

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 970**

21 Número de solicitud: 201201137

51 Int. Cl.:

G01N 33/84 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.06.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
OTRI-Vicerrectorado de I+D+i, C/ Benito Pérez
Galdós, s/n
11002 Cádiz ES**

72 Inventor/es:

**RUIZ RODRÍGUEZ, Félix Alejandro y
MONTILLA RODRÍGUEZ, Liliana Marcela**

54 Título: **Procedimiento y kit para la determinación de polifosfatos inorgánicos en plasma sanguíneo**

57 Resumen:

Procedimiento y kit para la determinación de polifosfatos inorgánicos en plasma sanguíneo. Constituye un objeto de la presente invención un procedimiento para la determinación de los niveles de polifosfatos inorgánicos en el plasma sanguíneo. Este procedimiento comprende el empleo de la fracción del plasma crioprecipitado que concentra la mayoría de los polifosfatos y reduce la contaminación del fosfato libre en la muestra.

Constituye otro objeto de la presente invención un kit para la determinación de los polifosfatos en plasma sanguíneo.

ES 2 465 970 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO Y KIT PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFOSFATOS INORGÁNICOS EN PLASMA SANGUÍNEO.

OBJETO DE LA INVENCION

- 5 Constituye un objeto de la presente invención un procedimiento para la determinación de los niveles de los polifosfatos inorgánicos en el plasma sanguíneo. Este procedimiento comprende el empleo de la fracción del plasma crioprecipitado, que concentra la mayoría del polifosfato y reduce la contaminación del fosfato libre en la muestra.

10

ESTADO DE LA TECNICA

- Los polifosfatos inorgánicos (polyP) son polímeros de variado tamaño que están presentes en todos los seres vivos (Kornberg, A., *J Bacteriol*, **1995**, 177, 491-6). Como su nombre lo indica, los polyP están formados por más de tres residuos de fosfato, unidos entre sí por enlaces fosfoanhidro de alta energía (Figura 1A). (Kornberg, A., *J Bacteriol*, **1995**, 177, 491-6).

- En la industria los polyP han sido ampliamente usados en variadas aplicaciones que incluyen el procesamiento de alimentos, el uso como aditivo alimentario y la reducción de la dureza del agua, entre otros (Kornberg, A., *J Bacteriol*, **1995**, 177, 491-6).

- En años recientes, muy variadas funciones han sido asociadas a los polyP relacionadas con la medicina por ejemplo la modulación de la proliferación celular (Wang, L., Fraley, C.D. y col., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, 100, 11249-54), la angiogénesis (Han, K.Y., Hong, B.S. y col., *Biochem J*, **2007**, 406, 49-55), la mineralización de los huesos (Schroder, H.C., Kurz, L. y col., *Biochemistry (Mosc)*, **2000**, 65, 296-303), el metabolismo energético (Pavlov, E., Aschar-Sobbi, R. y col., *J Biol Chem*, 285, 9420-8) y metástasis de tumores (Tammenkoski, M., Koivula, K. y col., *Biochemistry*, **2008**, 47, 9707-13), entre otros. Se ha propuesto que los polyP

pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades de las encías (Yamaoka, M., Uematsu, T. y col., *Gerodontology*, **2008**, 25, 10-7), para estimular la regeneración de los huesos (Hacchou, Y., Uematsu, T. y col., *J Dent Res*, **2007**, 86, 893-7) y en la cicatrización de las heridas (Kim, H.R., Kim, H.Y. y col.),

- 5 En este sentido, nuestro grupo de investigación en el año 2004, describió que los polyP se acumulan en las plaquetas humanas y que son secretados por las plaquetas activadas en los procesos de coagulación de la sangre (Ruiz, F.A., Lea, C.R. y col., *J Biol Chem*, **2004**, 279, 44250-7). A partir de ese momento, ha surgido un marcado interés por el estudio de las posibles funciones de los polyP relacionadas con la
- 10 hematología. En consecuencia, se ha encontrado que los polifosfatos pueden modular la coagulación de la sangre tanto *in vitro* (Smith, S.A., Mutch, N.J. y col., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**, 103, 903-8) como *in vivo* (Muller, F., Mutch, N.J. y col., *Cell*, **2009**, 139, 1143-56), y también, que incrementan la fibrinólisis (Smith, S.A. y Morrissey, J.H., *Blood*, **2008**, 112, 2810-6). Por tanto se ha propuesto que los polyP
- 15 pueden ser usados para promover la coagulación y disminuir el sangrado (Morrissey, J.H., Smith, S.A. y col., **2006**, Patent US2006198837-A1; , **2010**, Patent US 2010/0143492 A1; Smith, S.A. y Morrissey, J.H., **2010**, Patent US2010/0297257 A1).

- Estos estudios, han servido de origen a recientes descubrimientos acerca de
- 20 funciones para de los polyP relacionadas con la inflamación. Los polyP estimulan la producción del péptido vasoactivo bradikinina, con la consecuente inducción de edemas (Muller, F., Mutch, N.J. *et al.*, *Cell*, **2009**, 139, 1143-56). Los polyP también inducen una la respuesta inflamatoria mediada por el factor nuclear “kappa beta” en las células endoteliales (Bae, J.S., Lee, W. y col., *J Thromb Haemost*, **2012**, 10,
- 25 1145-51). Más aún, nuestro grupo ha encontrado que las células de mastocitos y basófilos, determinantes en la inflamación y en los procesos de alergia, contienen estos polyP pro-inflamatorios en su gránulos secretores (Moreno-Sanchez, D., Hernandez-Ruiz, L. y col., *J Biol Chem*, **2012**, 287, 28435-44).

A pesar de la relevancia de los polyP en la coagulación y en la inflamación, los niveles presentes de este polímero en el plasma de la sangre no han podido ser determinados de manera precisa hasta el momento. Dependiendo los niveles encontrados dentro de las plaquetas, hasta ahora sólo se había estimado que debería estar en unos 3µM (Smith, S.A., Mutch, N.J. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**, 103, 903-8). La invención que aquí se presenta permite, por primera vez, la estimación precisa de los polyP en el plasma.

Una de las razones que dificulta la medida de polyP en al plasma sanguíneo es la alta concentración de fosfato inorgánico presente (figura 1B). Los niveles normales de fosfato en un adulto están entre 0,8 y 1,45mM (2,5- 4.5 mg/dL) (Yu, A.S.L., *Cecil Medicine*, **2011**, chap. 121), que son concentraciones 250-500 veces más altas que la estimadas para los polyP.

Recientemente se ha propuesto que algunas de las funciones del polyP en la sangre ocurren a través de su unión con las proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Hasta el momento se ha descrito que los polyP se unen y afectan las actividades de las siguientes proteínas del plasma: factor XII (Muller, F., Mutch, N.J. *et al.*, *Cell*, **2009**, 139, 1143-56), fibrina y fibrinógeno (Smith, S.A. y Morrissey, J.H., *Blood*, **2008**, 112, 2810-6; Mutch, N.J., Engel, R. *y col.*, *Blood*, **2010**, 115, 3980-8), trombina (Mutch, N.J., Myles, T. *y col.*, *J Thromb Haemost*, **2010**, 8, 548-55), Proteasa activadora de Factor VII (FSAP) (Muhl, L., Galuska, S.P. *y col.*, *Febs J*, **2009**, 276, 4828-39) y Factor von Willebrand (Montilla, M., Hernandez-Ruiz, L. *y col.*, *J Thromb Haemost*, **2012**).

Un procedimiento ampliamente usado para concentrar algunas de las proteínas del plasma, para donaciones, es la elaboración del crioprecipitado (EDQM, **2010**) (figura 1B). El crioprecipitado es un concentrado de proteínas de alto peso molecular que se forma cuando el plasma congelado es descongelado lentamente a temperaturas entre 1 a 6°C (Pool, J.G., Gershgold, E.J. *y col.*, *Nature*, **1964**, 203, 312). El concentrado contiene principalmente factor VIII (factor antihemolítico), factor von Willebrand, fibrinogeno, factor XIII, fibronectina, y pequeñas cantidades de otras proteínas del

plasma (Sparrow, R.L., Greening, D.W. y col., *Methods Mol Biol*, **2011**, 728, 259-65).

En el pasado, el crioprecipitado fue usado ampliamente para tratar pacientes con deficiencia del factor von Willebrand (Enfermedad de von Willebrand) o con
 5 deficiencia del factor VIII (Hemofilia A), pero en general el tratamiento de éstas patologías se ha ido reemplazando por la transfusión de concentrados de los factores purificados (Yang, L., Stanworth, S. y col., *Transfus Med*, **2012**, 22, 315-20). Actualmente, el uso del crioprecipitado es escaso, siendo común sólo para suplir el fibrinógeno en las coagulopatías específicas de los pacientes deficientes en esta
 10 proteína (hipofibrinogenemia), así como para tratar otras coagulopatías en los casos donde no se disponga de los factores del plasma aislados (Yang, L., Stanworth, S. *et al.*, *Transfus Med*, **2012**, 22, 315-20).

La invención que aquí se presenta está basada en el hallazgo de que **la mayoría de los polyP** presentes en el plasma de la sangre están unidos a las proteínas que se
 15 acumulan en la fracción del crioprecipitado (Figura 2A).

Referencias empleadas

ASCHAR-SOBBI, R. y col. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. **J Fluoresc**, v. 18, n. 5, p. 859-66, Sep 2008.
 20

AULT-RICHE, D. y col. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. **J Bacteriol**, v. 180, n. 7, p. 1841-7, Apr 1998.

BAE, J.S.; LEE, W.; REZAIE, A.R. Polyphosphate elicits pro-inflammatory responses that are counteracted by activated protein C in both cellular and animal
 25 models. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 6, p. 1145-51, Jun 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

CLARK, J.E.; BEEGEN, H.; WOOD, H.G. Isolation of intact chains of polyphosphate from "Propionibacterium shermanii" grown on glucose or lactate. **J Bacteriol**, v. 168, n. 3, p. 1212-9, Dec 1986.

5 COELHO, P.H.; WOLF, T. **Device for fractionating constituent components of a substance using cryoprecipitation** Patent US 5,261,55 p. 1993.

CROOKE, E. y col. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. **J Biol Chem**, v. 269, n. 9, p. 6290-5, Mar 4 1994.

EDQM. **European Committee on Blood Transfusion. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components.** Strasbourg: European
10 Directorate for the Quality of Medicines & Health Care - Council of Europe 2010.

FOSTER, P.R. **Method of extracting cryoprecipitate from frozen blood plasma:** Patent US 4,638,048 p. 1986.

HACCHOU, Y. y col. Inorganic polyphosphate: a possible stimulant of bone formation. **J Dent Res**, v. 86, n. 9, p. 893-7, Sep 2007.

15 HAN, K.Y. y col. Polyphosphate blocks tumour metastasis via anti-angiogenic activity. **Biochem J**, v. 406, n. 1, p. 49-55, Aug 15 2007.

HERNANDEZ-RUIZ, L. y col. Platelet inorganic polyphosphate decreases in patients with delta storage pool disease. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 2, p. 361-3, Feb 2009.

20 KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J Bacteriol**, v. 177, n. 3, p. 491-6, Feb 1995.

KUMBLE, K.D.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. **J Biol Chem**, v. 270, n. 11, p. 5818-22, Mar 17 1995.

25 LANZETTA, P.A. y col. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. **Anal Biochem**, v. 100, n. 1, p. 95-7, Nov 15 1979.

LORENZ, B. y col. A novel method for determination of inorganic polyphosphates using the fluorescent dye fura-2. **Anal Biochem**, v. 246, n. 2, p. 176-84, Mar 15 1997.

LORENZ, B.; SCHRODER, H.C. Methods for investigation of inorganic polyphosphates and polyphosphate-metabolizing enzymes. **Prog Mol Subcell Biol**, v. 23, p. 217-39, 1999.

5 MONTILLA, M. y col. Polyphosphate binds to human von Willebrand factor in vivo and modulates its interaction with Glycoprotein Ib. **J Thromb Haemost**, Sep 24 2012.

MORENO-SANCHEZ, D. y col. Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. **J Biol Chem**, v. 287, n. 34, p. 28435-44, Aug 17 2012.

10 MORRISSEY, J.H. y col. **A composition useful for e.g. promoting clotting and slowing fibrinolysis, comprising a polyphosphate and a carrier**: Patent US2006198837-A1 p. 2006.

_____. **COAGULATION AND FIBRINOLYTIC CASCADES MODULATOR**: Patent US 2010/0143492 A1 p. 2010.

15 MUHL, L. y col. High negative charge-to-size ratio in polyphosphates and heparin regulates factor VII-activating protease. **Febs J**, v. 276, n. 17, p. 4828-39, Sep 2009.

MULLER, F. y col. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. **Cell**, v. 139, n. 6, p. 1143-56, Dec 11 2009.

20 MUTCH, N.J. y col. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. **Blood**, v. 115, n. 19, p. 3980-8, May 13 2010.

_____. Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 3, p. 548-55, Mar 2010.

25 PAVLOV, E. y col. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 13, p. 9420-8, Mar 26

POOL, J.G.; GERSHGOLD, E.J.; PAPPENHAGEN, A.R. High-Potency Antihemophilic Factor Concentrate Prepared from Cryoglobulin Precipitate. **Nature**, v. 203, p. 312, Jul 18 1964.

ROBINSON, N.A.; CLARK, J.E.; WOOD, H.G. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that polyphosphates are primers and determination of the size of the synthesized polyphosphate. **J Biol Chem**, v. 262, n. 5 11, p. 5216-22, Apr 15 1987.

RUIZ, F.A. y col. **METHOD AND KIT FOR THE DIAGNOSIS OF COAGULATION DISORDERS**: WIPO Patent Application WO/2009/109676 p. 2009.

_____. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. **J Biol Chem**, v. 279, n. 43, 10 p. 44250-7, Oct 22 2004.

RUIZ, F.A.; RODRIGUES, C.O.; DOCAMPO, R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 28, p. 26114-21, 15 Jul 13 2001.

SCHRODER, H.C. y col. Polyphosphate in bone. **Biochemistry (Mosc)**, v. 65, n. 3, p. 296-303, Mar 2000.

SMITH, S.A.; MORRISSEY, J.H. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2810-6, Oct 1 2008.

20 _____. **ANTICOAGULANT ANTAGONIST AND HEMOPHILLIA PROCOAGULANT**: Patent US2010/0297257 A1 p. 2010.

SMITH, S.A. y col. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 4, p. 903-8, Jan 24 2006.

25 SPARROW, R.L.; GREENING, D.W.; SIMPSON, R.J. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma. **Methods Mol Biol**, v. 728, p. 259-65, 2011.

TAMMENKOSKI, M. y col. Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. **Biochemistry**, v. 47, n. 36, p. 9707-13, Sep 9 2008.

WANG, L. y col. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11249-54, Sep 30 2003.

- 5 WURST, H.; KORNBERG, A. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. **J Biol Chem**, v. 269, n. 15, p. 10996-1001, Apr 15 1994.

WURST, H.; SHIBA, T.; KORNBERG, A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 177, n. 4, p. 898-906, Feb 1995.

YAMAOKA, M. y col. Effect of inorganic polyphosphate in periodontitis in the elderly. **Gerodontology**, v. 25, n. 1, p. 10-7, Mar 2008.

YANG, L.; STANWORTH, S.; BAGLIN, T. Cryoprecipitate: an outmoded treatment? **Transfus Med**, v. 22, n. 5, p. 315-20, Oct 2012.

- 15 YU, A.S.L. Disorders of Magnesium and Phosphorus. In: Goldman, L. y Schafer, A.I. (Ed.). **Cecil Medicine**. 24th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, v.chap. 121, 2011.

EXPLICACION DE LA INVENCION

Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento para la determinación de los niveles de polifosfatos en el plasma sanguíneo que incluye las siguientes etapas:

- 5 a) obtener una muestra biológica de un individuo. La muestra biológica incluye sangre y específicamente plasma sanguíneo.
- b) separar las proteínas de alto peso molecular del plasma. Un método propuesto para esta separación es el descrito para la obtención del crioprecipitado para transfusiones.
- c) determinar, en esta fracción de proteínas, el contenido del compuesto polifosfato.
- 10 Esta fracción de proteínas contiene la mayoría del polifosfato de la muestra a la vez que cantidades ínfimas de fosfato contaminante.

Los polyP plasmáticos son potentes moduladores de la coagulación y/o trombosis y también tienen también un papel determinante los procesos inflamatorios. Por tanto, los contenidos de polyP en plasma pueden ser utilizados como medida indirecta de la trombosis y de la inflamación.

15

Por otra parte, para la presente invención se aportan ejemplos en los cuales la muestra biológica se toma de humanos, pero además de los humanos, se puede utilizar para determinar los niveles de polyP en otros mamíferos como por ejemplo, perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, ratas y ratones. Esto puede ser de especial importancia para estudiar enfermedades en animales de interés alimentario, así como para observar diferentes modelos animales de patologías.

20

Específicamente, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) obtención del una muestra biológica del individuo a determinar sus niveles de polyP plasmáticos.
- 25 b) aislamiento del plasma de los otros componentes de la muestra biológica.
- c) separación de las proteínas de alto peso molecular del plasma.
- d) separación de los polifosfatos inorgánicos del resto de componentes de la fracción de proteínas de alto peso molecular del plasma.

e) determinación cuantitativa del polifosfato solubilizado y separado en las etapas anteriores.

La etapa de aislamiento del plasma se lleva a cabo mediante un proceso de centrifugación simple.

- 5 La etapa de separación de proteínas de alto peso molecular se realiza mediante la congelación y posterior descongelación lenta del plasma, para formar la fracción conocida como crioprecipitado.

La separación de los polifosfatos de la fracción de crioprecipitado del plasma se realiza mediante un procedimiento que incluye extracciones con soluciones de fenol/cloroformo (polyP total). Alternativamente, la determinación de polifosfatos puede realizarse directamente en la fracción de proteínas del crioprecipitado mediante la precipitación de las proteínas con un ácido fuerte, como ácido perclórico o ácido tricloroacético, y la posterior la neutralización con solución alcalina (polyP unido a proteínas).

- 15 La determinación cuantitativa del polifosfato solubilizado y separado en las etapas anteriores se efectúa, directamente mediante colorimetría o fluorimetría, preferentemente colorimetría.

Alternativamente, la determinación cuantitativa del polifosfato solubilizado y separado incluye:

- 20 a) un ataque enzimático para procesar el polifosfato, liberándose los productos resultantes de dicha reacción enzimática.

b) determinación cuantitativa de alguno de los productos resultantes de la reacción enzimática mediante colorimetría o por luminiscencia, preferentemente mediante colorimetría.

- 25 Constituye otro objeto de la presente invención un kit para la determinación de los polifosfatos plasmáticos mediante el referido procedimiento. Dicho kit incluye:

- medios para aislar el plasma de la sangre y producir los extractos de proteínas de alto peso molecular (crioprecipitado).

- medios para la detección y cuantificación del polifosfato en el crioprecipitado.
- muestras de control de polifosfato y/o plasma para comparar con los valores obtenidos.

Adicionalmente, el kit puede incluir enzimas para el procesamiento específico de polifosfato en productos detectables mediante colorimetría o por luminiscencia.

En realizaciones preferentes del kit, los medios para producir extractos ácidos de las proteínas del crioprecipitado del plasma son ácidos que se seleccionan entre ácido perclórico o ácido tricloroacético, los medios para la detección y cuantificación del polifosfato son reactivos para ensayos colorimétricos, de fluorescencia o de luminiscencia, preferentemente reactivos colorimétricos que se seleccionan entre colorantes básicos como el azul de toulidina o fluoróforos como Fura-2 o DAPI.

En el caso de kits que incluyan enzimas, éstas se seleccionan entre las exopolifosfatasa, la polifosfato kinasas, o la polifosfato glucocinasas.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: En el panel A se muestra un esquema de una molécula de polyP (izquierda) y de una molécula de fosfato (derecha). Cada molécula de polyP contiene al menos tres residuos de fosfato. El símbolo designado como “n” representa un número entero superior a 1 y puede ser hasta varios cientos. El panel B muestra un esquema de obtención del crioprecipitado del plasma. El Plasma es congelado y luego descongelado lentamente a temperaturas de 1 a 6°C, lo que induce la precipitación de las proteínas de alto peso molecular o Crioprecipitado (CRIO). También se analizó la fracción de “Plasma Libre de Crioprecipitado” (PLC).

Figura 2: Se muestran histogramas de las medidas de polyP total (en el panel A) y de fosfato (en el panel B), en las fracciones de Crioprecipitado (CRIO) y de “Plasma Libre de Crioprecipitado” (PLC), según la metodología explicada en el Ejemplo 1. En todos los casos se ofrece los valores obtenidos a partir de 1 ml de plasma.

Figura 3: Se muestran histogramas de las medidas de polyP total (panel A), del polyP unido a proteínas (panel B) y de fosfato (panel C), en las fracciones de Plasma y de Crioprecipitado (CRIO), según la metodología explicada en el Ejemplo 2.

5 **Figura 4:** Se muestran histogramas de las medidas de polyP total (panel A) y del polyP unido a proteínas (panel B), en las fracciones de plasma crioprecipitado, según la metodología explicada en el Ejemplo 3. Las muestras fueron obtenidas de individuos sanos (Control) y de pacientes con dSPD (dSPD).

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA Y MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

Se ha identificado que la mayoría de los polyP se concentran en la fracción de crioprecipitado del plasma. Esta fracción posee niveles muy bajos de fosfato contaminante lo que permite la determinación precisa del polyP presente en el plasma. A pesar de la relevancia de los polyP en la coagulación y en la inflamación, los niveles presentes de este polímero en el plasma de la sangre no han podido ser determinados de manera precisa hasta el momento y el método propuesto resuelve este problema.

Utilizando la metodología descrita más detalladamente en el Ejemplo 1, se ha determinado las concentraciones de polyP y de fosfato en las dos fracciones resultantes del plasma después su congelación y descongelación lenta: El Crioprecipitado (CRIO) y el “Plasma Libre de Crioprecipitado” (PLC) (Figura 2). La mayoría del polyP se concentra en la fracción del CRIO y la mayoría del fosfato se acumula en la fracción PLC (Figura 2). Brevemente, el método se inició con la recogida de sangre de individuos sanos que no sufrían trastornos en la coagulación y que una semana antes de la donación de sangre no habían tomado medicaciones que pudieran afectar sus niveles de coagulación. Seguidamente, el plasma se aisló de la muestra de sangre por centrifugación simple. A continuación se obtuvieron las fracciones de CRIO y de PLC, mediante una congelación a -80°C y posterior

descongelación a 4°C, seguido de una centrifugación simple (Pool, J.G., Gershgold, E.J. *et al.*, *Nature*, **1964**, 203, 312; Edqm, **2010**). Otros procedimientos pueden ser usados para la separación del crioprecipitado, como el uso de aparatos separadores, membranas y filtros (Foster, P.R., **1986**, Patent US 4,638,048; Coelho, P.H. y Wolf, T., **1993**, Patent US 5,261,55).

Luego se separan los polyP totales de la muestra por un procedimiento descrito anteriormente (Kumble, K.D. y Kornberg, A., *J Biol Chem*, **1995**, 270, 5818-22) y que incluye: a) la degradación enzimática del ADN, el ARN y las Proteínas; b) extracciones con fenol/cloroformo y con tampón y con cloroformo; y c) concentrar los polyP extraídos para su posterior determinación. Otros procedimientos también podrían ser utilizados para la separación de los polyP como por ejemplo la separación de los polyP de cadena larga descritos en bacteria (Ault-Riche, D., Fraley, C.D. *y col.*, *J Bacteriol*, **1998**, 180, 1841-7). En paralelo, se extraen también los fosfatos contenidos en las muestras de CRIO y de PLC mediante la recogida del sobrenadante, luego de la precipitación con un ácido fuerte como se describe en el Ejemplo 1.

Varios métodos pueden ser utilizados para la detección de polyP, que incluyen, pero no están limitados a, reacciones metacromáticas con colorantes básicos como azul de toluidina (Lorenz, B. y Schroder, H.C., *Prog Mol Subcell Biol*, **1999**, 23, 217-39), la detección de los cambios de fluorescencia de fluoróforos como Fura-2 o DAPI en presencia de polyP (Lorenz, B., Munkner, J. *y col.*, *Anal Biochem*, **1997**, 246, 176-84; Aschar-Sobbi, R., Abramov, A.Y. *y col.*, *J Fluoresc*, **2008**, 18, 859-66), o la determinación colorimétrica de los productos resultantes después de la incubación de los extractos con enzimas específicas que procesan el polyP. Como ejemplos de las enzimas utilizadas en este último tipo de detección están la exopolifosfatasa (Wurst, H. y Kornberg, A., *J Biol Chem*, **1994**, 269, 10996-1001; Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O. *y col.*, *J Biol Chem*, **2001**, 276, 26114-21), la polifosfato kinasa (Robinson, N.A., Clark, J.E. *y col.*, *J Biol Chem*, **1987**, 262, 5216-22; Ault-Riche, D., Fraley, C.D. *et al.*, *J Bacteriol*, **1998**, 180, 1841-7), o la polifosfato glucokinasa (Clark, J.E., Beegen, H. *y col.*, *J Bacteriol*, **1986**, 168, 1212-9). Los productos de las reacciones

enzimáticas son marcados con cromóforos y son detectados y cuantificados con la ayuda de un espectrofotómetro o colorímetro o un luminómetro. En el ejemplo 1, el polyP ha sido cuantificado por el uso de la forma recombinante y purificada de la exopolifosfatasa inorgánica de levadura (Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O. *et al.*, *J Biol Chem*, 2001, 276, 26114-21). Así mismo, el fosfato de las muestras, así como el producido por la reacción enzimática de la exopolifosfatasa ha sido evaluado colorimétricamente por el uso de azul de molibdeno y verde de malaquita (Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J. *y col.*, *Anal Biochem*, 1979, 100, 95-7).

En el ejemplo 2, realizamos medidas en el Plasma completo y en la fracción de crioprecipitado de individuos sanos (Figura 3). Los niveles de polyP total (panel A) y de fosfato (panel C) fueron determinados como se explicó en el Ejemplo 1. También se incluye la medida del polyP unido a proteínas (panel B) que se obtiene mediante la precipitación de las muestras con un ácido fuerte (en este caso, ácido perclórico) y el posterior análisis de las proteínas precipitadas. Después de la precipitación, las proteínas son resuspendidas y neutralizadas, para seguidamente determinar los polyP unidos a éstas según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, que se basa en la degradación específica con la enzima exopolifosfatasa. En estas mediciones comprobamos que la fracción de crioprecipitado tiene los mayores niveles de polyP total y de polyP unido a proteínas, así como unas cantidades ínfimas de fosfato en comparación con el plasma (Figura 3).

Por último realizamos una prueba de concepto en el Ejemplo 3, utilizando el procedimiento de medida de polyP del plasma en individuos sanos y en pacientes con un trastorno de la coagulación denominado “enfermedad de los reservorios delta” (abreviado como dSPD) (Figura 4).

En algunos individuos, sus plaquetas están deficientes lo que resulta en un trastorno de coagulación denominado “enfermedad de los reservorios delta” o “delta-storage pool disease”. Nuestro grupo describió anteriormente que los pacientes con dSPD tienen menos polyP en sus plaquetas (Hernandez-Ruiz, L., Saez-Benito, A. *y col.*, *J Thromb Haemost*, 2009, 7, 361-3; Ruiz, F.A., Hernandez-Ruiz, L. *y col.*, 2009, WIPO Patent Application WO/2009/109676). Como la mayoría del polyP presente

en el plasma debe tener su un origen en las plaquetas, se cree que los pacientes con dSPD deben tener también menor contenido de polyP en el plasma.

Efectivamente, la medición de los niveles de polyP total y del polyP unido a proteínas (Figura 4), nos mostró niveles muy inferiores del polímero en los
 5 crioprecipitados de los pacientes con dSPD en comparación con los medidos individuos sanos (Figura 4).

Ejemplo 1:

Este ejemplo describe la metodología utilizada para medir los niveles de polyP total
 10 y de fosfato libre de las fracciones de crioprecipitado del plasma y del plasma libre de crioprecipitado (Figura 2).

Los experimentos fueron realizados en muestras de sangre de 10 individuos voluntarios. Los donantes confirmaron, que según su conocimiento, no tenían trastornos en la coagulación. Así mismo, los individuos del estudio confirmaron que
 15 no habían tomado alguna medicación que afectase a la coagulación de la sangre en la semana antes de la donación.

Se extraen 4.5 ml de sangre en tubos con citrato de sodio al 3,2%. Las muestras se centrifugaron a 1800 x g por 20 min a 4°C, para la obtención del plasma en el sobrenadante. Se separa el plasma en alícuotas de 1 ml y se congela a -80°C por un
 20 período mínimo de 24 horas. Se realiza la descongelación a 4°C, que tarda aproximadamente 30-45 min. A continuación, se centrifugan los plasmas descongelados a 1800 x g por 10 min a 4°C para separar dos fracciones: el Crioprecipitado (CRIO) en el pellet y el Plasma Libre de Crioprecipitado (PLC) en el sobrenadante. El Crioprecipitado se resuspende en 300 µl de solución salina (150mM
 25 NaCl, pH 7).

El polifosfato Total se aísla, del Crioprecipitado y del PLC, según el procedimiento descrito por Kumble y Kornberg (Kumble, K.D. y Kornberg, A., *J Biol Chem*, **1995**, 270, 5818-22) con modificaciones. Brevemente, a la muestra se le añade las enzimas ADNasa y RNAasa (a una concentración final de 40 µg/ml de cada una) y MgCl₂

(para obtener una concentración final de 5mM MgCl₂). Luego la muestra se incuba a 37°C por 30 minutos. A continuación añade la enzima Proteinasa K (350 µg/ml y se incuba a 37°C por 1 hora. Seguidamente, la muestra se extrae con una solución de fenol/cloroformo (1:1 equilibrada con Tris-HCL, pH 7,5), en el que las fases se obtienen por centrifugación a 14000 x g por 5 min. La fase acuosa se extrae dos veces con 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA y luego tres veces vez con Cloroformo saturado en agua (las fases se obtienen por centrifugación a 14000 x g por 5 min). Se precipita los polyP de la muestra añadiendo 2,5 volúmenes más de etanol muy frio y 10% del volumen de NaCl 5M. Se centrifuga a 14000 x g por 15 min, se extrae el sobrenadante. El pellet resultante se resuspende con 20 µl de agua y se utiliza para la determinación de polyP.

Los niveles de polyP fueron determinados en los extractos neutralizados por la medición del fosfato inorgánico (Pi) resultante después del tratamiento con un exceso de la enzima purificada exopolifosfatasa recombinante de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Enzima ScrPPX1). La Enzima ScrPPX1 fue obtenida por la expresión de un plásmido (cesión de la Universidad de Stanford) con el gen (rPPX1) con colas de histidina de la exopolifosfatasa recombinante de *S. cerevisiae* (Wurst, H., Shiba, T. y col., *J Bacteriol*, 1995, 177, 898-906), en la cepa de bacteria *E. coli* strain CA38 pTrcPPX1 (Crooke, E., Akiyama, M. y col., *J Biol Chem*, 1994, 269, 6290-5). El aislamiento de la Enzima ScrPPX1 fue realizado como se describe en Ruiz y col. (Ruiz, F.A., Lea, C.R. et al., *J Biol Chem*, 2004, 279, 44250-7). La determinación de polyP de los extractos neutralizados, se realizó como se describe a continuación: En un volumen final de 75 µl ajustado a concentraciones finales de 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, y 15 mM MgCl₂, se mezclan alícuotas de los extractos junto con 0.5 a 2 µg de Enzima ScrPPX1 purificada. Las incubaciones se realizan por al menos 20 min a 37 °C y la producción de Pi resultante fue monitorizada colorimétricamente por el método de detección de fosfato descrito por Lanzetta y col., que utiliza molibdato de amonio y verde de malaquita (Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J. et al., *Anal Biochem*, 1979, 100, 95-7).

30

El fosfato se aísla, del Crioprecipitado y del PLC, del sobrenadante resultante tras la precipitación con un ácido perclórico. Brevemente, a las muestras se les añade 1/5 de su volumen de ácido perclórico (HClO₄) 3 M. Después de una incubación en hielo de 30 min, los extractos ácidos fueron centrifugados a 14,000 x g por 5 min. Los sobrenadantes resultantes se neutralizaron por la adición de una solución de 1M KOH, 100 mM TrisHCl, lo que produce la formación de KClO₄ y la precipitación del mismo. El KClO₄ precipitado fue separado por centrifugación a 14,000 x g por 5 min, y el sobrenadante resultante fue utilizado para la determinación de fosfato.

El fosfato de la muestra fue monitorizado colorimétricamente por el método de detección de fosfato descrito por Lanzetta y col., que utiliza molibdato de amonio y verde de malaquita (Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J. *et al.*, *Anal Biochem*, **1979**, 100, 95-7).

Ejemplo 2:

Este ejemplo describe la metodología utilizada para medir los niveles de polyP total, de polyP unido a proteínas y de fosfato libre de las fracciones de plasma congelado y en crioprecipitado del plasma (Figura 3).

Los experimentos fueron realizados en muestras de sangre de 10 individuos voluntarios obtenidos como se explica en el Ejemplo 1. La obtención del Plasma y del Crioprecipitado del Plasma (CRIO), se realiza según procedimientos detallados en el Ejemplo 1. La extracción y detección de los polyP (Figura 3, panel A) y del fosfato (Figura 3, panel C), se realizaron según los procedimientos indicados en el Ejemplo 1.

Para la extracción del polyP unido a proteínas se midió el polyP resultante en el precipitado tras la precipitación con un ácido perclórico. A las muestras, de Plasma o de Crioprecipitado, se les añade 1/5 de su volumen de ácido perclórico (HClO₄) 3 M. Después de una incubación en hielo de 30 min, los extractos ácidos fueron centrifugados a 14,000 x g por 5 min a 4°C. Los pellets resultantes se resuspenden en 100 µl de solución salina (150mM NaCl, pH 7). De la muestra resuspendida se

- separan alícuotas de 5 μ l para la determinación de cantidad de proteínas por el método de Bradford, que utiliza el colorante “Brilliant Blue G” (Bradford, M.M., *Anal Biochem*, **1976**, 72, 248-54). El resto de la muestra respondida, se neutraliza con una solución de 1M KOH, 100 mM TrisHCl (hasta lograr un pH entre 6 y 8).
- 5 Luego se centrifugan a 13000 x g a 4°C durante 5 minutos. En el sobrenadante se determina la concentración de polyP, utilizando la enzima ScrPPX1 como se explica en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3:

- 10 Este ejemplo describe la metodología utilizada para medir los niveles de polyP del Crioprecipitado de plasma en controles sanos y en pacientes con el trastorno de coagulación “enfermedad de los reservorios delta” o dSPD (Figura 4).

- Los experimentos fueron realizados utilizando plasma de 10 individuos voluntarios sanos y de cinco pacientes con dSPD. Los donantes del grupo control confirmaron, que según su conocimiento, no tenían trastornos en la coagulación. Así mismo, todos
- 15 los individuos del estudio confirmaron que no habían tomado alguna medicación que afectase a las plaquetas en la semana antes de la donación de sangre. El diagnóstico de dSPD en los cinco pacientes utilizados se confirmó con anterioridad mediante el análisis de la incorporación de mepacrina por citometría de flujo y por el estudio de
- 20 la secreción de ATD utilizando luminescencia (Hernandez-Ruiz, L., Saez-Benito, A. *et al.*, *J Thromb Haemost*, **2009**, 7, 361-3).

- El plasma se obtuvo a partir de muestras de sangre según se explica en el Ejemplo 1. La preparación de crioprecipitado así como la extracción y detección de los polyP totales en las muestras (Figuras 4, panel A), se realizó como se explica en el Ejemplo
- 25 1. La extracción y determinación del polyP unido a proteínas (Figura 4, panel B) se realizó de manera similar como se detalla en el Ejemplo 2.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- Como los polyP plasmáticos son potentes moduladores de la coagulación y/o trombosis, el procedimiento objeto de la presente invención es óptimo para la estimación precisa y rápida de estos procesos. Por tanto, puede ser muy efectivo
- 5 como alternativa para evaluar pacientes con tratamientos anticoagulantes (como en la administración de heparinas y/o cumarínicos), o como ayuda para diagnosticar defectos en la coagulación congénitos (como la dSPD ó la hemofilia) o adquiridos (como sucede con los pacientes de enfermedades hepáticas y renales, leucemias mieloides, mielodisplasias o síndromes proliferativos).
- 10 Por otra parte, como los polyP plasmáticos tienen también un papel determinante los procesos inflamatorios, mediante la modulación de la producción de bradiquinina, el procedimiento objeto de la presente invención puede ser efectivo para estimar la gravedad de diferentes patologías con componente inflamatorio (como por ejemplo diabetes, infecciones, alergias o enfermedades autoinmunes, entre otras).
- 15 El procedimiento de la invención sirve de base para el desarrollo de kits para la evaluación y ensayo de los niveles de polyP en plasma de sangre humana y/o de animales. Por ejemplo, los kits podrían incluir enzimas y/o los ensayos colorimétricos que permitan la cuantificación del polyP en el plasma. Se espera que los kits apropiados incluyan, pero no estén limitados a, medios para preparar el
- 20 crioprecipitado de plasma y para separar la fracción proteica, medios para detectar y/o cuantificar polyP, y también muestras control de polyP para comparar con los valores obtenidos.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo que incluye las siguientes etapas:

- 5
- a) obtener una muestra biológica del individuo a determinar.
 - b) separar una fracción de la muestra, que contiene la mayoría del polifosfato.
 - c) determinar en dicha muestra el contenido de polifosfatos.

2.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según la reivindicación 1, caracterizado porque el individuo del que se obtiene la muestra biológica es un mamífero.

10

3.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según la reivindicación 2, caracterizado porque el mamífero del que se obtiene la muestra biológica es un humano.

15

4.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la muestra biológica incluye sangre.

20

5.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la muestra biológica incluye plasma.

6.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según la reivindicación 5, caracterizado porque cuando la muestra incluye plasma, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

25

- a) obtención de una muestra biológica del individuo a diagnosticar
- b) aislamiento del plasma de los otros componentes de la muestra biológica
- c) separación de la fracción de proteínas de alto peso molecular.
- d) separación del polifosfato inorgánico del resto de componentes de la fracción.
- 5 e) determinación cuantitativa del polifosfato solubilizado y separado en las etapas anteriores.

7.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según la reivindicación 6, caracterizado porque la etapa de aislamiento del plasma se
10 lleva a cabo mediante un proceso de centrifugación simple.

8.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque la separación de las proteínas de alto peso molecular se realiza mediante la congelación y descongelación lenta del
15 plasma y posterior centrifugación simple (crioprecipitado).

9.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 6-8, caracterizado porque la separación del polifosfato se realiza por extracción con soluciones de fenol/cloroformo, o bien mediante la
20 precipitación de las proteínas en un ácido fuerte como ácido perclórico o ácido tricloroacético.

10.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 6-9, caracterizado porque la separación del polifosfato solubilizado se lleva a cabo mediante centrifugación.
25

11.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 6-10, caracterizado porque la determinación cuantitativa del polifosfato solubilizado y separado en las etapas anteriores se efectúa, tras neutralización con solución alcalina, directamente mediante colorimetría o fluorimetría, preferentemente colorimetría.

12.- Procedimiento para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 6-10, caracterizado porque la determinación cuantitativa del polifosfato y solubilizado y separado en las etapas anteriores incluye tras la neutralización con solución alcalina

a) un ataque enzimático para procesar el polifosfato, para liberar los productos resultantes de dicha reacción enzimática.

b) determinación cuantitativa de alguno de los productos resultantes de la reacción enzimática mediante colorimetría o por luminiscencia, preferentemente mediante colorimetría.

13.- Kit para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque incluye:

- medios para aislar la fracción de crioprecipitado del plasma.

- medios para la separación, detección y cuantificación del polifosfato.

- muestras de control de polifosfato y/o plasma para comparar con los valores obtenidos.

14.- Kit para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según la reivindicación 13, caracterizado porque incluye adicionalmente enzimas para el procesamiento específico de polifosfato en productos detectables mediante colorimetría o por luminiscencia.

15.- Kit para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado porque los medios para producir extractos ácidos de las proteínas del crioprecipitado son ácidos que se seleccionan entre
5 ácido perclórico o ácido tricloroacético.

16.- Kit para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las reivindicaciones 13 – 15, caracterizado porque los medios para la detección y cuantificación del polifosfato son reactivos para ensayos colorimétricos, de
10 fluorescencia o de luminiscencia, preferentemente reactivos colorimétricos que se seleccionan entre colorantes básicos como el azul de toulidina o fluoróforos como Fura-2 o DAPI.

17.- Kit para la determinación del polifosfato en el plasma sanguíneo según las
15 reivindicaciones 14 – 16, caracterizado porque las enzimas se seleccionan entre las exopolifosafatasas, la polifosfato kinasas, o la polifosfato glucokinasas.

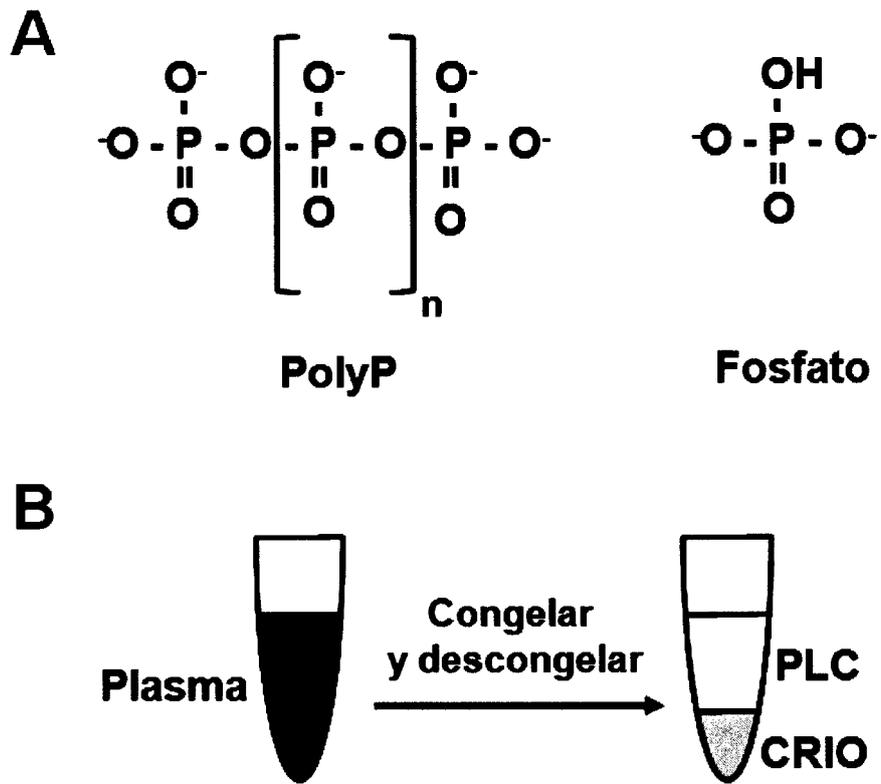


Figura 1

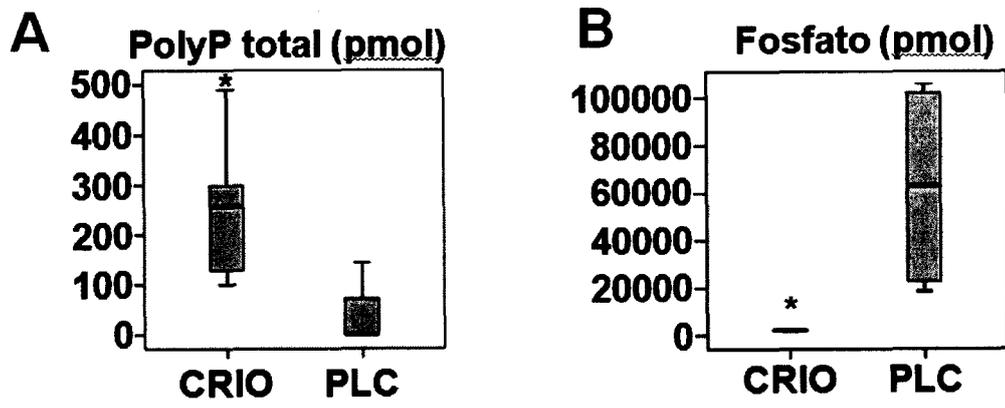


Figura 2

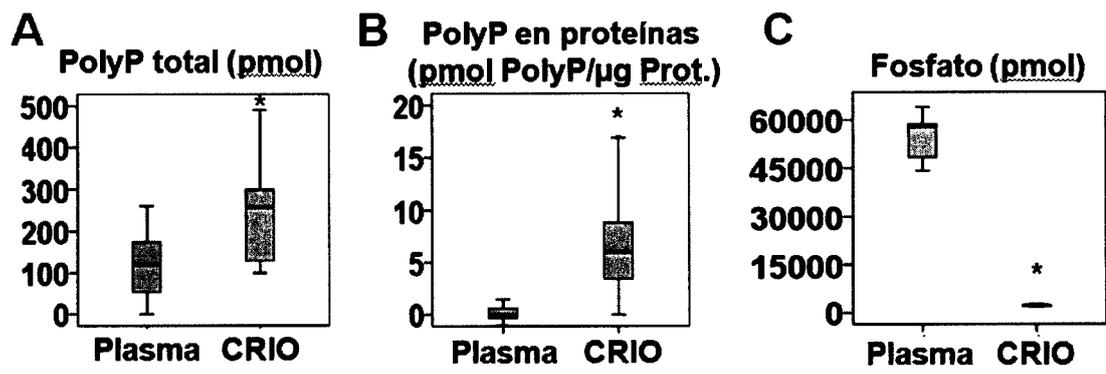


Figura 3

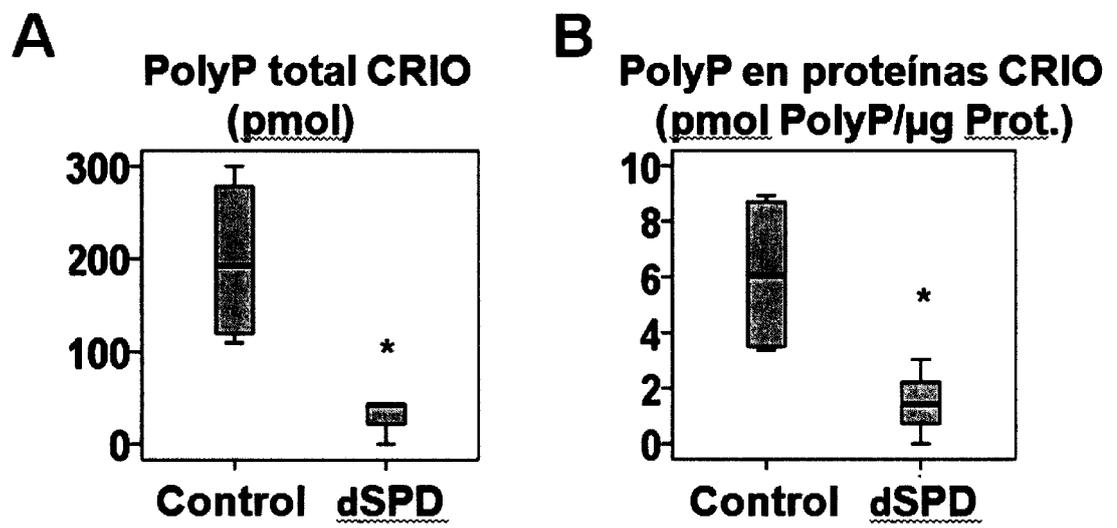


Figura 4



②¹ N.º solicitud: 201201137

②² Fecha de presentación de la solicitud: 09.11.2012

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/84** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤ ⁶ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A | ES 2325520 B2 (UNIVERSIDAD DE CÁDIZ) 05.02.2010, resumen; página 2, líneas 9-11; página 3, líneas 11,21-22,28-40. | 1-17 |
| A | LORENZ B., MÜNKER J., OLIVEIRA M. P., LEITAO J.M. MÜLLER W. E. G. y SCHRÖDER H. C. "A novel method for determination of inorganic polyphosphates using the fluorescent dye Fura-2." Analytical Biochemistry (1997), Vol. 246, páginas 176-184. Todo el documento. | 1-17 |
| A | KUMBLE K. D. y KORNBERG A. "Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues." The Journal of Biological Chemistry (1995) Vol. 270, páginas 5818-5822. Todo el documento. | 1-17 |
| A | JIMENEZ-NUÑEZ M.D., MORENO-SANCHEZ D., HERNÁNDEZ-RUIZ L., BENÍTEZ-RONDÁN A., RAMOS-AMAYA A., RODRÍGUEZ-BAYONA B., MEDINA F., ANTONIO BRIEVA J. y RUIZ A. F. "Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription." Haematologica (08.2012) Vol. 97, páginas 1264-1270. Todo el documento. | 1-17 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.06.2013

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.06.2013

Declaración

| | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-17 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| D01 | ES 2325520 B2 (UNIVERSIDAD DE CÁDIZ) | 05.02.2010 |
| D02 | LORENZ B., MÜNKER J., OLIVEIRA M. P., LEITAO J.M. MÜLLER W. E. G. y SCHRÖDER H. C. "A novel method for determination of inorganic polyphosphates using the fluorescent dye Fura-2." Analytical Biochemistry (1997), Vol. 246, páginas 176-184. Todo el documento. | 1997 |
| D03 | KUMBLE K. D. y KORNBERG A. "Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues." The Journal of Biological Chemistry (1995) Vol. 270, páginas 5818-5822. Todo el documento. | 1995 |
| D04 | JIMENEZ-NUÑEZ M.D., MORENO-SANCHEZ D., HERNÁNDEZ-RUIZ L., BENÍTEZ-RONDÁN A., RAMOS-AMAYA A., RODRÍGUEZ-BAYONA B., MEDINA F., ANTONIO BRIEVA J. y RUIZ A. F. "Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription." Haematologica (08.2012) Vol. 97, páginas 1264-1270. Todo el documento. | 08.2012 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento y kit para la determinación de polifosfatos inorgánicos en plasma sanguíneo.

El documento D01 se considera el más representativo del estado de la técnica y consiste en un procedimiento y kit para el diagnóstico de trastornos en la coagulación que comprende la detección del contenido de polifosfato inorgánico en muestras de sangre de humanos y otros mamíferos (ver resumen, página 2, líneas 9-11, página 3, líneas 11, 21-22 y 28-40).

El documento D02 consiste en un nuevo método de determinación de polifosfatos inorgánicos mediante el uso de Fura-2 (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio para determinar el nivel y tamaño de polifosfatos en varios tejidos de rata y ratón y líneas celulares de mamíferos (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un nuevo método de citometría de flujo para la detección de los niveles de polifosfatos en poblaciones celulares (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1. Reivindicaciones 1-17

Ninguno de los documentos D01-D04, o cualquier combinación relevante de ellos revela la determinación del polifosfato inorgánico en el plasma sanguíneo.

Por lo tanto, los documentos D01-D04 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.