

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO	10 A1
		477040	
22	FECHA DE PRESENTACION		
	12-1-1979		

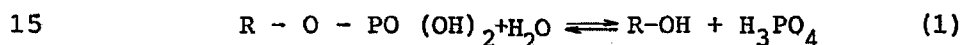
PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
19458 A/78	20-1-1978	ITALIA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61B	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"METODO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA"		
71 SOLICITANTE (ES)		
ISTITUTO SIEROTERAPICO E VACCINOGENO TOSCANO "SCLAVO" S.p.A., sociedad anónima italiana.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
SIENA (Italia), Via Fiorentina, 1		
72 INVENTOR (ES)		
Franco MEIATTINI		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO		

La presente invención se refiere a un método para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, basado en el empleo de una composición constituida por una sal del ácido para-nitrofenilfosfórico, una sal de magnesio, borato de sodio y 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol.

Es sabido que la fosfatasa alcalina se encuentra mayormente concentrada en el epitelio intestinal, en las partes abultadas de los huesos, en la capa cortical del riñón, en las glándulas mamarias, en el hígado, en la bilis, en la sangre y en la placenta.

La acción de la misma se evidencia en la catálisis de reacciones de hidrólisis de ortofosfatos según el esquema general



y su presencia en concentraciones elevadas en la sangre es indicio de algún estado patológico del organismo humano: un incremento de la actividad fosfatásica revela, por ejemplo, la aparición de enfermedades de origen hepático, intestinal y óseo.

La primera determinación de la fosfatasa alcalina en el suero humano se remonta al año 1930 (Kay. H.D., J. Biol.Chem. 89, 235 (1930)), y desde entonces las técnicas de determinación de la actividad enzimática han sufrido muchas variaciones, particularmente a causa de la influencia sobre la misma de parte del medio en el cual tiene lugar la susodicha reacción.

Muchos de los métodos seguidos para la determinación de la actividad fosfatásica se basan actualmente en la constatación de Axelrod (J. Biol. Chem. 172, 1, 1948) de que la enzima es capaz también de catalizar la reacción de transfosforilación entre el ortofosfato representado en el esquema (1) y un alcohol que actúa de aceptador.

En efecto, ahora es ampliamente empleado un método óptico para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, previendo este método óptico el empleo de p-nitrofenilfosfatos como primer sustrato para la realización de la reacción de transfosforilación arriba citada: este método prevé la mezcla del primer sustrato, del segundo sustrato aceptador y de la enzima, en condiciones adecuadas, y la lectura de la densidad óptica a 400-415 nm, siendo efectuada constantemente esta lectura a medida que va progresando la reacción. El aumento de densidad óptica en el tiempo es proporcional a la cantidad de producto transformado y, por tanto, un adecuado registro de los datos permite deducir la actividad de la propia enzima.

Actualmente es sabido (véase, por ejemplo, el texto "The Enzymes" editado por la Academic Press, 1961, página 55 y siguientes) que la fosfatasa alcalina presenta un óptimo de actividad a un pH variable alrededor de 10, y que su actividad es además mejorada por la presencia de sales minerales, particularmente sales de magnesio: estas consideraciones han obligado a todas las composiciones, hasta ahora empleadas industrialmente para la determinación de la enzima, a utilizar constituyentes estrechamente definidos y legalmente vincu-

lantes.

Así se ha difundido el empleo de derivados del ácido p-nitrofenilfosfórico en unión a sales orgánicas de magnesio y tampones necesarios para el mantenimiento del susodicho intervalo del pH. Los primeros reactivos empleaban amplia-
5 mente la sal sódica del ácido y tampones inorgánicos.

Después se ha comprobado que el p-nitrofenilfosfato de sodio tiene una estabilidad limitada y, por consiguiente, en tiempos recientes se ha preferido recurrir al uso de sales
10 del ácido con compuestos amínicos: la preparación de p-nitrofenilfosfatos, incluso de compuestos amínicos, y su empleo en formulaciones biológicas eran ya conocidos desde hace tiempo (véase, por ejemplo, JACS, vol. 79 (1957) pág. 3741).

Se ha intentado luego mejorar el comportamiento de la
15 reacción de transfosforilación y, en la composición inicial, se han variado así las sustancias aceptadoras hasta llegar, finalmente, a emplearse tampones que cumplieran, simultáneamente, la doble función de mantener constante el valor del pH y de actuar como aceptadores en la reacción de transfos-
20 forilación.

Cabe mencionar finalmente la exactitud con la cual deben ser preparados los diversos tampones, exactitud ésta que indudablemente tiene su peso en la economía general del reactivo y del análisis. Sin embargo, todas las mezclas hasta ahora
25 empleadas sufren todavía de numerosos inconvenientes, de entre los cuales cabe destacar la escasa estabilidad del reactivo en el transcurso del tiempo: incluso si se conserva en condiciones drásticas, las diversas composiciones no pueden

ser empleadas, con la seguridad de obtener resultados reproducibles, más allá de dos a tres días, como máximo, desde su preparación.

Además, muchos de los reactivos conocidos, tales como
5 los que utilizan manitol y alcoholes polihídricos similares, como aceptadores en la reacción de transfosforilación, determinan con buena sensibilidad también la fosfatasa alcalina de origen placentario.

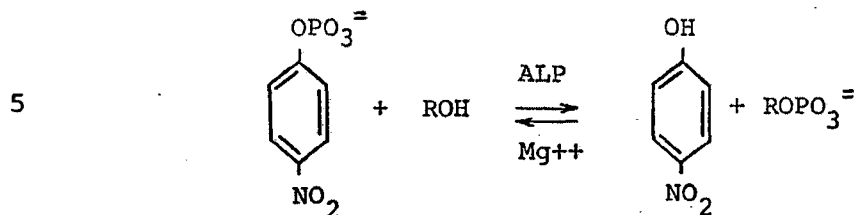
En la mayor parte de los casos, la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina se efectúa para diagnosticar
10 estados patológicos referentes al sistema hepático (ictericias de obstrucción), óseo (por ejemplo tumores e infección de Paget), o intestinal. Por consiguiente, en caso de embarazo, la alta actividad fisiológica de la fosfatasa alcalina en la sangre puede
15 encubrir uno o varios de los estados patológicos arriba indicados.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente un nuevo método que permite la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina y proporciona resultados altamente reproducibles sin ninguno de los inconvenientes arriba citados.

Este método se basa en el empleo de una composición
20 constituida por una sal del ácido para-nitrofenilfosfórico, una sal de magnesio, borato de sodio y 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol. Esta composición es estable y conserva durante muchísimos días sus propiedades iniciales, es escasamente sensible a la presencia de fosfatasa de origen
25 placentario que provoca los inconvenientes arriba citados, y no requiere, además, la exacta preparación de una sustancia tampón, siendo asegurado el pH de la reacción

de transfosforilación por los propios componentes.

El método propuesto prevé, obviamente, también el esquema



10 donde ALP es la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1.), y ROH es el propandiol arriba mencionado. Como la reacción se produce con un pH alcalino, se sigue la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol simplemente leyendo la extinción a 405 nm: en efecto, con pH alcalino, el p-nitrofenol está fuertemente coloreado de amarillo, mientras que el p-nitrofenilfosfato es incoloro.

15 El método permite la determinación de la actividad fosfatásica alcalina con una mezcla única de los diversos reactivos.

20 Puede ser empleado manualmente, o bien aplicado a aparatos automáticos "discretos" y de "flujo continuo". Puede ser empleado tanto para determinaciones en cinética como para determinaciones "a término" previa adición de un agente de bloqueo.

25 Para su realización pueden utilizarse diversos sustratos de partida aunque, naturalmente, es preferible evitar el empleo de la sal sódica del ácido p-nitrofenilfosfórico dada su tendencia a hidrolizarse espontáneamente. Pueden por ello citarse, por ejemplo, las sales del 2-amino, 2-metil, 1,3 propandiol, del 2-amino, 2-etil, 1,3 propandiol, del mismo

2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol, de ciclohexilamina, entre otros.

El sustrato donador puede evidentemente ser formulado según deseo por cuanto la afinidad hacia la enzima deriva del anión p-nitrofenilfosfórico y no del salificante.

Análogamente, la sal de magnesio puede elegirse entre una amplia gama de nombres, tales como acetato, aspartato, cloruro, sulfato.

Buenos resultados se han obtenido, por ejemplo, empleando la sal de ciclohexilamina como sustrato donador y el acetato de magnesio como activador de la reacción enzimática.

En lo que respecta al 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol, es decir el aceptador, la concentración del mismo en las composiciones empleadas en el método de la presente invención debe estar comprendida entre 0,7 y 2 molar.

EJEMPLO 1

Este ejemplo se refiere a la preparación de 50 kg de polvo de reactivo a partir de sales del ácido p-nitrofenilfosfórico (pNPP) con 2-amino, 2-etil, 1,3 propandiol (2A2E1,3PD), 2-amino, 2-metil, 1,3-propandiol (2A2M1,3PD) y ciclohexilamina (CEA). El aceptador, es decir 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol, es denominado TRIS.

Se secaron aproximadamente 1,5 kg de pNPP-CEA.H₂O, bajo vacío y sobre P₂O₅, a temperatura no superior a 30°C, durante unas 48 horas en la oscuridad. La humedad final debía ser $\leq 1,5$ %.

En lo que respecta al pNPP-2A2E1, 3PD o al pNPP-2A2M 1, 3PD, el secado se efectuó solamente si la humedad del producto

era $> 0,5 \%$.

La granulosisidad de los diversos componentes (TRIS, pNPP, Mg. acetato, Na. borato) se hizo homogénea mediante molidura y/o tamizado.

5 Se mezclaron después 48,35 kg de TRIS con 68,6 g de Mg. acetato. $4H_2O$ y con 683,5 g de Na. tetraborato. $10H_2O$ hasta que el polvo resultó homogéneo.

El polvo se distribuyó en vasijas de acero inoxidable, platillos u otros soportes adecuados para el secado a $70^\circ C$
10 durante unas 14 horas.

El todo se enfrió en ambiente anhidro y se tamizó otra vez para hacer homogénea la granulosisidad de la mezcla. La humedad final tenía que ser inferior al $0,6 \%$.

Se obtuvieron 48,76 kg de polvo "base".

15 El polvo "base" se adicionó a 1,37 kg de pNPP-CEA (o bien 1,49 kg de pNPP-2A2E1,3PD, ó 1,40 kg de pNPP-2A2M1,3PD) y el todo se mezcló uniformemente.

Un control estadístico para verificar la homogeneidad de la mezcla se efectuó determinando en muestras al azar
20 (3,5 g de mezcla + 20 ml de H_2O) el pH, el magnesio, el pNPP.

La humedad final no superaba el $0,8 \%$.

Repartición

Utilizando los diversos pNPP, se obtuvieron respectivamente:

25	50,13 kg con pNPP-CEA	I
	50,25 kg con pNPP-2A2E1,3PD	II
	50,16 kg con pNPP-2A2M1,3PD	III

A los fines del empleo del reactivo se hicieron las siguien-

tes consideraciones.

Una determinación ALP (3 ml) corresponde a 483 mg de I ó III y a 484 mg de II.

5 Dado que disolviendo el polvo en un cierto volumen de H₂O tal volumen aumenta aproximadamente un 12,5 %, puede calcularse el peso de polvo que deba distribuirse en el frasco al cual se adicionan 20 ml de H₂O, que se convertirán en 22,5 ml de solución producida:

10 $483 \times 22,5/3 = 3622$ mg en el frasco de I ó III y
 $484 \times 22,5/3 = 3630$ mg en el frasco de II

En los frascos de 2 l de solución completa deberán distribuirse, por el contrario, respectivamente:

322 g de I y III y
 323 g de II

15 EJEMPLO 2

Uno de los reactivos preparados según el precedente ejemplo fue empleado para la determinación de la actividad fosfatásica alcalina.

20 El reactivo fue calentado previamente a la temperatura de reacción y después se mezcló una parte alícuota de 3 ml con 0,05 ml de la muestra en examen.

El todo fue sometido a lectura fotométrica a 405 nm a la temperatura constante preseleccionada.

25 Se determinó la variación de densidad óptica (Δ D.O. min⁻¹). Para Δ D.O. min⁻¹ superiores a 0,750 (equivalente a aproximadamente 2500 mU/ml) la determinación se repitió con la muestra diluida en 1 : 10. En este caso, el resultado se multiplicó por 10.

El Δ D.O. min^{-1} hallado se introdujo en el siguiente cálculo para obtener las mU/ml:

$$\Delta \text{ D.O. min}^{-1} \times \frac{1000 \times V_t}{18,6 \times L_p \times V_s} = \text{mU/ml}$$

5

donde:

1000 = factor para pasar de unidades a miliunidades

V_t = volumen total de reacción = 3,05 ml

18,6 = coeficiente milimolar de extinción del pNP

10

L_p = recorrido óptico (light path) = 1 cm

V_s = volumen de la muestra = 0,05 ml

de lo que resulta:

$$\text{mU/ml} = \Delta \text{ D.O. min}^{-1} \times 3280.$$

EJEMPLO 3

15

Se efectuaron pruebas de comparación entre la composición empleada en el método según la presente invención y una composición conocida para la determinación de la actividad fosfatásica alcalina constituida por la sal de pNPP con CEA, magnesio aspartato y tampón carbonato: se emplearon las mismas partes alícuotas indicadas en el ejemplo precedente a una temperatura de 37°C.

20

Los resultados se ilustran en el gráfico de la Fig. 1 del dibujo adjunto, en donde: en las abscisas se indican las mU/ml obtenidas con el método según la invención y en las ordenadas las mU/ml obtenidas empleando la composición conocida.

25

La recta 1 es la curva ideal en el caso de que los dos métodos proporcionaran los mismos resultados; las señales 0

se refieren a muestras de fosfatasa de origen placentario; la recta 2 se refiere a la curva real de regresión lineal de la composición conocida respecto a la composición empleada en el método según la invención: esta regresión demuestra
5 que el método descrito en la presente es más sensible que el conocido aproximadamente en un 20 % (véase la desviación angular respecto a la curva ideal).

Esta mayor sensibilidad no se produce para fosfatasas de origen placentario que, por tanto, en el caso de la presente descripción resulta subdeterminada con respecto al método
10 conocido; en efecto, los puntos no rodeados de círculo se refieren a muestras conteniendo fosfatasa de origen diferente (hepático, óseo, intestinal).

La curva 2 corresponde a la ecuación $Y = 0,727 x + 9,01$,
15 mientras que en la curva 1 es, obviamente, $Y = x$.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle.
20 También se hace constar que esta invención corresponde a la descrita en la Solicitud de Patente N^o 19458 A/78, depositada en Italia en 20 de Enero de 1978, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y por lo que se solicita Patente de Inven-
25 ción, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:

REIVINDICACIONES

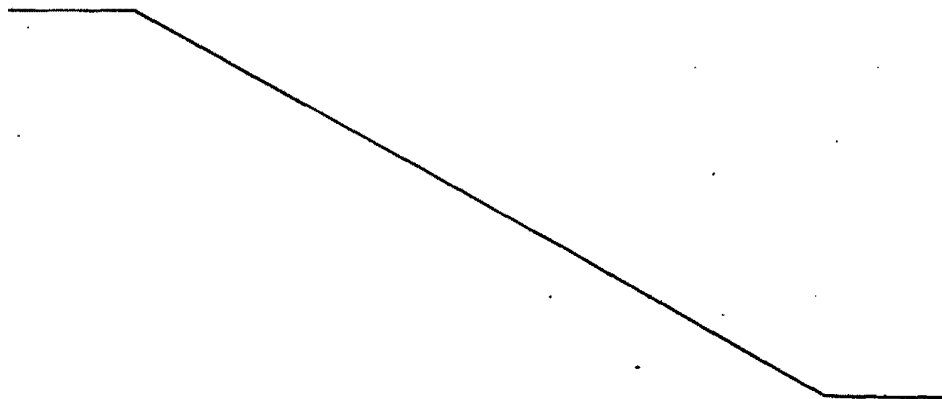
1^a.- Método para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, caracterizado porque se pone en contacto la muestra en la que se está interesado con una composición constituida por una sal del ácido p-nitrofenilfosfórico, una sal de magnesio, borato de sodio y 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol.

2^a.- Método según la reivindicación 1^a, caracterizado porque la concentración del 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3-propandiol se elige entre 0,7 y 2 molar.

3^a.- Método según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la sal del ácido p-nitrofenilfosfórico se selecciona de entre las sales de 2-amino, 2-metil, 1,3-propandiol, 2-amino, 2-etil, 1,3 propandiol y ciclohexilamina.

4^a.- Método según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la sal de magnesio se selecciona de entre acetato, aspartato, cloruro y sulfato.

5^a.- METODO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA,

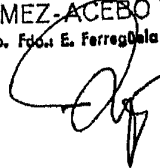


tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de doce hojas mecanografiadas por una sola cara y de una lámina de dibujos.

BARCELONA, 12 de Enero de 1978.

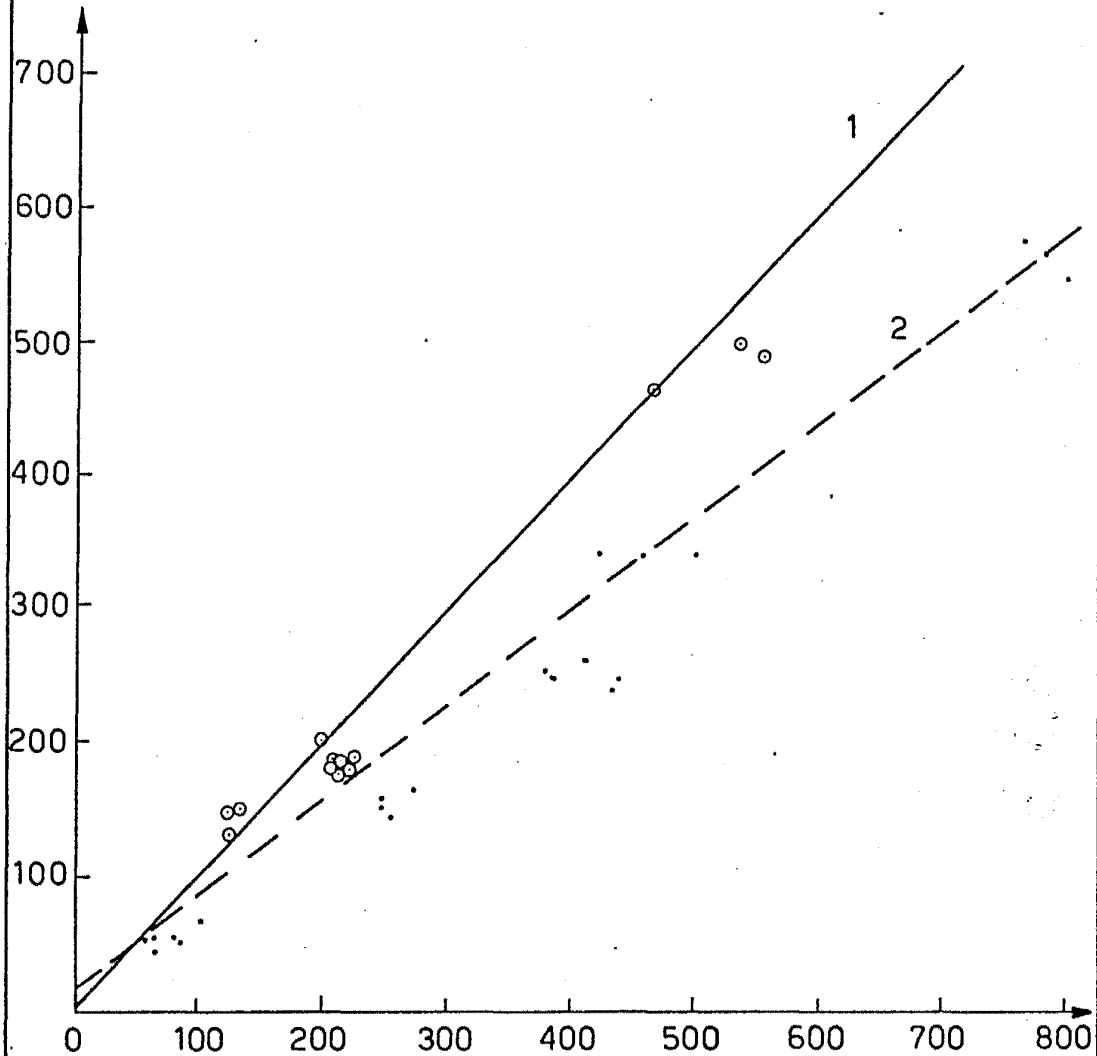
ISTITUTO SIEROTERAPICO E VACCINOGENO
TOSCANO "SCLAVO" S.p.A.
P.P.

J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO
p. p. Fdca. E. Ferregola Colón



DIAGRAMA

Fig.1



BARCELONA, 12 de Enero de 1979
ISTITUTO SIEROTERAPICO E VACCINOGENO
TOSCANO "SCLAVO" S.p.A.
P.P.
J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO
p. p. Fdo.: E. Ferragüels Colada