



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: C 12 Q 1/40
G 01 N 33/52

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑪

633 583

⑳ Numéro de la demande: 6931/78

㉔ Date de dépôt: 26.06.1978

㉓ Priorité(s): 28.07.1977 US 820072

㉒ Brevet délivré le: 15.12.1982

㉑ Fascicule du brevet
publié le: 15.12.1982

㉑ Titulaire(s):
American Hospital Supply Corporation,
Evanston/IL (US)

㉒ Inventeur(s):
Richard C. Driscoll, Lake Forest/IL (US)
Robert J. Gargiulo, Miami/FL (US)
Joseph L. Giegel, Miami/FL (US)

㉑ Mandataire:
Patmed AG, Basel

⑤④ **Procédé de détermination de l'amylase.**

⑤⑦ L'invention concerne un procédé pour la détermination de l'amylase. Pour déterminer l'amylase on clive des substances chromogènes dont le chromophore est une substance colorimétrique fluorescente ou absorbant les ultraviolets, telles que des dérivés du p-nitrophénol et d'oligosaccharides dont la chaîne comporte 4 à 10 motifs de glucose; les oligosaccharides dont la chaîne a une telle longueur résistent au clivage par l' α - et/ou la β -glucosidase et comportent des liaisons endo- α -1,4 nécessaires à la manifestation de l'activité amylasique; le clivage des liaisons α -1,4 par l'amylase forme des fragments plus petits sur lesquels l' α -glucosidase et/ou la β -glucosidase agissent pour libérer le chromophore; la vitesse de libération du chromophore est proportionnelle à l'activité amylasique et permet des déterminations selon une méthode cinétique ou une méthode du point final.

L'invention s'applique en particulier à des déterminations qualitatives ou quantitatives de l'amylase dans des échantillons utiles pour le diagnostic médical.

REVENDECATIONS

1. Procédé pour déterminer la teneur en α -amylase d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter un substrat constitué d'un oligosaccharide chromogène à une solution contenant une quantité déterminée d'échantillon et de 1- α - et de la β -glucosidase et à déterminer l'activité amyli-
sique à partir de la quantité de chromophore libérée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on ajoute du phosphate de potassium comme tampon à la solution.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le substrat est un oligosaccharide comportant 4 à 10 motifs de glucose.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le chromophore est le p-nitrophénol.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le chromophore est la méthyl-4 ombelliférone.
6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le chromophore est une substance colorimétrique, fluorescente ou absorbant les ultraviolets.

La présente invention concerne un procédé pour déterminer l'activité amyli-
sique de liquides biologiques et plus particulièrement un nouveau procédé pour déterminer l'activité amyli-
sique à partir du clivage de dérivés à chromophore d'oligosaccharides ayant une chaîne constituée de 4 à 10 motifs de glucose.

Une des techniques les plus courantes et les plus étudiées de la chimie clinique est la détermination de l' α -amylase sérique et urinaire que l'on utilise pour le diagnostic des affections pancréatiques.

Pendant ces 25 dernières années, on a mis au point divers procédés de détermination de l'amylase utiles en laboratoire clinique. Certains de ces procédés, tel que le procédé saccharogénique, impliquent une technologie compliquée qui empêche leur emploi courant. D'autres procédés tels que les procédés turbidimétriques et viscosimétriques de détermination de l'activité α -amyli-
sique reposent sur des changements des propriétés physiques du substrat qui peuvent être influencés de façon considérable par d'autres facteurs présents dans le sérum. A ce jour l'un des procédés les plus couramment utilisés pour la détermination de l' α -amylase est le procédé à l'iode et à l'amidon. Dans ce procédé on ne mesure qu'une partie spécifique du substrat et l'enzyme n'agit pas dans des conditions de saturation du substrat. De plus la présence de protéines sériques peut gêner la réaction entre l'iode et l'amidon.

En plus des difficultés précitées de ces procédés, ils présentent l'inconvénient de ne permettre que la détermination d'une gamme limitée d'activité α -amyli-
sique. Egalement on ne peut utiliser certains de ces procédés pour la détermination précise des teneurs en α -amylase inférieures à la normale ou légèrement élevées.

On a indiqué que l'on peut déterminer l'activité α -amyli-
sique à partir de la solubilisation par l' α -amylase de grains d'amidon colorés. On a également indiqué que, lorsqu'on utilise de l'amidon soluble réticulé marqué par un colorant, en conditions alcalines, on peut déterminer l'activité α -amyli-
sique. Cependant ces procédés nécessitent une température d'incubation élevée, une durée d'incubation importante et

souvent une double dialyse pour qu'on obtienne une sensibilité appropriée. On a également utilisé des substrats synthétiques constitués d'amidon fluorogène ou chromogène pour déterminer l'activité amyli-
sique dans les liquides biologiques. Dans ces procédés on unit un chromophore par liaison covalente à un amidon réticulé insoluble dans l'eau. L'amylase agit sur le substrat et libère les fragments hydrosolubles que l'on mesure par spectroscopie après avoir tout d'abord séparé le résidu insoluble dans l'eau.

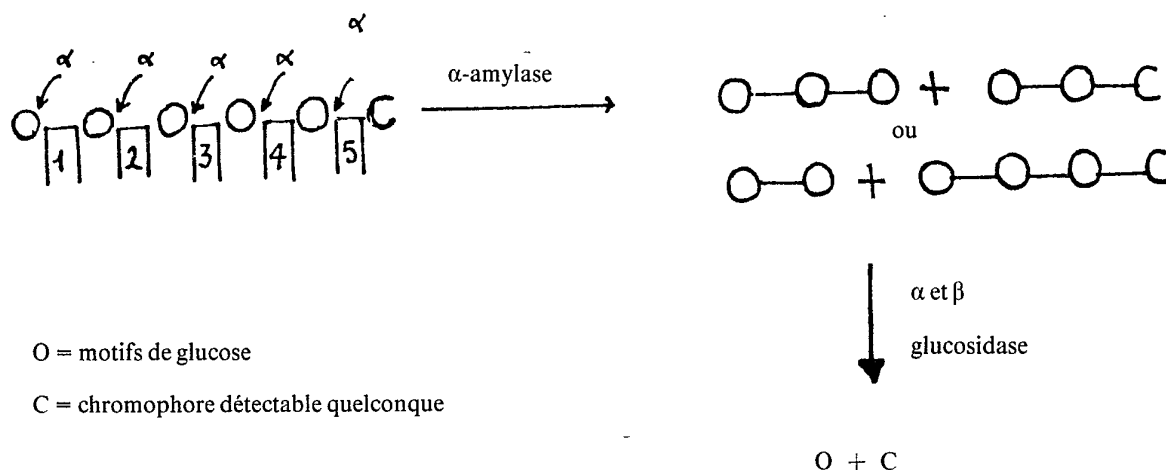
Dans une autre détermination avec un substrat synthétique (Nature, 182 (1958) 525-526), on utilise un dérivé du maltose formé avec le p-nitrophénol. Le p-nitrophénol remplace le radical hydroxy anomère du maltose. L'amylase provoque un clivage du substrat et libère le p-nitrophénol que l'on peut suivre à 410 nm. Cependant la détermination nécessite 16 heures et la maltase clive également le substrat. De plus, comme ce dérivé ne comporte pas de liaison endo- α -1,4, sa spécificité comme substrat de l'amylase est très douteuse.

Le procédé de l'invention diffère des procédés connus par une plus grande simplicité, une durée d'incubation très réduite et une sensibilité accrue. De plus dans le procédé de l'invention on utilise un polysaccharide de poids moléculaire déterminé au lieu du maltose. Un tel polysaccharide de poids moléculaire déterminé et marqué par le p-nitrophénol, bien qu'il ait une chaîne de longueur suffisante pour résister au clivage par la maltase et possède une liaison endo-1,4, réagit rapidement avec l'amylase.

L'invention concerne donc un nouveau procédé sensible pour la détermination de l'activité amyli-
sique, en particulier dans le sérum. Le nouveau procédé de détermination de l'amylase repose sur le clivage de dérivés formés avec le p-nitrophénol et des oligosaccharides ayant une chaîne constituée de 4 à 10 motifs de glucose. Les oligosaccharides ayant une chaîne d'une telle longueur résistent au clivage par l' α -glucosidase et contiennent des liaisons endo- α -1,4 nécessaires à la manifestation de l'activité amyli-
sique. Le clivage de ces liaisons α -1,4 par l'amylase produit des fragments plus petits sur lesquels agissent l' α -glucosidase et/ou la β -glucosidase qui libèrent le p-nitrophénol. La vitesse d'apparition du p-nitrophénol est donc proportionnelle à l'activité amyli-
sique.

Le maltotétraose est le plus petit oligosaccharide susceptible de clivage spécifique par l'amylase. On pourrait également utiliser des dérivés autres que ceux du p-nitrophénol pour mettre au point des techniques de détermination colorimétrique, fluorométrique ou ultraviolette. On prépare le dérivé du p-nitrophénol d'un mélange d'oligosaccharides comportant 4 à 10 motifs de glucose par acétylation du mélange d'oligosaccharides, puis réaction avec le p-nitrophénol en présence de chlorure stannique, puis désacétylation par le méthylate de sodium dans le méthanol. Le système réactionnel utilisé pour déterminer l'amylase est constitué du dérivé d'oligosaccharide, d' α - et de β -glucosidase et de tampon phosphate. On peut suivre la réaction en continu par le changement de l'absorption à 405 nm. De l'amylase de pancréas de porc purifiée donne des vitesses linéaires sans phase de la tence. Des essais préliminaires avec des échantillons prélevés sur des patients ont montré une bonne corrélation avec les procédés classiques de détermination de l'amylase.

La réaction du procédé de l'invention sera mieux comprise à l'examen du diagramme réactionnel suivant:



On sait que l' α -amylase agit de façon préférentielle sur les liaisons endo-1,4 des molécules de polysaccharide telles que les liaisons 2 et 3 ci-dessus. L' α - et la β -glucosidases d'autre part préfèrent les liaisons exo telles que les liaisons 1 et 5 ci-dessus. Cependant l' α - et la β -glucosidases n'agissent pas sur les molécules d'hydrate de carbone dont la longueur dépasse 4 motifs de glucose. On voit donc qu'une molécule à chromophore telle que (I) ci-dessus est attaquée par l'amylase sur les positions 2 et 3. Cette réaction conduit à deux combinaisons possibles de produits selon le point d'attaque de l'amylase, c'est-à-dire les liaisons endo-2 ou -3.

La demande a découvert que l'on peut, pour résoudre les problèmes associés aux techniques antérieures de détermination de l'amylase, remplacer le maltose par des polysaccharides ayant un poids moléculaire déterminé (4 à 10 motifs de glucose). Comme l'amylase agit de préférence sur les liaisons endo pour former des fragments plus petits, on l'utilise dans les conditions de la détermination de l' α - et de la β -glucosidases pour libérer le chromophore des petits fragments polysaccharidiques. Des substrats appropriés sont constitués par des dérivés du p-nitrophénol et de la méthyl-4 ombelliférone.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent un procédé de préparation du substrat dérivant du p-nitrophénol nécessaire au procédé de l'invention ainsi que le procédé de détermination de l'amylase de l'invention.

Exemple I

Synthèse du substrat.

a. Acétylation de l'oligosaccharide.

On dilue une suspension de 50 g d'oligosaccharides (DP-5 à DP-10) dans 50 ml de pyridine avec 200 ml d'anhydride acétique. On chauffe ensuite le mélange au bain-marie à 95°C en agitant pendant 3 heures. On verse 1500 ml d'eau glacée dans le mélange encore chaud. Il se forme une huile qui se solidifie par agitation. On lave le produit solide à l'eau, on filtre et on sèche. On recristallise le produit brut dans 400 ml d'éthanol pour obtenir 65 g d'un solide blanc.

b. Réaction du p-nitrophénol avec les oligosaccharides acétylés.

Dans un mélange à reflux de 40 g d'oligosaccharides acétylés et de 7,5 g de p-nitrophénol dans 120 ml de benzène et 60 ml de chloroforme (dépourvu d'éthanol), on ajoute 3 ml de chlorure stannique. Après 15 minutes de reflux, on rajoute 3 ml de chlorure stannique, puis on chauffe pendant 15 minutes. On dilue ensuite le mélange réactionnel avec 200 ml d'acétate d'éthyle et on extrait par l'eau, puis avec du bicar-

bonate de sodium saturé pour éliminer le p-nitrophénol.

Après séchage sur sulfate de magnésium, on chasse le solvant. On peut purifier le solide jaune par élution avec un mélange 4/1 d'acétate d'éthyle et d'heptane sur gel de silice. On isole 13 g d'un solide blanc.

25

c. Désacétylation des oligosaccharides.

A 7 g du dérivé de p-nitrophénol des oligosaccharides dans 60 ml de méthanol et 25 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 8 ml d'une solution de méthylate de sodium dans le méthanol (préparée à partir de 40 mg de sodium). Après 2 jours à 0°C, on centrifuge le mélange réactionnel pour isoler un précipité blanc qu'on lave avec un mélange 1/1 de méthanol et de chlorure de méthylène contenant plusieurs gouttes d'acide acétique, on décante, puis on lave deux fois à l'éther. On sèche le solide blanc sous vide pour obtenir 2 g du produit désiré.

30

35

Analyse élémentaire: azote = 0,64%.

Exemple II

Détermination de l'activité amylasique.

a. Procédé du point final.

On incube un mélange de détermination constitué de:

- 1) 0,8 ml de solution tampon (tampon phosphate de potassium 2×10^{-1} M, 5×10^{-1} M en NaCl avec 4 mg de substrat/ml de tampon);
- 2) 0,02 ml d' α -glucosidase (5 mg/ml);
- 3) 0,02 ml de β -glucosidase (5 mg/ml);
- 4) 0,05 ml d'échantillon;

50

pendant exactement 10 minutes à 37°C. Après exactement 10 minutes on arrête la réaction par addition de 3,0 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N. On enregistre ensuite la quantité de p-nitrophénol libérée au cours du temps qui est proportionnelle à l'activité amylasique, par mesure à 405 nm.

55

La figure I est un graphique permettant d'établir une comparaison entre des échantillons de sérum à activité amylasique élevée comprise entre la limite supérieure de la normale et onze fois cette limite (la gamme normale est comprise entre 60 et 150 unités Somogyi/dl) déterminée par turbidimétrie en fonction de l'absorbance de chaque échantillon déterminée selon le procédé du point final.

60

La figure II illustre les absorbances obtenues dans le procédé du point final par rapport aux absorbances obtenues dans le procédé iodométrique.

65

On trouvera ci-après les valeurs correspondant aux graphiques I et II. Comme on le voit, on observe pour les deux graphiques des relations linéaires.

Comparaison des résultats

(en unités somogyi/dl)

Echantillon	X limite supérieure de la normale	Procédé turbidimétrique	Procédé iodométrique	Procédé du point final
1	1X	172	166	192
2	2X	291	300	245
3	3X	421	417	478
4	4X	540	534	528
5	6X	910	858	919
6	11X	1659	1717	1629

FIG.1

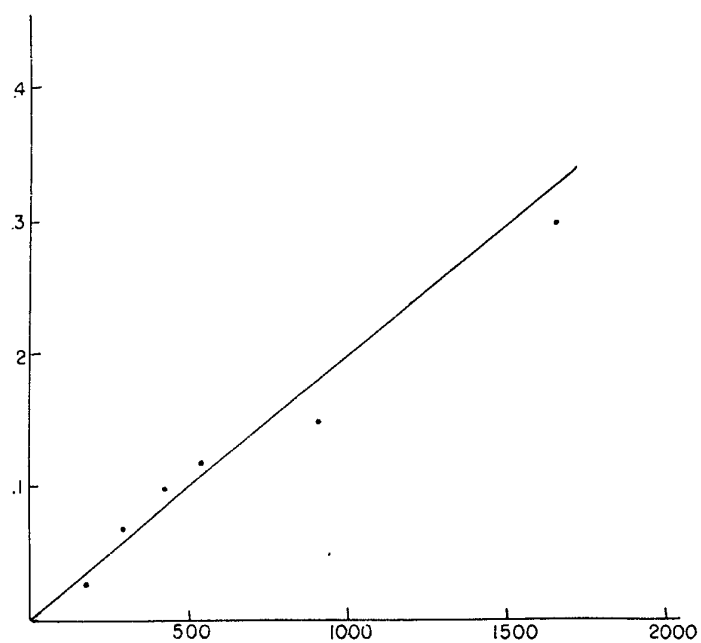


FIG.2

