

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

Concedido el Registro de Patentes
con los datos que figuran en esta
solicitud de inscripción y según el
texto de la memoria adjunta.

20 DIC. 1978

11	NUMERO	10	A3
21		469.000	
22	FECHA DE PRESENTACION	20-4-78	



ESPAÑA

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL
		G 0 1 N	

64 TITULO DE LA INVENCIÓN

UN METODO FLUOROMETRICO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE TRANSFERASAS Y PROTEASAS EN MUESTRAS DE FLUIDOS BIOLOGICOS.

66 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION

El método del invento se lleva a cabo en las plantas de la Cía. solicitante en U.S.A.

71 SOLICITANTE (S)

AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

One American Plaza - Evanston, Illinois 60201 - ESTADOS UNIDOS.

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1

RESUMEN DE LA INVENCION

La actividad transferasa y proteasa en homogenados y so-
luciones biológicas es determinada fluorométricamente a lon-
gitudes de onda correspondientes generalmente a las utiliza-
das para las determinaciones fluorométricas enlazadas a
NADH, utilizando nuevas composiciones de substratos constitu-
das esencialmente por ciertos derivados fluorogénicos de áci-
do aminoftálico copulados con constituyentes aminoácidos es-
pecíficos de las transferasas y proteasas bajo estudio.

5

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han descrito en la bibliografía substratos enzimáti-
cos con naftilaminas como grupos cromogénicos enlazados a
otros aminoácidos para la determinación de transferasas y
proteasas, como γ -glutamyl-transpeptidasa, leucin-aminopepti-
dasa, oxitocinasa y tripsina. Orlowski y colaboradores, Clin.
Chim. Acta, 7:755-760 (1962) y referencias allí citadas. La
determinación de la actividad transferasa y proteasa en el
suero, orina y tejidos del hombre puede tener importancia
en diagnosis; por ejemplo, la determinación de la actividad
 γ -glutamyl-transpeptidasa en el suero humano puede ser útil
en la diagnosis diferencial de las enfermedades de hígado,
porque la actividad de la enzima es especialmente alta en la
ictericia obstructiva y en el cáncer de hígado mientras que
se observan actividades menores en la hepatitis viral y en
la cirrosis de hígado. Orlowski y colaboradores, supra.
Véase también Rosalki y colaboradores, Ann. Clin. Biochem.
7:143 (1970). La mayoría de los estudios relativos a las de-
terminaciones de γ -glutamyl-transpeptidasa se han realiza-
do empleando naftilaminas en la formulación de los substra-
tos y, desgraciadamente, estos productos (es decir, las

15

20

25

30

1 naftilaminas) son tóxicos y carcinogénicos, presentando
riesgos indeseables para uso en general en laboratorio.

5 Muchos de los análisis de enzimas comúnmente realizados
en los laboratorios clínicos están ligados al NADH. Es de-
cir, implican una serie de reacciones que finalmente dan lu-
gar a la reducción del nicotinamida, adenina-dinucleótido
(NAD) a su forma reducida, NADH. EL NADH se detecta después
espectrofotométricamente o fluorométricamente. Los procedi-
mientos fluorométricos más recientes presentan las ventajas
10 características de sencillez, velocidad y economía y fre-
cuentemente presentan la ventaja adicional de mayor sensi-
bilidad. Típicamente, un ensayo fluorométrico utilizando
NADH implica el uso de un fluorómetro de filtro que dirige
la luz ultravioleta a una longitud de onda de unos 340 nm
15 contra la superficie de la muestra y que mide la fluorescencia
o velocidad de variación de la fluorescencia a una longi-
tud de onda de emisión de unos 465 nm.

Otras referencias que ilustran el estado de la técnica
anterior son las patentes 3.862.011 y 3.591.459.

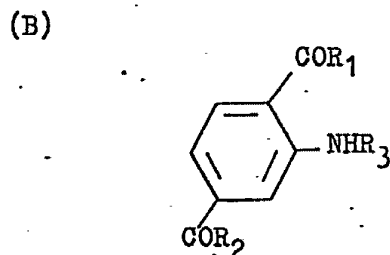
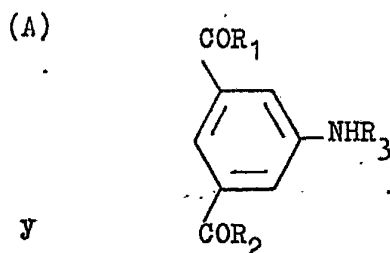
20 COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención implica el descubrimiento de ciertas com-
posiciones de materia útiles como substratos de enzimas en
la determinación fluorométrica de la actividad transferasa
(o transpeptidasa) en los homogenados y flúidos biológicos.
25 Creemos que estos substratos son nuevos y relativamente se-
guros para uso en laboratorio. Una ventaja especialmente im-
portante es que estos substratos producen, al ser escindidos
por las enzimas en estudio, radicales fluorogénicos con exci-
tación fluorométrica máxima y valores de emisión próximos a
30 los de los ensayos que utilizan NADH y, por lo tanto, los

1 ensayos para determinar fluorométricamente la actividad
transferasa o proteasa mediante el uso de estos substratos
pueden ser realizados con los fluorómetros habituales em-
5 pleando los mismos filtros destinados a los ensayos conven-
cionales que utilizan NADH. Así, una transferasa como la
γ-glutamyl-transpeptidasa puede ser medida utilizando el mis-
mo equipo fluorométrico y los mismos filtros empleados para
realizar ensayos de otras enzimas como SGOT, SGPT, CPK, LDH
y HBD.

10 DESCRIPCION DE LA INVENCION

Los substratos de enzimas implicados en esta invención
son derivados de aminoácidos del ácido aminoftálico y están
seleccionados entre el grupo formado por:



donde cada uno de los radicales R_1 y R_2 representa $-H$, $-NH_2$,
 $-NHCH_3$, $-NHC_2H_5$, $-N(CH_3)_2$, $-N(C_2H_5)_2$, $-N(CH_3)(C_2H_5)$, $-OCH_3$
u $-O(CH_2)_nCH_3$; n es un número entero de 1 a 4 y R_3 es un ra-
dical aminoácido capaz de ser escindido del resto del subs-
trato cuando se expone a una transferasa o proteasa con ac-
tividad específica para ese substrato, en algunos casos en
30 presencia de glicilglicina o de algún otro aceptor apropiado

1 como glutamato, glicina o glicilglicilglicina. Estos subs-
tratos con radicales aminoácidos (que pueden comprender va-
rios grupos aminoácido) y que son específicos de diversas
transferasas y proteasas son los siguientes (en todos los ca-
5 sos, el radical fluorogénico está representado por las fórmu-
las (A) o (B) identificadas anteriormente):

	<u>Substrato</u>	<u>Enzima</u>
	(A o B)-lis-ala	DAP-II
	(A o B)-Z-ala-arg-arg	Catepsina B 1
10	(A o B)-BZ-val-lis-lis-arg	Catepsina B 1a
	(A o B.2HCl)-CBZ-arg-arg	Catepsina B 1
	(A o B diacetato)-N-CBZ-arg- arg-arg	Tripsina
	(A o B.3-HCl)-L-arg-arg	DAP-III
15	(A o B)-Z-gli-gli-arg	Tripsina aniónica, enzima ac- tivadora del plasminógeno y convertidora de la proinsuli- na
	(A o B)-pro-arg	DAP-I ó catepsina C
	(A o B)- α -BZ-phe-val-arg	Trombina
	(di-A o BZ-HBr)-L-cistina	Oxitocinasa
20	(A o B)- γ -glutamilo	γ -Glutamil-transpeptidasa
	(A o B formiato)-L-leu-gli-gli	
	(A o B)-leu	Aminopeptidasa
	(A o B)-BZ-arg-pro-gli-phe- phe-leu	Catepsina D
25	(A o B)-phe-pro-ala-met	Catepsina B 1b
	(A o B)-glutaril-gli-L-phe	
	(A o B)-gli-pro	DAP-IV
	(A o B)-CBZ-pro-ala-gli-pro	Colagenasa
	(A o B)-his-ser	DAP I ó catepsina C
30	(A o B)-N-CBZ-L-pro-L-phe- L-his-L-leu-L-leu- L-val-L-tir-L-ser	

	<u>Substrato</u>	<u>Enzima</u>
1	(A o B)-N-CBZ-gli-I-met	Renina
	(A o B)-glutaril-ala-ala	Elastasa
	(A o B)-BZ-arg-pro-gli-phe- phe-pro	Catepsina D
5	(A o B)-ala	Aminopeptidasa B
	(A o B)-BZ-arg	Tripsina/Catepsina B 1
	(A o B)-BZ-arg-gli-leu	
	(A o B)-met	
	(A o B)-BZ-arg-gli-tir	DAP-I
10	(A o B)-ser-tir	Catepsina C

En lo anterior, las designaciones constituyen abreviaturas establecidas como sigue: ala (alanina), arg (arginina), BZ (benzoilo), CBZ y Z (carbобензоxi), gli (glicina), his (histidina), leu (leucina), lis (lisina), met (metionina), phe (fenilalanina), pro (prolina), ser (serina), tir (tirosina), val (valina). Para aumentar la solubilidad, todos los substratos, si se desea, pueden convertirse en sales como, por ejemplo, hidrocloreuro, hidrobromuro, acetato o formiato de los aminoácidos.

Todos los substratos, cuando se exponen a su enzima correspondiente, son escindidos, siendo liberado el radical aminoácido o copulándose con un aceptor adecuado como glicilglicina, para formar la amina primaria fluorogénica (es decir, el substrato (A) o (B) identificado anteriormente, donde el sustituyente R_3 es un átomo de hidrógeno). Todas estas aminas aromáticas fluorogénicas presentan características máximas de excitación y emisión, cuando se exponen a la luz ultravioleta, que son suficientemente próximas a las del ensayo que utiliza NADH ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 465 \text{ nm}$) para per

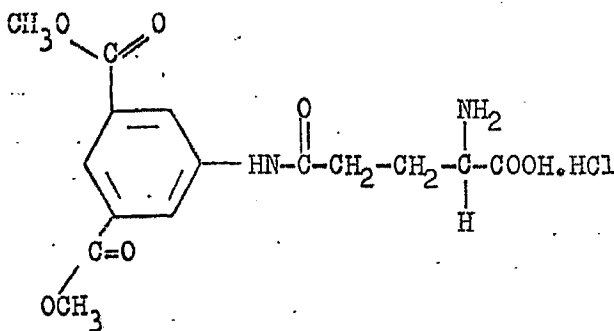
1 mitir realizar las medidas de la actividad fluorométrica em-
 pleando el mismo equipo y los mismos filtros utilizados para
 los ensayos normalizados con NADH. Específicamente, estos
5 cromóferos presentan características de excitación máxima a
 una longitud de onda comprendida entre 320 y 380 nm y carac-
 terísticas de emisión máxima a una longitud de onda compren-
 dida entre 420 y 480 nm. Por ejemplo, si el substrato (A)
 contiene grupos metoxi como R₁ y R₂, entonces el cromófero
10 resultante presentará una longitud de onda de excitación má-
 xima alrededor de 335 nm y una longitud de onda de emisión
 máxima alrededor de 445 nm. Análogamente, si el substrato (B)
 contiene grupos metoxi como R₁ y R₂, entonces el cromófero
 resultante presentará una longitud de onda de excitación má-
15 xima de 365 nm aproximadamente y una longitud de onda de emi-
 sión máxima de unos 440 nm.

 Para poner en práctica el método de esta invención, pri-
 mero se disuelve el substrato en una solución acuosa estéril
 que preferiblemente contiene un tampón adecuado para asegu-
20 rar que el pH se mantiene en el valor óptimo o próximo a él
 para la enzima de interés. Por ejemplo, cuando la enzima a
 medir es γ -glutamyl-transpeptidasa, la reacción puede ser me-
 dida dentro de amplios límites de valores del pH desde 7,5
 a 9,0 aproximadamente, obteniéndose la máxima actividad en
25 el sistema de análisis fluorométrico a un pH de 8,2. La so-
 lución substrato se mezcla con la muestra (suspensión o so-
 lución) y se pasa a una cubeta adecuada, utilizando cualquier
 fluorómetro adecuado para medir la fluorescencia de la super-
 ficie frontal. La velocidad de producción del compuesto fluo-
30 rogénico es directamente proporcional a la cantidad de trans-
 ferasa presente en la muestra.

1 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la inven-
ción:

EJEMPLO 1

5 Puede medirse fluorométricamente la γ -glutamyl-transpe-
tidasa del suero utilizando como sustrato el hidrocioruro
del éster dimetílico del ácido γ -(L-glutamyl)-5-aminoisoftá-
lico. Este sustrato responde a la siguiente fórmula estruc-
tural:



15 La solución reactiva contiene 5 milimoles de sustrato,
55 milimoles de glicilglicina y 100 milimoles de tampón
Tris (pH 8,2 a 25°C), siendo el volumen de la solución de
1,5 ml. La solución reactiva se calienta a 37°C, se agrega
la muestra (volumen a 0,05 ml), se mezclan las sustancias
20 reaccionantes y se bombean a la cubeta de paso continuo. Des-
pués se mide la velocidad de aumento de la fluorescencia du-
rante 4 minutos como mínimo empleando un instrumento de su-
perficie frontal ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 465 \text{ nm}$). Siguiendo
este procedimiento, se mide la velocidad de variación de la
25 fluorescencia del producto final (éster dimetílico del ácido
5-aminoisoftálico) resultante de la hidrólisis del sustra-
to y se calcula la pendiente como la variación de fluores-
cencia por minuto de reacción.

30

1

EJEMPLO 2

5

Los resultados de unas muestras de suero ensayadas de acuerdo con el Ejemplo 1 se compararon con los resultados de análisis colorimétricos realizados sobre muestras del mismo paciente, utilizando el reactivo GGTP vendido por la Dade Division of American Hospital Supply Corporation y siguiendo el método indicado en las instrucciones del paquete. Para facilitar la interpretación de los datos, el $\Delta F/\text{min}$ se pasó a unidades internacionales por litro (UI/l) totalizando UI/l y $\Delta F/\text{minuto}$ y obteniendo un factor UI/ ΔF . Los sueros se analizaron en dos grupos de 14, representando un grupo las condiciones sin diagnosticar y el otro las condiciones diagnosticadas, obteniéndose los siguientes resultados:

10

Actividad γ -glutamyl-transpeptidasa (UI/l)

15

<u>Muestra</u>	<u>Fluorometría</u>	<u>Colorimetría</u>
1	47	45
2	52	51
3	12,5	17
4	85,4	79
5	113,4	110
6	196,9	195
7	14,5	17
8	14,5	18
9	345	344
10	43,4	48
11	48,8	72
12	236,4	225
13	212,3	198
14	259,6	260
15	80,9	87

20

25

30

	<u>Muestra</u>	<u>Fluorometría</u>	<u>Colorimetría</u>
1	16 Cáncer metastásico	87,5	119
	17 Gastritis	89,5	94
	18 Deshidratación	166,4	172
5	19 Ictericia obstructiva	23	26
	20 Colostomía	181	184
	21 Hepatomegalia	250,4	264
	22 Cáncer de vejiga	146,7	148
	23 Ictericia	164,0	167
10	24 Problema de cadera	215,4	200
	25 Enfermedad de Hodgkins	14,7	14
	26 Dolor de tórax, hipertensión	62,8	47
	27 Embolia pulmonar	174,2	150
	28 Sarcodosis	193,5	178

15 Estos datos ponen de manifiesto una excelente correlación entre el método fluorométrico y el método colorimétrico convencional para la determinación de los niveles en suero de γ -glutamyl-transpeptidasa.

EJEMPLO 3

20 El hidrocloreuro del éster dimetílico del ácido γ -(L-glutamyl)-5-aminoisoftálico utilizado como sustrato en el Ejemplo 1 puede prepararse mezclando anhídrido ftaloilglutámico (13,2 g, 0,051 moles) y éster dimetílico de ácido 5-aminoisoftálico (10,4 g, 0,050 moles) en 60 ml de dioxano y agitando a 55-60°C (temperatura del baño) durante hora y media. Después de evaporar el disolvente, el residuo se disuelve en 200 ml de metanol y 7,5 g (0,15 moles) de hidrato de hidrazina. La solución debe ser filtrada después y dejada en reposo a la temperatura ambiente durante 2 días. Después se recoge el precipitado blanco resultante, se lava con 100 ml de agua

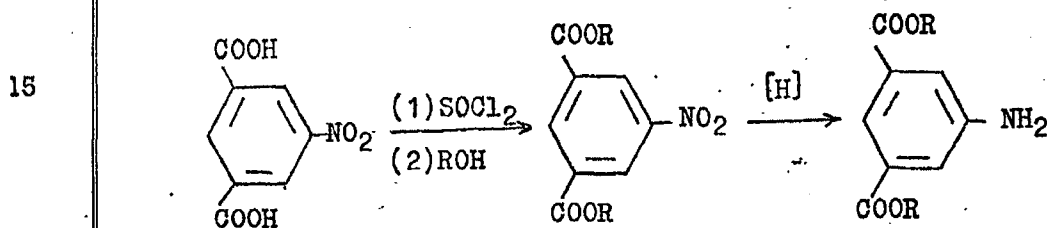
25

30

1 y 25 ml de etanol, se agita en 100 ml de ácido clorhídrico
0,5 N y se filtra. El filtrado se trata con bicarbonato sódico
para dar un pH de 6,5-7,0 y el precipitado (8 g) se reco-
5 ge y seca. El hidrocloreuro puede prepararse después disol-
viendo 1 g del derivado glutamílico en una solución de
0,3 ml de ácido clorhídrico concentrado y 6 ml de metanol.
Después de evaporar el metanol, el sólido se seca a presión
reducida.

EJEMPLO 4

10 El siguiente procedimiento puede utilizarse para prepa-
rar otros derivados de ácido aminoftálico que a continuación
pueden copularse con los aminoácidos apropiados en la forma
indicada:



20 Cuando ha de formarse una amida, se emplea RNH₂ en lu-
gar de ROH en esta ecuación. En cualquier caso, el producto
final se hace reaccionar después con el aminoácido particu-
lar deseado en la forma apropiada (como se ilustra en el
Ejemplo 3 en relación con el anhídrido ftaloilglutámico) pa-
25 ra producir el derivado de aminoácido final del ácido ami-
noftálico a utilizar como substrato para la determinación de
la actividad transpeptidasa y/o proteasa.

Aunque en lo que antecede hemos descrito la invención
con considerable detalle con fines ilustrativos, los exper-
tos en este campo entenderán que muchos de estos detalles

30

1 pueden ser modificados sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

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

5

REIVINDICACIONES

1. Un método fluorométrico para la determinación de la actividad de transferasas y proteasas en muestras de fluidos biológicos, que comprende las siguientes etapas:

10

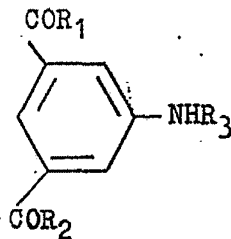
a) mezclar un substrato y una muestra de humor corporal que contiene una transferasa o una proteasa capaz de escindir a dicho substrato;

b) después exponer la mezcla a la luz ultravioleta con una longitud de onda comprendida entre 320 y 380 nm y

15

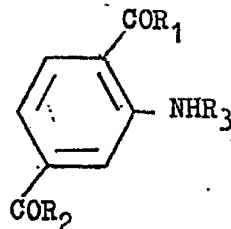
c) medir la velocidad de variación de la fluorescencia a una longitud de onda comprendida entre 420 y 480 nm; donde dicho substrato está seleccionado entre el grupo formado por

20



y

25



30

donde cada radical R₁ y R₂ representa -OH, -NH₂, -NHCH₃, -NHC₂H₅, -N(CH₃)₂, -N(C₂H₅)₂, -N(CH₃)(C₂H₅), -OCH₃ u

1 $-O(CH_2)_nCH_3$; n es un número entero de 1 a 4 y R_3 es un radical aminoácido susceptible de ser separado del resto del substrato en presencia de una transferasa con actividad específica para ese substrato.

5 2. Un método según la Reivindicación 1, donde la mezcla de reacción se expone a la luz ultravioleta de una longitud de onda de 365 nm aproximadamente.

10 3. Un método según la Reivindicación 1, donde la variación de fluorescencia se mide a una longitud de onda de 465 nm aproximadamente.

4. Un método según la Reivindicación 1, donde la primera etapa incluye la mezcla de glicilglicina con dicho substrato y la muestra, siendo R_3 un radical aminoácido transferible a la glicilglicina durante dicha etapa (a).

15 5. Un método según la Reivindicación 4, donde R_3 es γ -glutamilo y dicha transferasa es γ -glutamyl-transpeptidasa.

20 6. Un método fluorométrico según la Reivindicación 1 para la determinación de la actividad de γ -glutamyl-transpeptidasa en una muestra de fluido biológico, que comprende las operaciones de mezclar un derivado γ -glutámico del éster dimetílico del ácido 5-aminoisoftálico, o de una sal del mismo, con un aceptor de γ -glutamilo, un tampón para mantener un pH comprendido entre 7,5 y 9,0 y una muestra de un fluido biológico que contiene γ -glutamyl-transpeptidasa; después exponer la mezcla a la luz ultravioleta de una longitud de onda comprendida entre 320 y 380 nm y medir la velocidad de variación de la fluorescencia a una longitud de onda comprendida entre 420 y 480 nm.

25 7. Un método según la Reivindicación 6, donde la mezcla de reacción se expone a la luz ultravioleta de una lon-

30

1 gitud de onda de 365 nm aproximadamente.

8. Un método según la Reivindicación 6, donde la variación de fluorescencia se mide a una longitud de onda de 465 nm aproximadamente.

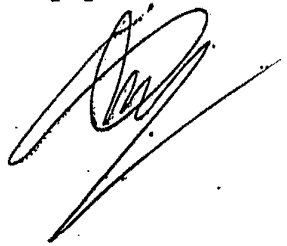
5 9. Un método según la Reivindicación 6, donde dicho aceptor es glicilglicina.

10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita:
UN METODO FLUOROMETRICO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE TRANSFERASAS Y PROTEASAS EN MUESTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS.

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

15

Madrid 20 de abril de 1978
BERNARDO UNGRIA
p.p...



20

25

30