

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 188**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2001 E 01907837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1204862**

54 Título: **Método de separación, de identificación y de cuantificación de las isofosfatasas alcalinas por electroforesis**

30 Prioridad:

10.03.2000 FR 0003142

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.11.2013

73 Titular/es:

**SEBIA (100.0%)
Parc Technologique Léonard de Vinci, Rue
Léonard de Vinci
91090 Lisses, FR**

72 Inventor/es:

BELLON, FRANCK

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 430 188 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

Método de separación, de identificación y de cuantificación de las isofosfatasas alcalinas por electroforesis.

5 La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) (abreviatura ALP), es una metaloenzima que consiste en un grupo de isoenzimas, presentes en diferentes tejidos de los organismos animales, y en particular en el hombre.

10 Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina presentan un interés en protocolos de diagnóstico de diferentes afecciones en el adulto o en el niño, y por lo tanto se han propuesto varios métodos para la separación y la medición de estas isoenzimas. Las isoenzimas de la ALP se pueden distribuir en cuatro clases: tisular no específica (hueso, hígado y riñón), intestinal adulta, intestinal fetal, placentaria. En el seno de una misma clase, pueden existir algunas variantes, a saber:

- 15 - hepáticas: hepática 1 (H1), hepática 3 (H2),
- ultra-rápida UF;
- ósea (Hueso)
- placentarias: placentaria 1 (P1), placentaria 2 (P2);
- intestinales: intestinal 1 (I1), intestinal 2 (I2), intestinal 3 (I3).

20 Por lo tanto, se distinguen nueve fracciones principales, que conviene poder separar, identificar y cuantificar, en particular con vistas a su investigación en patologías hepáticas y biliares, así como también en ciertas enfermedades de los huesos, que incluyen los tumores óseos, o en la enfermedad de Paget.

25 Algunas veces se utilizará a continuación el término "fracción" para designar una clase de isoenzimas de la ALP o una variante particular en el seno de una clase de isoenzimas. Sobre el soporte de electroforesis, una "fracción" corresponde a una banda revelada después de la migración.

30 El análisis de rutina más practicado sobre las isoenzimas de la fosfatasa alcalina consiste en medir la actividad enzimática total mediante un sustrato de esta enzima, generalmente el paranitrofenilfosfato. Sin embargo, este método no permite obtener la tasa de las diferentes isoenzimas.

35 El principal método de separación de análisis de estos compuestos recurre a las técnicas electroforéticas. Así, algunas veces se usa la isoelectroenfoque, que permite obtener una separación de 10 a 20 bandas en función de la técnica empleada. La identificación de todas estas bandas es difícil, lo cual convierte a la interpretación clínica en extremadamente delicada.

40 La electroforesis de zona permite separar convenientemente las principales formas de isofosfatasas. Sin embargo, algunas fracciones están superpuestas, en particular las fracciones Os, H1, P1 y por consiguiente deben efectuarse tratamientos complementarios para separarlas e identificarlas. Estos tratamientos deben realizarse sobre muestras biológicas ensayadas antes de su deposición sobre gel.

45 Estos tratamientos consisten por ejemplo en una desnaturalización térmica, una incubación con inhibidores específicos tales como urea, aminoácidos, etc., una incubación enzimática con neuraminidasa, ficina, fosfolipasa C, una incubación con antiseros específicos, antiplacentarios o anti-intestinales.

Se han abordado diferentes técnicas de separación practicadas actualmente en Van Hoof V.O., De Broe Marc, E., Clinical Laboratory Sciences, vol. 31, (3) 1994, Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns.

50 Una técnica particular se ha propuesto en la patente US n°5.264.098 que describe la separación de las isoenzimas de la ALP mediante una reacción de electroforesis sobre gel que emplea un tampón de gel que contiene por lo menos un detergente no iónico y un detergente aniónico.

55 Los tratamientos disponibles para la identificación y la cuantificación de las isoenzimas de la ALP presentan algunos inconvenientes para el análisis de rutina. Además de sus elevados costes, pueden ser por una parte largos y hacer considerablemente pesada la manipulación, y por otra parte, para una determinación completa (de la totalidad de las isoenzimas), es necesario realizar varios tratamientos (2 a 3) para una sola muestra, lo cual limita la cantidad de muestras que pueden ser simultáneamente analizadas sobre un mismo gel.

60 Se han propuesto otros tratamientos, que prevén por ejemplo el tratamiento de la muestra previamente a la deposición de la muestra sobre el gel de electroforesis. En este marco, la acción de la lectina WGA (Wheat Germ Agglutinin), es particularmente interesante (véase Sidney B. Rosalski, A. Ying Foo, Clinical Chemistry, 30/7, p. 1182-1186, 1984, Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzyme in plasma, patente EP 0 131 606 del 5/11/86). La patente EP 0 131 606 describe de este modo la detección diferenciada de la isoenzima de la ALP de los huesos y del hígado, que comprende el tratamiento de la muestra ensayada con lectina y luego la incubación de la mezcla obtenida seguida de la separación de la ALP ligada a la

lectina, de la fracción que contiene la ALP libre, y de la determinación en uno de los dos medios o en los dos, de la actividad ALP. Según un modo de realización particular de esta patente, la separación de las dos fracciones (ALP ligada a la lectina y ALP libre) se realiza por electroforesis.

5 Con excepción de las formas intestinales, todas las isofosfatasas poseen ácidos siálicos y por lo tanto están más o menos afectadas por un tratamiento con lectina WGA. Siendo la fracción ósea la más sialilada, es la que se verá más afectada por este tratamiento que le confiere, bajo condiciones apropiadas, un retardo de movilidad y por ello, la conduce a precipitarse en una zona distinta con respecto a la zona de localización de la fracción hepática.

10 Con el fin de convertir a la precipitación de las isoenzimas de ALP en más selectiva frente a la isoenzima ósea, algunos autores han utilizado detergentes tales como por ejemplo triton X 100 (Rosalki). Pero, a pesar la presencia de estos detergentes, subsisten unas interacciones residuales de la lectina WGA con otras isofosfatasas que provocan unas coprecipitaciones de estas fracciones con la fracción ósea.

15 Además de esta falta de especificidad, otro inconveniente de esta técnica es que complica considerablemente el análisis.

20 La publicación Rosalki S.B. *et al* citada anteriormente propone, alternativamente, la incorporación de lectina en el tampón utilizado para impregnar el gel de electroforesis, previamente a la utilización de este gel. Esto permite eliminar el tratamiento previo de la muestra. En este caso, la mayor parte de la fracción ósea precipita en la proximidad de la deposición de la muestra. Todas las otras isoenzimas con excepción de las isoenzimas intestinales, tienen su movilidad afectada por la acción de lectina WGA y, esto sucede a pesar de la presencia de los detergentes mencionados anteriormente.

25 En el marco de este tratamiento, las propiedades de la lectina empleadas, son su capacidad para interactuar específicamente con las isoenzimas de la ALP que poseen ácidos siálicos.

30 La patente US nº 5.667.654 describe la deposición de un reactivo después de la separación electroforética de los constituyentes de una muestra y después de que dichos constituyentes separados han sido mantenidos en un estado estático particular. Entre las actividades susceptibles de ser reveladas por un reactivo, figura la actividad fosfatasa alcalina.

35 La presente invención propone unos medios para superar, por lo menos en parte, los inconvenientes constatados en los métodos de la técnica anterior. En particular, la invención define un método que permite una separación y una identificación de las isoenzimas de la ALP, mejorada en el plano de la especificidad y de la sensibilidad.

40 La presente invención pone además a disposición de los usuarios y en particular de los clínicos, un procedimiento de separación, de identificación y de cuantificación de las principales isofosfatasas alcalinas, realizable en una sola etapa, sobre un soporte de electroforesis único fácil de producir.

La invención tiene por lo tanto por objeto un nuevo procedimiento de separación y de identificación de las isoenzimas de la ALP, por electroforesis, caracterizada porque se deposita la lectina, de manera localizada sobre el soporte de electroforesis.

45 La lectina depositada en solución de manera localizada, se puede difundir en el soporte, quedando al mismo tiempo localizada en una zona determinada de este soporte durante la migración electroforética.

50 La deposición en cuestión localizada en la proximidad de la zona de deposición de la muestra, se desmarca de la deposición uniforme sobre una zona extendida o sobre la totalidad del soporte de electroforesis, descrita en el estado de la técnica.

La invención, según la reivindicación 1, tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de separación por electroforesis, a partir de una muestra biológica, de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

55 La interacción en cuestión conduce a la formación de un complejo entre la lectina y la isoenzima de la ALP hasta la obtención de un equilibrio.

60 El procedimiento según la invención permite actuar de manera mucho más específica sobre la fracción ósea de la ALP que sobre las otras fracciones de la ALP, debido a la reacción de esta fracción con la lectina.

La muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra biológica susceptible de contener ALP y en particular, una muestra de fluido biológico tal como una muestra de suero o de plasma o eventualmente un extracto tisular extraído de un paciente.

65 En el marco de la invención, la electroforesis se realiza sobre cualquier soporte de electroforesis apropiado, en particular sobre gel, en particular sobre gel de agarosa o de poliacrilamida, o sobre una membrana porosa, en

particular de acetato de celulosa.

Las condiciones particulares definidas anteriormente para la realización de la electroforesis según la invención, se pueden aplicar en el marco de los métodos conocidos de electroforesis, ya se trate de métodos automatizados o no.

5 La zona de la deposición localizada de la lectina se determina en función del sentido de la migración de la muestra y de la lectina. Por lo tanto, se elegirá la zona de la deposición de la solución de lectina de tal modo que la muestra, en el momento de la migración, cruza la lectina, debiendo ser tenida en cuenta la movilidad de esta última en el momento de la migración. Asimismo, es necesario tener en cuenta la posición final alcanzada normalmente por las
10 otras isoenzimas de la ALP para determinar la zona de deposición de la lectina con respecto a la de la muestra. En la práctica, la lectina y la muestra están alejadas en 1 a 10 mm, ventajosamente en 5 mm, en el momento de la deposición de la muestra.

15 Las otras condiciones de deposición localizada de lectina tales como la concentración de lectina, el tiempo de aplicación sobre el soporte de electroforesis, se determinan de tal manera que hacen posible la separación de las isoenzimas ósea y hepática de la ALP en el momento de la electroforesis, bajo las condiciones de la reacción de migración.

20 En otros términos, el procedimiento de la invención permite, una vez determinados los parámetros de la electroforesis en lo que se refiere en particular a la deposición de lectina, la separación de las isoenzimas ósea y hepática, bajo condiciones satisfactorias para identificarlas con respecto a las otras isoenzimas de la ALP y preferentemente para cuantificarlas. La movilidad de las otras isoenzimas de la ALP, afectada durante el paso a través de la zona de presencia de lectina, se adapta a la normal fuera de esta zona.

25 Debido a que la fracción ósea de la ALP es la más sialilada, su migración electroforética es la más afectada por el paso de la muestra a través de la lectina depositada sobre el soporte. En consecuencia, se precipita en una zona que se puede distinguir de la zona de migración de las otras isoenzimas de la ALP.

30 Según la invención, el procedimiento de separación por electroforesis de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina (ALP) se caracteriza porque comprende:

- la deposición sobre el soporte de electroforesis de la muestra biológica que contiene las isoenzimas de la ALP a separar,
- 35 - la deposición en una zona determinada localizada sobre el soporte de electroforesis, de una solución de lectina capaz de interactuar con las isoenzimas de la ALP contenidas en la muestra,
- la aplicación de un campo eléctrico para permitir la separación electroforética, por migración de las isoenzimas de la ALP bajo condiciones que permiten la separación diferencial de las fracciones ósea y
40 hepática de la ALP.
- la revelación de las isoenzimas separadas de la ALP.

45 La revelación se realiza de cualquier manera conocida, preferentemente con ayuda de un sustrato de la ALP.

Se puede, a continuación de las etapas que conducen a la separación sobre el soporte de electroforesis de las isoenzimas de la ALP, proceder a un análisis cuantitativo de las diferentes isoenzimas separadas, o de alguna de ellas.

50 Para cuantificar las isoenzimas de la ALP detectadas al realizar la electroforesis, se pueden utilizar diferentes métodos. Se recurrirá por ejemplo a la medición de la densitometría del soporte de electroforesis, después de la coloración de las fracciones separadas de la ALP mediante un sustrato de la ALP.

55 Cuando la fracción ósea de la ALP está en exceso con respecto a la capacidad de fijación de la lectina depositada sobre el gel, la lectina puede que no precipite esta fracción en su totalidad. En este caso, la parte no precipitada sigue migrando con las otras fracciones, y se encuentra en forma de un arrastre cerca de las isoenzimas subyacentes en particular H2, I1, I2 e I3. Para cuantificar las diferentes isoenzimas se puede recurrir en este caso a una segunda deposición de la misma muestra sobre el mismo soporte, en ausencia de lectina. Sobre el perfil sin lectina, se determinan los porcentajes del bloque H1 Os P1 y de las fracciones separadas H2, I1, P2, I2, I3 y UF. El
60 porcentaje de la fracción Os se obtiene sustrayendo del bloque H1 Os P1 los porcentajes H1 y P1 determinados sobre el perfil con lectina.

65 En el marco de las definiciones proporcionadas anteriormente, de la realización de la electroforesis en presencia de una deposición localizada de lectina sobre el soporte de electroforesis, la invención permite efectuar la deposición de lectina y la deposición de la muestra de manera simultánea sobre el soporte de electroforesis.

Según la invención, la deposición de la muestra y la deposición de lectina están desplazadas en el tiempo.

Además, las deposiciones respectivamente de la muestra y de la solución de lectina sobre el soporte de electroforesis se pueden realizar durante unos tiempos idénticos o por el contrario, diferentes.

5 Ventajosamente, en el marco de las definiciones proporcionadas anteriormente, llegado el caso, consideradas en forma combinada, la lectina y la muestra se depositan durante un período de tiempo sustancialmente idéntico, y preferentemente de manera simultánea por razones prácticas y económicas.

10 Para una muestra determinada y para una concentración de lectina en la solución determinada, se elige la duración de la aplicación de la muestra y de la lectina y por lo tanto la cantidad de muestra y de lectina depositadas sobre el soporte de electroforesis de manera que se obtenga la precipitación de la fracción Os de las isoenzimas de la ALP de tal modo que las fracciones ósea y hepática se separan en el momento de la migración. Para la determinación de la concentración de la solución de lectina y la duración de aplicación de la solución sobre el soporte de electroforesis, se tiene en cuenta asimismo la temperatura alcanzada por el soporte en el curso de la migración.

15 Efectivamente, debido a que la interacción de la lectina con la fracción ALP ósea depende de la temperatura, se debe tener en cuenta la temperatura del soporte de electroforesis durante la etapa de migración. Una disminución de la interacción de lectina - ALP ósea debida a un aumento de la temperatura del soporte de electroforesis, se puede compensar con un aumento de la cantidad de lectina depositada y por lo tanto aumentando por ejemplo la concentración de la solución de lectina utilizada.

20 Estos parámetros se pueden determinar a la luz de las indicaciones siguientes y de los valores dados a título de ejemplo y si es necesario adaptados a unas las condiciones elegidas de electroforesis, realizando unos ensayos tales como los que figuran en los ejemplos que se dan a continuación.

La duración de la aplicación de la muestra y/o de la solución de lectina puede variar y estar comprendida en particular entre 5 y 20 minutos, preferentemente 15 minutos, para la muestra y/o para la lectina.

30 Esta deposición se puede efectuar por cualquier medio manual o automático conocido, por ejemplo mediante aplicadores del tipo "peines" por ejemplo unos dispositivos descritos en la solicitud de patente europea n° 0 493 996.

La lectina utilizada está en forma de una solución acuosa.

35 Por lo tanto, la concentración de lectina depositada sobre el soporte de electroforesis utilizado en unas condiciones habituales está comprendida entre 0,1 mg/ml y el límite de solubilidad de la lectina en agua. Esta concentración está situada ventajosamente entre 0,5 y 15 mg/ml, preferentemente entre 1 y 10 mg/ml.

40 Según un modo de realización particular de la invención, el procedimiento se caracteriza porque cuando la concentración de lectina está comprendida entre 1 y 20 mg/ml, la temperatura de migración está comprendida entre respectivamente 18°C y 53°C. Estas condiciones se pueden aplicar en particular para una deposición de la solución de lectina durante una duración cercana a aproximadamente 15 minutos con un aplicador del tipo peine tal como se describe en la solicitud de patente EP 0 493 996.

45 La invención se refiere en particular a un modo de realización del procedimiento de electroforesis según el cual, cuando las isoenzimas de la ALP presentes en la muestra ensayada presentan una movilidad electroforética en dirección al ánodo, la lectina se deposita entre el ánodo y la zona de deposición de la muestra.

50 Ventajosamente en este caso, la lectina se deposita entre el punto de deposición de la muestra biológica y la zona ocupada normalmente por la fracción intestinal 3(I3) al final de la etapa de migración, cuando esta fracción está presente en la muestra.

55 Se pueden utilizar diferentes lectinas en el marco de la invención. Las lectinas son unas proteínas que fijan los grupos sialilados. Entre las lectinas que se pueden utilizar en el marco de la invención, se citará la lectina de germen de trigo (*Triticum vulgare*) o WGA (*Wheat Germ Agglutinin*). La lectina WGA se puede obtener en las compañías Sigma, Pharmacia, etc.

60 La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento que responde a las definiciones dadas anteriormente y consideradas separadamente o en forma combinada, en el que se mejora la separación de las fracciones diferentes de la ósea y hepática 1 de la ALP.

65 Por lo tanto, la invención pone a disposición, en unas condiciones compatibles con los análisis efectuados en rutinas de laboratorio, unos medios que permiten la detección *in vitro* en una muestra biológica, de la presencia anormal de una o varias isoenzimas de la ALP.

Este procedimiento se puede utilizar en particular en el marco de un protocolo para el diagnóstico de una patología

hepática o biliar que corresponde a una presencia anormal de la fracción hepática de la ALP. La invención permite también investigar la presencia anormal de la fracción ósea en el marco del diagnóstico de patologías óseas.

5 Entran asimismo en el marco de la invención, unos kits para la realización de la separación por electroforesis, de las fracciones constituidas por las isoenzimas de la ALP.

10 El procedimiento de la invención ofrece por lo tanto la ventaja de permitir, sobre un soporte único de electroforesis sin tratamiento previo de la muestra, la determinación cualitativa de todas las isoenzimas de la ALP en un depósito y su determinación cuantitativa en dos depósitos sobre el soporte único. El soporte de electroforesis está desprovisto de lectina antes de su utilización, lo cual permite conservarla bajo condiciones de temperatura habituales y no modificar su precio de coste.

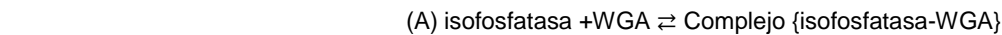
15 La invención tiene por lo tanto como objeto la utilización de una solución de lectina para la realización de una deposición en una zona localizada sobre un soporte de electroforesis.

Otras características y ventajas de la invención aparecen en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

20 Principios de la reacción que utiliza la lectina cuando está uniformemente repartida en el gel de electroforesis

La interacción de lectina WGA con una isofosfatasa poco sialilada puede estar representada por el equilibrio:



En las condiciones de electroforesis utilizadas normalmente, o sea a un pH básico, las isofosfatasas tienen una movilidad anódica mientras que la lectina tiene una movilidad ligeramente catódica. El complejo {isofosfatasa-WGA} tendrá por lo tanto una movilidad anódica más débil que la isofosfatasa libre.

30 Durante todo el tiempo de la migración, la isofosfatasa interactuará con la lectina WGA según el equilibrio de la reacción (A), y por lo tanto será más lenta.

35 Por lo tanto, el perfil obtenido sobre un gel sin lectina WGA en el que, bajo unas condiciones determinadas, todas las fracciones se separaban con excepción del bloque constituido por las enzimas H1, Os (eventualmente P1), conducirá a la obtención del gel que incorpora sobre toda su superficie lectina WGA, con un perfil en el que la H1 (eventualmente P1), estará liberada de la ósea, pero en el que las fracciones H1, P1 por una parte, y H2, I2, por otra parte, que estaban redisueltas sobre el gel sin lectina WGA, se confundirán. Será por lo tanto necesario, incluso para una simple estimación cualitativa de las isoenzimas de una muestra, recurrir a su electroforesis sobre los 2 tipos de geles, lo cual hace más pesado el análisis.

40 Además de este inconveniente, la lectina WGA es termosensible, lo cual hace que la producción de geles que la contienen sea muy delicada; además, los usuarios tienen la obligación de conservar estos geles entre 4 y 8°C con el fin de preservar intactos sus prestaciones.

45 Principios de la reacción según la invención, que utiliza la lectina depositada de manera localizada sobre el gel de electroforesis

50 En el marco de la invención, se deposita una solución de lectina WGA antes de la deposición de la muestra, es decir, entre la muestra y el ánodo. El gel de electroforesis no está por lo tanto impregnado con la lectina sobre toda su superficie. La lectina WGA se deposita simultáneamente o no con la muestra. Una vez realizadas las dos deposiciones, se aplica la tensión para obtener la separación electroforética.

55 Bajo estas condiciones, la mayor parte de la fracción Os precipita cuando atraviesa la zona en la que está depositada la lectina WGA. La movilidad electroforética de las otras fracciones de isofosfatasa está afectada por la lectina WGA según el equilibrio de la reacción:



60 pero únicamente cuando atraviesa la zona que contiene la lectina WGA. Esta zona es muy reducida (<1 mm), lo cual permite conservar un perfil prácticamente idéntico al obtenido en ausencia de lectina, con excepción de la fracción ósea que se encuentra separada de las fracciones H1 y P1. Bajo estas condiciones, la electroforesis de la muestra con depósito de lectina antes de la muestra permite el análisis cualitativo sobre un solo gel y en una sola etapa: la identificación de todas las isoenzimas según su posición es accesible y sin que sea necesario proceder a tratamientos complementarios de la muestra.

65 En el caso en el que es necesario cuantificar las diferentes isoenzimas que han sido separadas y reveladas

mediante un reactivo apropiado, es necesario tener en cuenta el hecho de que la precipitación de la fracción ósea con la lectina WGA no es total, en particular en el caso en el que esta fracción ósea está fuertemente aumentada. Una parte de las moléculas de la fosfatasa alcalina ósea escapa a la precipitación en el momento de atravesar el depósito de lectina. El enlace Os-WGA es sin embargo suficiente para que estas moléculas de fosfatasa alcalina ósea no precipitadas arrastren con ellas lectina WGA. Estarán por lo tanto suficientemente frenadas para no alcanzar la zona H1P1. Se obtiene entonces, además del arco de precipitación de la fracción ósea, un arrastre de la fosfatasa alcalina ósea que llega a la zona donde migra la H2. Bajo estas condiciones la cuantificación de las isoenzimas subyacentes a este arrastre, o sea las isoenzimas H2, I1, I2, I3 está perturbada por este arrastre.

5
10
15 Para efectuar la cuantificación en una situación en la que la cantidad de la fracción Os corre el riesgo de ser superior a la que puede precipitar, es preciso realizar lado con lado dos deposiciones de la misma muestra, una con deposición de lectina, y la otra sin. En el perfil con lectina WGA se pueden cuantificar las fracciones H1 y P1. En el perfil sin lectina se determinan los porcentajes del bloque H1 Os P1 y unas fracciones separadas H2, I1, P2, I2, I3 y UF. El porcentaje de fracción Os se obtiene restando al bloque H1 Os P1 los porcentajes H1 y P1 determinados sobre el perfil con lectina.

Por lo tanto, se puede determinar sobre un solo gel, en una sola etapa con dos deposiciones, el porcentaje de todas las isoenzimas sin ningún tratamiento previo de la muestra.

20 Concentración de lectina y temperatura de la electroforesis

25 La concentración de lectina a utilizar y la temperatura de migración (temperatura del soporte de electroforesis), están estrechamente ligadas. Efectivamente, el equilibrio de formación del complejo isofosfatasa-lectina WGA depende de la temperatura. Por lo tanto, la disociación del complejo está favorecida por el aumento de la temperatura. Se deberá aumentar la concentración de lectina para obtener el mismo poder de precipitación de la fracción ósea.

En la práctica, la concentración de lectina a utilizar depende de la temperatura del gel y se puede elegir de acuerdo con el esquema siguiente:

Temperatura del gel durante la migración °C	Concentración de lectina mg/ml
18	1
28	2
38	3
48	5
53	10

30
35
40 Por lo tanto, si el procedimiento se emplea de acuerdo con la invención con un sistema de electroforesis que no permite controlar la temperatura de migración (Ejemplo 1), se deberá incrementar la concentración de lectina para tener en cuenta la temperatura máxima alcanzada por el gel durante la migración. Esta temperatura depende de cierto número de parámetros tales como la fuerza iónica y las dimensiones del gel, los parámetros de migración y la temperatura exterior en el curso de la migración. Bajo las condiciones utilizadas en el Ejemplo 1, la temperatura máxima alcanzada por el gel es cercana a los 38°C, y por lo tanto se utiliza una concentración de lectina de 3 mg/ml. En el Ejemplo 2, el instrumento permite regular la temperatura de la electroforesis a 20°C. Sin embargo, para una electroforesis que se desarrolla con la energía constante de 20 W, la temperatura efectiva del gel es de 28°C. Por consiguiente, la concentración de lectina necesaria para obtener el efecto deseado es de 2 mg/ml.

40 Posición y duración de la deposición de lectina

45
50 Bajo las condiciones de pH (básico) utilizadas para la electroforesis, todas las isofosfatasas alcalinas presentan una movilidad en dirección al ánodo, la lectina presenta en revancha una movilidad muy débil en dirección al cátodo. Para que la fracción ósea encuentre la lectina, dicha lectina debe estar imperativamente depositada entre la muestra y el ánodo. Más precisamente, debe estar depositada a una distancia inferior o igual a la distancia recorrida por la fracción ósea bajo las condiciones de migración utilizadas y en ausencia de lectina. Sin embargo, con el fin de evitar que la fracción ósea precipite en una zona que ya está ocupada por otras fracciones, parece más práctico depositar la lectina a una distancia comprendida entre la muestra y la posición que ocupa la fracción I3 al final de la migración. En la práctica, la lectina se deposita delante de la muestra a una distancia comprendida entre 1 y 10 mm y preferentemente unos 5 mm.

55 La lectina se deposita al mismo tiempo o después de la muestra. La simultaneidad de las 2 deposiciones no es obligatoria. Sin embargo, si la muestra y la lectina no se depositan al mismo tiempo, es necesario velar para evitar la difusión de la primera deposición durante el período que dura la segunda. Es la razón por la cual es fácil depositar la muestra y la lectina simultáneamente y durante el mismo período de tiempo. Además, las dos deposiciones son paralelas entre sí y perpendiculares en el sentido de migración.

Ejemplo de realización N° 1

Gel de la siguiente composición:

5	Agarosa	1%
	Tris	0,03 M
	Veronal sodado	0,025 M
	Veronal ácido	0,005 M
	Azida de sodio	1 g/l
10	Triton X100	10 g/l
	Nonidet NP 40	5 g/l.

En un erlenmeyer de 100 ml se introducen 40 ml de agua desmineralizada y 0,5 g de agarosa. Después de 5 minutos de ebullición bajo agitación constante, la agarosa se disuelve y da una solución perfectamente límpida. La temperatura de esta solución vuelve a 50°C en un baño con termostato. En un erlenmeyer de 50 ml, se introducen 10 ml de tampón concentrado en solución que contiene 18 g/l de Tris, 27,75 g/l de veronal sodado, 4,6 g/l de veronal ácido, 5 g/l de azida de sodio, 50 g/l de Triton X100 y 25 g/l de Nonidet NP 40. Esta solución se mantiene a 50°C en el baño con termostato.

El tampón así precalentado se agrega a la solución de agarosa. El conjunto se homogeniza y se mantiene a 50°C.

Se cuelean entonces uniformemente sobre una película de plástico hidrófilo de 10 x 8 cm, 5 ml de la solución anterior extraída mediante una pipeta.

Después de gelificación y estabilización, se puede utilizar el gel. Los sueros frescos a analizar se depositan en dos depósitos adyacentes, a 2,5 cm del borde, por el lado catódico. Se aplica una solución de 3 mg/ml de lectina Wheat Germ Agglutinin (WGA) simultáneamente y durante el mismo tiempo a 32 mm delante de uno de los dos depósitos de cada muestra, es decir, entre la muestra y el ánodo. El tiempo de aplicación puede ser de 15 minutos para cada depósito realizado con un aplicador de membrana microporosa tal como el comercializado por Sebia y descrito en la solicitud EP 0 493 996.

La separación de las isofosfatasa alcalinas se obtiene por electroforesis en una cuba cuyos receptáculos contienen un tampón Tris 0,003 M de veronal sodado 0,025 M, veronal ácido 0,005 M, azida de sodio 0,1 g/l en un período de tiempo de 50 minutos bajo una tensión de 100 V constantes.

Las actividades fosfatasa alcalinas se revelan entonces incubando el gel con un sustrato clásico de esta enzima (por ejemplo fosfato de bromocloroindolilo y nitroazul de tetrazolio). Se obtiene entonces una coloración azul en el lugar de cada fracción de isofosfatasa, proporcional a su actividad. Después de la revelación, el gel se lava y luego se seca y se analiza por densitometría con el fin de cuantificar las diferentes isofosfatasa alcalinas.

Ejemplo de Realización N° 2

Gel de la siguiente composición:

45	Agarosa	1%
	Tris	0,38 M
	Acido bórico	0,06 M
	Azida de sodio	1 g/l
	Triton X100	10 g/l
50	Nonidet NP 40	5 g/l

En un erlenmeyer de 100 ml se introducen 40 ml de agua desmineralizada y 0,5 g de agarosa. Después de 5 minutos de ebullición bajo agitación constante, la agarosa se disuelve y da una solución perfectamente límpida. La temperatura de esta solución vuelve a 50°C en un baño con termostato. En un erlenmeyer de 50 ml se introducen 10 ml de tampón concentrado en una solución que contiene 229,9 g/l de Tris, 18,55 g/l de ácido bórico, 5 g/l de azida de sodio, 50 g/l de Triton X100 y 25 g/l de Nonidet NP 40. Esta solución se mantiene a 50°C en un baño con termostato.

El tampón así precalentado se agrega a la solución de agarosa. El conjunto se homogeniza y se mantiene a 50°C. Se cuelean entonces uniformemente sobre una película de plástico hidrófilo de 10 x 8 cm, 5 ml de la solución precedente extraída mediante una pipeta.

Después de gelificación y estabilización, se puede utilizar el gel. Los sueros frescos a analizar se depositan en 2 depósitos adyacentes, a 2,5 cm del borde, por el lado del cátodo. Se aplica una solución de 2 mg/ml de lectina Wheat Germ Agglutinin (WGA), simultáneamente y durante el mismo tiempo, a 5 mm delante de uno de los dos depósitos de cada muestra, es decir, entre la muestra y el ánodo.

ES 2 430 188 T3

La separación de las isofosfatasa alcalinas se obtiene mediante electroforesis en un instrumento que permite regular la temperatura a 20°C. La migración se realiza a una potencia constante de 20 W y durante 20 minutos.

- 5 El desarrollo de las actividades de fosfatasa alcalina y la densitometría se efectúan tal como en el Ejemplo anterior.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de separación por electroforesis, a partir de una muestra biológica, de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina (ALP), caracterizado porque comprende:
- depositar sobre un soporte de electroforesis la muestra biológica que contiene las isoenzimas de la ALP a separar;
 - depositar en una zona determinada localizada del soporte de electroforesis, una solución de lectina capaz de interactuar con las isoenzimas de la ALP contenidas en la muestra;
 - aplicar un campo eléctrico para permitir la interacción entre dicha lectina y las isoenzimas de la ALP contenidas en la muestra biológica analizada, y separación electroforética, por migración de las isoenzimas de la ALP bajo unas condiciones que permiten la separación diferencial de las fracciones ósea y hepática de la ALP;
 - revelar las isoenzimas separadas de la ALP.
2. Procedimiento de separación por electroforesis según la reivindicación 1, caracterizado porque la separación electroforética de las isoenzimas de la ALP está seguida por una etapa de análisis cuantitativo de las diferentes isoenzimas de la ALP separadas.
3. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la deposición de la solución de lectina y la deposición de la muestra biológica se efectúan simultáneamente.
4. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la deposición de la solución de lectina se realiza posteriormente a la deposición de la muestra biológica.
5. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la deposición de la solución de lectina se realiza antes de la deposición de la muestra biológica.
6. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la duración de la deposición de la solución de lectina y/o la duración de la deposición de la muestra están comprendidas entre 5 y 20 minutos.
7. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la concentración de la solución de lectina está determinada en función de la temperatura del soporte de electroforesis y de la duración de la aplicación de la solución de lectina sobre el soporte.
8. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la solución de lectina tiene una concentración comprendida entre 0,1 mg/ml y su límite de solubilidad en el agua.
9. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la solución de lectina tiene una concentración comprendida entre 1 y 10 mg/ml.
10. Procedimiento de separación por electroforesis según la reivindicación 9, caracterizado porque cuando la concentración de la solución de lectina está comprendida entre 1 y 10 mg/ml, la temperatura de migración está comprendida entre respectivamente 18°C y 53°C.
11. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la concentración de la solución de lectina está determinada en función de la temperatura máxima alcanzada en el seno del soporte de electroforesis durante la etapa de la migración.
12. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque, cuando las isoenzimas de la ALP presentan una movilidad en dirección al ánodo, la lectina se deposita entre el ánodo y la muestra biológica.
13. Procedimiento de separación por electroforesis según la reivindicación 12, caracterizado porque la lectina se deposita entre la muestra biológica y la zona ocupada normalmente por la fracción intestinal 3(I3) al final de la etapa de migración, cuando esta fracción está presente en la muestra.
14. Procedimiento de separación por electroforesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la lectina es lectina de gérmenes de trigo (Wheat Germ Agglutinin o WGA).
15. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el soporte de electroforesis es un gel de agarosa o de poliacrilamida.

16. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el soporte de electroforesis es una membrana de acetato de celulosa.
- 5 17. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se cuantifican las fracciones de la ALP reveladas.
18. Procedimiento de separación por electroforesis según la reivindicación 17, caracterizado porque la cuantificación se realiza midiendo la densitometría del soporte de electroforesis, después de la coloración de las fracciones de la ALP mediante un sustrato de la ALP.
- 10 19. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 18, para la detección de la presencia anormal de una o varias isoenzimas de la ALP.
- 15 20. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 19, para el diagnóstico *in vitro* de una patología hepática o biliar.
- 20 21. Procedimiento de separación por electroforesis según las reivindicaciones 1 a 19, para el diagnóstico *in vitro* de una patología ósea.