corpóreos humanos por separación
electroforética de las lipoproteínas en un medio sopor-
5 te, como un gel, o sobre láminas, así como un aparato
para la realización del procedimiento.

El análisis de las proteínas del plasma del suero
es una condición previa para el diagnóstico exacto de
las diferentes formas de la hiperlipoproteinemia y
10 desde hace tiempo existe el deseo de disponer de una
técnica segura y fácilmente realizable para la identifi-
cación de las fracciones normales y anormales de lipo-
proteína. Se conocen métodos de determinación que se ba-
san en la electroforésis de humores corpóreos humanos.
15 Para ello se someten las lipoproteínas procedentes del
suero humano o análogo, incorporadas a un medio de migra-
ción sólido, por ejemplo un gel, a la acción de un cam-
po eléctrico, que produce un efecto de separación debi-
do a la migración de las lipoproteínas. Las bandas de
20 lipoproteína se hacen visibles con el método de trabajo
conocido, es decir por teñido con pigmentos lípidos o
por precipitación inmunológica, por ejemplo con anti-
suero. En numerosos casos es preciso combinar este mé-
todo con una ultracentrifugación; los métodos conocidos
25 tienen el inconveniente de que son muy laboriosos y exi-
gen un equipo de aparatos tan costoso, que un análisis
de lipoproteínas completo sólo puede ser realizado en
laboratorios especiales.

El objeto del invento es un procedimiento que evi-
30 te estos inconvenientes, que pueda ser realizado en cu-

1 alquier laboratorio y que asegure resultados fiables.

5 El procedimiento, según el invento, que parte de la separación electroforética de las lipoproteínas en un medio soporte, por ejemplo un gel, o sobre láminas, se caracteriza por el hecho de que después de iniciarse el efecto de separación electroforética deseada, se trata el soporte con una solución reveladora, que contiene una o varias de las sustancias siguientes: poli-aniones, tales como sulfato de heparina o de dextrano, 10 dodecilsulfato sódico, fosfowolframato sódico, oleato sódico, sales sódicas de ácido biliar, convenientemente en presencia de cationes divalentes, tales como magnesio o calcio, formándose con las lipoproteínas sales complejas difícilmente solubles.

15 La composición de la solución reveladora y la clase de los polianiones a utilizar depende de las lipoproteínas que se quieren determinar.

20 Para la determinación de la lipoproteína LP-X anormal se utiliza convenientemente un revelador que contiene heparina y iones de magnesio y NaCl.

Para la determinación de la lipoproteína del tipo III anormal también se utiliza convenientemente un revelador que contiene heparina, iones de magnesio y NaCl.

25 De acuerdo con una forma de ejecución modificada del procedimiento, según el invento, se utiliza para la determinación de la lipoproteína LP-X un soporte, por ejemplo una placa de gel, en el que está contenida la solución reveladora o partes de ella.

30 Cuando se quieren determinar selectivamente la lipoproteína del tipo III, por un lado, y las lipoproteí-

1 nas VLDL, LDL y HDL, por otro, se trata el soporte sucesivamente con diferentes soluciones reveladoras de las que una contiene heparina y iones de magnesio y la otra sulfato de dextrano y iones de calcio.

5 El invento tiene además por objeto un aparato para la realización del procedimiento, según el invento, que de forma en si conocida, comprende un soporte en forma de placa, provista de una capa del medio de migración, por ejemplo de gel, que se sumerge en un electrolito o
10 en una solución tampón.

El aparato según el invento posee una hilera de orificios o de ranuras, tiene forma de U y se puede introducir en un recipiente, que contiene el electrolito o la solución tampón y que se subdivide por medio de un tabique de separación longitudinalmente en una cámara
15 de ánodo y en una cámara de cátodo.

Para la determinación de la lipoproteína LP-X se dispone la hilera de orificios o de ranuras convenientemente en el lado anódico y para la determinación de las lipoproteínas VLDL, LDL, HDL y de tipo III en el lado
20 catódico.

Sin embargo, la hilera de orificios también puede estar prevista en el centro de un soporte de gel en forma de placa, en cuyo caso, la lipoproteína LP-X migra, partiendo de esta hilera, en dirección al cátodo
25 y las restantes lipoproteínas en dirección al ánodo

En los dibujos se representa un ejemplo de ejecución del aparato.

La figura 1 es una sección vertical del aparato.

30 La figura 2 es una planta del soporte de gel.

1 El aparato comprende un recipiente 1 rectangular,
que se puede cerrar por medio de una tapa 2. Como cá-
todo K y ánodo A se prevén chapas o alambres 3 y 4 de
platino, que se prolongan en el interior del recipiente
5 a lo largo de la pared lateral y a lo largo de una par-
te del fondo.

Del fondo del recipiente emergen tabiques 5, que
forman un tabique de separación y que subdividen longi-
tudinalmente el recipiente 1 en una cámara de cátodo y
10 en una cámara de ánodo. La placa de gel 7 apoya en los
tabiques 5, sobresale de la pared divisora y se sumer-
ge con sus ramas 8 dirigidas hacia abajo en la solución
tampón. La placa de gel está capsulada en una plantilla
9, que posee la forma aproximada de una U. La plantilla
15 es convenientemente de material plástico. En la placa
de gel se halla: en el lado del cátodo una hilera de
ranuras 10 que sirven para alojar el humor corpóreo hu-
mano que se quiere analizar, por ejemplo suero humano.
Por aplicación de un campo eléctrico se produce la mi-
20 gración de las lipoproteínas en dirección hacia el áno-
do y, según su velocidad de migración, se separan en
diferentes fracciones. Una vez que se ha iniciado el
efecto de separación deseado, se saca la plantilla del
aparato y se sumerge en un recipiente no representado,
25 que contiene la solución reveladora. Sin embargo, tam-
bién es posible humedecer la plantilla por goteo o por
pulverización con el líquido revelador, haciendo así vi-
sibles las diferentes bandas de lipoproteínas después
de una duración adecuada del tratamiento.

30 Ejemplo 1: Para la determinación de las bandas de

1 lipoproteína en el suero humano se realizó la electroforé-
foré-
5 sis en un medio de migración de agarosa, como describe R.P.Noble en I.Lipid Res.9.693 (1968). Se utilizó un tampón de veronal con un valor pH de 8,6 y una intensidad de iones de 0,05. Después de una hora de electroforé-
lectroforé-
10 sis se sacó la plantilla del aparato y se introdujo en un baño de revelado compuesto de un 0,55 % de sulfato de dextrano 2000 y de una solución acuosa al 2,2 % de cloruro de calcio. El soporte permaneció en el baño durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo se produjo una precipitación completa de las siguientes bandas de lipoproteína:

Quilomicrones

β -lipoproteínas

15 pre- β -lipoproteínas

α -lipoproteínas.

Ejemplo 2: Para la determinación de la hiperlipoproteinemia del tipo III se sometió, igual que en el ejemplo 1, el suero humano sobre una plantilla de agar a una electroforé-
20 sis en un tampón de veronal con un valor pH de 8,6 y una intensidad iónica de 0,05. Después de una hora de electroforé-
sis se sacó la plantilla y se introdujo en un baño de revelado compuesto de un 0,25 % de heparina y de cloruro de magnesio al 0,95 % en una solución acuosa de NaCl al 0,95 %, en la que permaneció
25 20 minutos; fue posible identificar claramente la precipitación del campo VLDL, característico del tipo III.

Ejemplo 3: Para la determinación de la lipoproteína LP-X se introdujeron cuatro muestras de suero humano en cuatro orificios de un portaobjetos recubierto con
30

1 una placa de agar, uniendo el portaobjetos por medio de
papel de filtro con una solución tampón de veronal con
un valor pH de 8,6 y una intensidad iónica de 0,05. Las
muestras así preparadas se sometieron a una electroforé-
5 sis. Después de media hora de electroforé-
sis se sacó el portaobjetos y se introdujo en un baño de revelado com-
puesto de un 0,25 % de heparina y de cloruro de magnesio
al 0,95 % en solución acuosa de NaCl al 0,95 %, en el
que permaneció durante 10 minutos. Dos pruebas dieron
10 resultados negativos, pero en las otras dos pruebas se
identificó claramente la banda LP-X.

Ejemplo 4: Un plasma humano puro se sometió a una
electroforé-
sis de poliacrilamida, de acuerdo con el mé-
todo de B.J.Davis, Ann. N.Y. Acad.Sci.121,404 (1964),
15 utilizando un tampón de tris-glicina (tampón de tris-
(hidroximetil)-aminometano) con un valor pH de 8,8 y
una concentración de acrilamida del 3,5/7 %. Una vez
iniciado el efecto de separación deseado después de dos
horas de electroforé-
sis se sacó el tubo de vidrio del
20 aparato, separando el gel de poliacrilamida, que se trató
con una solución de revelado con la siguiente composi-
ción: 0,55 % de sulfato de dextrano 2000 y solución acu-
osa de cloruro de calcio al 2,2 %.

Con ello se hicieron visibles e identificaron las
25 siguientes bandas de lipoproteína: pre- β -lipoproteína,
 β -lipoproteína y α -lipoproteína.

En resumen, la presente patente de introducción que
se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

Reivindicaciones

1

5

10

15

20

25

30

1. Procedimiento y aparato para la determinación de lipoproteínas de plasma normales y anormales en humores corpóreos humanos por separación electroforética de las lipoproteínas en un medio soporte, como un gel, o sobre láminas estando caracterizado el procedimiento por el hecho de que una vez iniciado el efecto de separación electroforética deseada se trata el soporte con una solución reveladora, que contiene una o varias de las siguientes sustancias: polianiones tales como heparina o sulfato de dextrano, dodecilsulfato sódico, fosfowolframato sódico, oleato sódico, sales sódicas de ácido biliar, convenientemente en presencia de cationes divalentes, tales como magnesio y calcio, así como eventualmente NaCl, formándose con las lipoproteínas sales complejas difícilmente solubles.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para la determinación de la lipoproteína LP-X se utiliza un revelador que contiene heparina y iones de magnesio y, eventualmente, NaCl.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para la determinación de la lipoproteína del tipo III se utiliza un revelador que contiene heparina y iones de magnesio y, eventualmente, NaCl.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para la determinación selectiva de la lipoproteína del tipo III, por un lado, y de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL, por otro, se trata

1

5

10

15

20

25

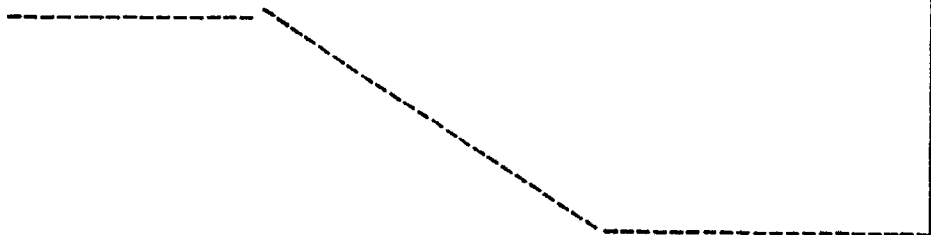
30

el soporte sucesivamente con diferentes soluciones reveladoras de las que una contiene heparina y iones de magnesio, mientras que la otra contiene sulfato de dextrano y iones de calcio.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para la determinación de la lipoproteína LP-X se utiliza un soporte, por ejemplo una placa de gel, que contiene la solución reveladora o partes de ella.

6. Aparato para la realización del procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 5, con un soporte en forma de placa provista de una capa del medio de migración, que se sumerge en un electrolito, caracterizado por el hecho de que el soporte en forma de placa posee una hilera de orificios o de ranuras, por el hecho de que tiene forma de U y por el hecho de que se puede introducir en un recipiente que aloja el electrolito o la solución tampón que se subdivide longitudinalmente por medio de un tabique en una cámara de ánodo y en una cámara de cátodo.

7. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de introducción que se solicita: PROCEDIMIENTO Y APARATO PARA LA DETERMINACION DE LIPOPROTEINAS DE PLASMA NORMALES Y ANORMALES EN HUMORES CORPOREOS HUMANOS.



1

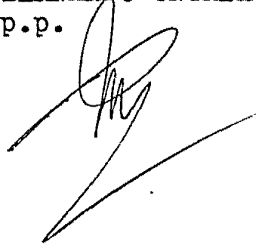
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de diez páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 8 de Abril de 1.976

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30

