

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial

20 SET. 1978

Concedido el Registro de Patentes
con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	466980
FECHA DE PRESENTACION	14.2.78

ⓐ A1



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

90 PRIORIDADES:		
91 NUMERO	92 FECHA	93 PAIS
77.01800	18-2-77	HOLANDA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G, 601N	
84 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO Y SU CORRESPONDIENTE EQUIPO DE ENSAYO PARA LA DEMOSTRACION Y DETERMINACION DE LA LIPOPROTEINA LP-X EN EL SUERO".		
71 SOLICITANTE (ES)		
AKZO N.V.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
IJssellaan 82 - ARNHEM - Holanda		
72 INVENTOR (ES)		
Bastiaan Coernilis Goverde y Peter Silvester Lambertus Janssen, ambos de nacionalidad holandesa, y Gerhard Maximiliaan Kostner, de nacionalidad austriaca.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

1

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un método de diagnóstico para la demostración y determinación de la lipoproteína LP-X en suero, por separación de las lipoproteínas que interfieren, precipitación de LP-X en el suero residual y medida del contenido de LP-X en la suspensión, obtenida por métodos foto-ópticos o visuales y a equipos de ensayo para utilizar en el método de diagnóstico anterior.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

10

Esta invención se refiere a un método para la demostración y estimación de la llamada lipoproteína-X (LP-X) y a un equipo de ensayo para uso en este método.

15

El suero contiene varias lipoproteínas "normales" que, clasificadas por orden de densidad, son denominadas quilomicras, VLDL, LDL y HDL. Contienen colesterol libre y esterificado, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas.

20

En algunos estados patológicos, pueden formarse en el suero otros tipos de lipoproteínas que pueden considerarse lipoproteínas "anormales". La LP-X es una de estas lipoproteínas anormales. Con los auxiliares de diagnóstico ahora existentes, puede demostrarse la presencia de LP-X o de una lipoproteína relacionada con la LP-X en una enfermedad debida a una deficiencia de la enzima lecitin:colesterol-aciltransferasa (EC 2.3.1.43) en el hígado, un error de metabolismo ingénito extraordinariamente raro. La incapacidad del hígado para esterificar el colesterol se considera una de las razones por las que se forma la LP-X, una lipoproteína con un contenido relativamente elevado en colesterol libre. La LP-X, o una sustancia que se parece mucho a ella, se encuentra también en algunos niños un poco después del naci-

25

30

1 miento, un hallazgo que, por ejemplo, puede ser atribuido
a la falta de madurez fisiológica de la función hepática
durante el periodo inicial de la vida del niño o a la mar-
cada reducción fisiológica de la síntesis de los ácidos bi-
5 liares, como resultado de lo cual también es reducida la
absorción de grasa en el infante. En este caso, la LP-X apa-
rece sólo después del nacimiento, una vez que ha empezado la
ingestión de alimento.

10 La LP-X también se encuentra en la sangre de casi to-
dos los pacientes de colestasis. Como resultado de una oclu-
sión intrahepática o extrahepática, se produce una serie de
cambios patológicos, por ejemplo el metabolismo de la bili-
rrubina varía de manera que los pacientes adquieren un color
amarillo. Las actividades de diversas enzimas en la sangre,
15 v.g. la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), D-glutamyl-trans-
ferasa (EC 2.3.2.1) y otras aminotransferasas del suero
(EC 2.6.1.2 y/o 2.6.1.6) también pueden variar todavía más.
La ictericia, sin embargo, puede ser producida por otros
muchos estados patológicos mientras que estos trastornos
20 también pueden ejercer influencia sobre las actividades enzi-
máticas antes citadas. Por lo tanto, se admite universalmente
que la LP-X constituye un parámetro de la existencia de coles-
tasis mucho más específico que los parámetros anteriormente
citados. No es sin razón que la LP-X es también llamada
25 "lipoproteína específica de la colestasis".

30 La mayor parte de los métodos de determinación de la
LP-X se basan en la observación de que en electroforesis en
gel de agar, la LP-X migra hacia el cátodo, es decir, en di-
rección opuesta a la de otras lipoproteínas. La identifica-
ción, por ejemplo, mediante ciertos colorantes lipófilos,

1 precipitantes inmunes frente a la LP-X o aniones polivalen-
tes precipitantes hace posible la determinación cualitativa
e incluso en casos extremos la determinación semicuantita-
5 tiva. Esta cuantificación puede mejorarse opcionalmente me-
diante otras técnicas para la determinación e identificación,
tales como el uso de compuestos marcados radiactivos o el
corte del gel de agar que contiene la fracción LP-X para de-
terminar químicamente ciertos constituyentes como, por ejem-
plo, los fosfolípidos. La técnica electroforética en todos
10 estos casos requiere mucho tiempo y experiencia mientras que
su grado de dificultad es muy alto. Los resultados son algu-
nas veces muy erráticos, por ejemplo después de haber mani-
pulado y almacenado incorrectamente la muestra a analizar
o cuando se utiliza un agar inadecuado o antiguo.

15 También existen diversas técnicas inmunoquímicas
cuantitativas en las que, por ejemplo, después de separar
las lipoproteínas que interfieren, el suero se somete a
técnicas como difusión radial de acuerdo con Mancini o a
electro-inmunodifusión de acuerdo con Laurell, por ejemplo
20 como se indica en Clin.Chem. 1974, 20 (6), 276-81. En estos
casos, ciertamente es posible una determinación más precisa
del LP-X pero las técnicas requieren una prolongada prepa-
ración y todavía son necesarias varias horas, en algunos po-
cos casos incluso días, antes de poder leer el resultado.
25 Las ventajas de un método cuantitativo preciso de determina-
ción de la LP-X son excepcionales. Si este método cumple los
estrictos requisitos relativos a sencillez, rapidez y repro-
ducibilidad, el nivel de LP-X puede utilizarse como guía en
la diagnosis y terapia de la colestasis. Si el aumento se
30 mantiene por debajo de un valor límite de unos 400 mg por

1 100 ml, entonces el estado de que se trata es en muchos ca-
sos una colestasis intrahepática mientras que en la colesta-
sis extrahepática, que es generalmente operable, el nivel
de LP-X en suero puede aumentar muy por encima de este va-
5 lor. Un ensayo cuantitativo para la LP-X también constituye
una valiosa contribución a la diagnosis y al proceso de re-
cuperación en los casos de colestasis que son causados por
el uso de ciertos medicamentos.

10 Ahora hemos hallado un método para la determinación
cualitativa y cuantitativa de la LP-X; dicho método consis-
te en separar primero las lipoproteínas que contienen apo-
B por métodos conocidos, después de lo cual se agregan al
suero residual sustancias que reducen la solubilidad de las
lipoproteínas y se mide y determina la cantidad de LP-X en
15 la suspensión resultante de LP-X mediante métodos foto-ópticos.

La separación de las lipoproteínas que interfieren
se realiza preferiblemente poniendo el suero en contacto con
un anticuerpo o antisuero dirigido contra la lipoproteína
de baja densidad (LDL) o contra la apoproteína-B de la mis-
20 ma. Este antisuero o anticuerpo se conserva y agrega prefe-
riblemente en estado liofilizado. También puede utilizarse
en forma de solución.

25 . Aparte de la separación inmunoquímica, las lipoprotef-
nas que interfieren también pueden separarse por adición de
ciertas sustancias como concanavalina A u otras lectinas,
hidroxilapatito, aerosil, etc.

30 Los anticuerpos contra las lipoproteínas que contienen
apo-B pueden ser obtenidos de los mamíferos, por ejemplo del
conejo, vaca, oveja o caballo, inmunizando a éstos con lipo-
proteínas o con lipoproteínas deslipidizadas de origen huma-

1 no que contienen apolipoproteína B, por ejemplo LDL humana.
El antisuero obtenido de esta forma puede ser procesado para
obtener: a) suero animal exento de lipoproteínas, b) la frac-
5 ción γ -globulina de dicho suero o c) el anticuerpo puro
monoespecífico de la LP-B.

Se ha hallado que los sueros que contienen LP-X, pues-
tos en contacto con soluciones de anti-lipoproteína B o con
dicha anti-lipoproteína B liofilizada, forman un precipitado
que separa todas las VLDL y LDL (a excepción de la LP-X).
10 Sorprendentemente, se ha demostrado que esta precipitación
se produce prácticamente de forma instantánea y que, des-
pués de separar el aglutinado formado, por ejemplo por fil-
tración o centrifugación, se obtiene inmediatamente una so-
lución transparente. Si la cantidad de anticuerpo presente
15 es insuficiente para combinar la VLDL y LDL de la muestra,
el filtrado es turbio u opaco. En ese caso, se agrega al
suero una nueva cantidad del anticuerpo, después de lo cual
la muestra se filtra o centrifuga de nuevo. En todos los
casos, la LP-X en el suero residual permanece en solución
20 junto con la HDL en cuanto que ésta está constituida por
partículas con las apolipoproteínas A y C.

Después de separar las lipoproteínas que interfieren,
opcionalmente como complejo inmune, se agregan al suero re-
sidual las sustancias que reducen la solubilidad de la LP-X.
25 Esto puede conseguirse agregando al suero sustancias de ca-
rácter aniónico o polianiónico, como sales de ácido wolfrámi-
co, ácido fosfowolfrámico, ácido molibdicó, sales de sul-
fatos alifáticos y ácidos carboxílicos superiores tales como
dodecilsulfato sódico, laurato sódico y oleato sódico, sa-
30 les de ácidos cólicos como colato sódico o desoxicolato po-

1 tásico, policationes, polisacáridos sulfatados como sulfa-
to de dextrano y heparinoides.

5 Los reactivos aniónicos citados se emplean preferi-
blemente en combinación con compuestos metálicos, especial-
mente compuestos metálicos divalentes como sales de magnesio,
calcio y manganeso. También puede utilizarse, por ejemplo,
polivinilpirrolidona.

10 La adición de los reactivos citados en el párrafo
anterior vuelve insoluble o escasamente soluble a la LP-X.
En general, estas sustancias se agregan a concentraciones
tales que se forma un sistema de partículas finas, tan homo-
géneamente dispersado como sea posible, de manera que el
sistema insoluble se sedimenta con mucha lentitud. La can-
tidad de LP-X se determina posteriormente mediante métodos
15 foto-ópticos, por ejemplo por turbidimetría o nefelometría.
Esto se consigue midiendo en un turbidímetro o nefelómetro,
de acuerdo con el siguiente principio. Cuando la luz cae so-
bre un sistema suspendido de partículas finas, parte de la
luz incidente es transmitida, otra parte es dispersada y
20 una parte posiblemente también sea absorbida. En turbidome-
tría, la relación de luz transmitida a luz incidente se uti-
liza para determinar la concentración de las partículas sus-
pendidas. En nefelometría, se utiliza la relación de luz
dispersada a luz incidente para esta determinación de la con-
25 centración.

30 La normalización se realiza por referencia a la LP-X
purificada, aislada de la sangre de pacientes colestáticos o
de animales artificialmente colestáticos (por ejemplo un pe-
rro). Como no puede disponerse de LP-X a gran escala y ade-
más sus propiedades de conservación son limitadas incluso

1 con la mejor estabilización posible, puede introducirse un
patrón turbidométrico o nefelométrico interno. Esto está
constituido preferiblemente por un liofilizado, preparado
5 a partir de un suero de origen humano o animal o de sustan-
cias que como la LP-X forman un sistema homogéneamente dis-
persado de partículas con el reactivo aniónico empleado. Son
ejemplos de estas sustancias las soluciones liofilizadas o
estabilizadas de lipoproteínas humanas o animales como
VLDL y/o LDL, sulfato de protamina liofilizado o disuelto
10 o una mezcla de éstas. En este caso, el patrón interno se
calibra con referencia a la LP-X, lo que reduce considera-
blemente las necesidades de este costoso material sin perjui-
cio de la fiabilidad esencial.

15 Aunque diversos elementos de este método de ensayo
son cuestiones de conocimiento común, cuando se integran en
el método como un todo constituyen un ensayo nuevo y sor-
prendentemente rápido, sencillo y específico, de un alto gra-
do de fiabilidad. Además, su aplicación no requiere el uso
de equipo costoso y específico ni una gran experiencia. Por
20 el contrario, el ensayo puede ser realizado por personal re-
lativamente inexperto, con el equipo de laboratorio conven-
cional.

25 El equipo de ensayo que se utiliza en el método de
esta invención está constituido esencialmente por:

- a) un antisuero o anticuerpo dirigido contra la apolipoproteína B;
- b) un patrón de LP-X y/o un patrón de turbidez calibrado frente a LP-X;
- c) un reactivo acuoso que reduce la solubilidad del LP-X.

30 El componente inmunológico citado en a) puede estar

1 copulado opcionalmente a un portador insoluble de manera que las lipoproteínas que interfieren con la determinación puedan ser separadas más fácilmente del suero.

5 La invención es ilustrada además mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Equipo de ensayo constituido por:

10 10 tubos de reactivo R_1 cerrados con tapones de goma, conteniendo cada uno 5 mg de anti-apolipoproteína B liofilizada, preparada de acuerdo con Biochem. Biophys. Acta, 188, (1969), 157, a partir del suero de caballos inmunizados con LDL humana pura;

10 tubos de reactivo idénticos R_2 conteniendo 0,1 mg de sulfato de protamina en estado liofilizado;

15 2 x 10 tubos de reactivo idénticos marcados R_{3a} y R_{3b} respectivamente, limpios y sin tapones;

1 vial que contiene suero positivo LP-X estabilizado con un contenido conocido de LP-X (103,3 mg/100 ml);

20 1 vial conteniendo 1 ml de una solución acuosa (reactivo precipitante P) de:

sulfato de dextrano 500, sal sódica	0,65 mg
hexahidrato de cloruro magnésico	12,7 mg
Nipagin	1 mg
Nipasol	1 mg

25 1 vial conteniendo 10 ml de una solución acuosa (diluyente D) de:

cloruro sódico	90 mg
hexahidrato de cloruro magnésico	100 mg.

EJEMPLO 2

En una gradilla se colocan los siguientes componentes del equipo de ensayo descrito en el Ejemplo 1:

2 tubos R_1

1 tubo R_2

2 tubos R_{3a}

2 tubos R_{3b} .

Se quitan los tapones de los tubos y después se introducen en un tubo R_1 150 μ l de suero de pacientes exento de quibmicras y 150 μ l del suero de referencia LP-X positivo en otro tubo R_1 y se sacude fuertemente. Estos tubos se centrifugan posteriormente a 3000 G después de lo cual se pipetea 50 μ l del líquido sobrenadante transparente en cada uno de los tubos R_{3a} y R_{3b} . Después se pipetea 50 μ l de solución salina fisiológica en uno de los tubos R_2 .

A continuación se pipetea 10 μ l de solución de sulfato de dextrano en los tubos R_2 y R_{3b} . Finalmente se introducen 500 μ l del diluyente (D) en los tubos R_2 , R_{3a} y R_{3b} .

Después de sacudir fuertemente, se miden los tubos en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 400 nanómetros. La solución salina fisiológica sirve para establecer el punto cero para la muestra R_2 y el contenido de los tubos R_{3a} sirve para establecer el punto cero para las muestras de los tubos R_{3b} (individualmente para cada muestra).

Las absorciones medidas son:

R_2 : 0,140

R_{3b} : (suero de paciente) 0,620

R_{3b} : (suero patrón de LP-X) 0,450.

A partir de estas absorciones puede calcularse que el contenido en LP-X del suero del paciente es de $142,3 \pm 5,7$ mg/

1 100 ml. Una absorción de 0,100 para el sulfato de protamina
patrón de la turbidez es equivalente a 22,95 mg de LP-X/100 ml.

EJEMPLO 3

5 Se monta un equipo de ensayo como el del Ejemplo 1
en el que se ha omitido el vial del patrón de LP-X y la
anti-apolipoproteína B liofilizada de los tubos R₁ se sus-
tituye por 50 µl de una solución de 3 mg de anti-apolipopro-
teína B de conejo.

10 Se realiza una determinación con otros sueros de pa-
cientes en completo acuerdo con el Ejemplo 2 (con omisión de
la referencia de LP-X). La medida de la turbidez del tubo
R_{3b} da un valor de 0,285. El contenido de LP-X de este sue-
ro puede calcularse en $87,2 \pm 3,5$ mg/100 ml.

EJEMPLO 4

15 Se monta un equipo de ensayo como el del Ejemplo 1,
con las siguientes modificaciones:

- a) el vial con la referencia LP-X se sustituye por un vial
que contiene suero de caballo liofilizado; éste tiene que
ser solubilizado antes de su uso mediante la adición de
20 1 ml de solución salina;
- b) el reactivo aniónico está constituido por 1 ml de una solu-
ción acuosa de:

heparina (150 USP/mg)	6 mg
tetrahidrato de cloruro de manganeso (II)	60 mg
25 Nipagin	1 mg
Nipasol	1 mg

- c) El diluyente está constituido por 10 ml de una solución
acuosa de:

30 cloruro sódico	90 mg
tetrahidrato de cloruro de manganeso (II)	100 mg

1

Se examinan los sueros de tres pacientes en completo acuerdo con lo prescrito en el Ejemplo 2. Las absorciones medidas son:

5

<u>Muestra 1</u>	<u>Muestra 2</u>	<u>Muestra 3</u>
R ₂ : 0,425	R ₂ : 0,434	R ₂ : 0,418
R _{3b} : (patrón LP-X) 0,652		
R _{3b} : 0,825	R _{3b} : 0,072	R _{3b} : 0,008

10

De estas medidas se saca la conclusión o se calcula, respectivamente, que la Muestra 1 contiene $140,2 \pm 4,9$ mg/100 ml de LP-X; la Muestra 2 contiene $12,0 \pm 0,4$ mg de LP-X/100 ml y la Muestra 3 no contiene una cantidad mensurable de LP-X. La duración total del análisis de estas tres muestras es de 21 minutos.

15

EJEMPLO 5

Se monta un equipo de ensayo como el del Ejemplo 1, en el que se han modificado los siguientes componentes:

20

a) el vial con el "patrón LP-X" contiene una solución estabilizada con 100 mg/100 ml de LDL humana;

b) el reactivo para la turbidez está constituido por:

fosfowolframato sódico	10 mg.
hexahidrato de cloruro magnésico	50 mg
agua hasta	1 ml

25

c) el vial con el diluyente está constituido por:

cloruro sódico	90 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	160 mg
agua hasta	10 ml

30

La turbidez de las muestras en este caso se mide con un nefelómetro laser (Behring Werke A.G., laser de He-Ne).

Debido a la mayor sensibilidad, todas las muestras de este caso se diluyen por adición de 1 ml de solución D en

1 lugar de 0,5 ml.

Los valores medidos son:

Muestra 1

Muestra 2

R₂: 6,29 V

R₂: 6,33 V

5 R_{3b} (patrón LDL) 9,61 V

R_{3b}: 11,62 V

R_{3b}: 1,45 V

10 A partir de estos valores se ha calculado que la Muestra 1 contiene 103,2 ± 3,1 mg de LP-X/100 ml y la Muestra 2, 12,8 ± 0,35 mg/100 ml. El contenido supuesto de LP-X del patrón de sulfato de protamina es de 55,8 mg/100 ml y del patrón de LDL es de 85,3 mg/100 ml.

EJEMPLO 6

Se utiliza el equipo de ensayo del Ejemplo 5, donde el reactivo de la turbidez está constituido por:

15 dodecilsulfato sódico 14 mg
agua hasta 1 ml

El diluyente está constituido por:

20 cloruro sódico 90 mg
MgCl₂·6H₂O 124 mg
Agua hasta 10 ml

EJEMPLO 7.

25 Se utiliza un equipo de ensayo constituido por 30 tubos de reactivo R₁ tapados con tapones de goma, conteniendo 2 mg de anti-apolipoproteína B liofilizada, preparada de acuerdo con Biochem. Biophys. Acta 188 (1969), 157, a partir de suero de oveja inmunizada con LP-B humana pura.

1 bandeja de plástico o vidrio negro con orificios cerrados en el fondo;

1 vial que contiene 1 ml de una solución acuosa de:

30 fosfotungstato sódico 10 mg

1	MgCl ₂ , 6H ₂ O	50 mg
	Nipagin	1 mg
	Nipasol	1 mg

1 pipeta Pasteur

5 1 vial conteniendo suero positivo LP-X es
tabilizado

1 vial conteniendo suero negativo LP-X es
tabilizado.

Procedimiento

10 Se retiran los tapones de los tubos y en cada tubo individual R₁ se pipetea 50 µl de diferentes muestras así como del patrón positivo y negativo. Los viales se sacuden fuertemente y se dejan en reposo durante 5 minutos a la temperatura ambiente. Después los tubos se centrifugan a 3000 G durante 5 minutos. El líquido sobrenadante de los tubos se vierte directamente en los orificios individuales de la bandeja de plástico, después de lo cual se añade una gota del agente precipitante.

15 La aparición inmediata de un precipitado o de una turbidez indica la presencia de LP-X.

20 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

25 1. Un método y su correspondiente equipo de ensayo para la demostración y determinación de la lipoproteína LP-X en el suero, que incluye la separación inicial por métodos convencionales de las lipoproteínas que contienen apo-B que interfieren, cuyo método se caracteriza especialmente por agregar después sustancias que reducen la solubilidad de las lipoproteínas para producir una suspensión de LP-X
30 donde se mide y determina la cantidad de LP-X mediante méto-

1 dos visuales o foto-ópticos.

2. Un método según la Reivindicación 1, caracterizado por la adición al suero, para la separación de las lipoproteínas que interfieren, de un anticuerpo o antisuero dirigido contra la lipoproteína LDL o contra la apoproteína-B de la misma.

3. Un método según la Reivindicación 2, caracterizado por la adición del antisuero o anticuerpo en estado liofilizado.

10 4. Un método según la Reivindicación 1, caracterizado por el uso de un reactivo (poli)aniónico como compuesto reductor de la solubilidad.

15 5. Un equipo de ensayo para llevar a cabo el método de las Reivindicaciones 1 a 4, constituido esencialmente por:

a) un antisuero o anticuerpo dirigido contra la apolipoproteína B;

b) un patrón de LP-X y/o un patrón de turbidez calibrado frente a LP-X;

20 c) un reactivo que reduce la solubilidad de la LP-X.

6. Un equipo de ensayo según la Reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que el antisuero o anticuerpo especificado en a) está copulado a un portador sólido.

25 7. Un equipo de ensayo según la Reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que la LP-X especificada en b) es de origen animal.

8. Un equipo de ensayo según la Reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que el patrón de turbidez especificado en b) contiene sulfato de protamina.

30 9. Un equipo de ensayo según la Reivindicación 5,

1

caracterizado por el hecho de que el reactivo c) también contiene un compuesto metálico polivalente.

5

10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: "UN METODO Y SU CORRESPONDIENTE EQUIPO DE ENSAYO PARA LA DEMOSTRACION Y DETERMINACION DE LA LIPOPROTEINA LP-X EN EL SUERO".

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de dieciseis páginas mecanografiadas.

Madrid, 14 de febrero de 1978
BERNARDO UNGRIA

P.P.



15

20

25

30