



378692

CLASIFICACION	ACIC
CLASE	A61
SUBCLASE	B

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: GRAY INDUSTRIES, INC.

RESIDENCIA: 2300 West Commercial Boulevard, FORT
LAUDERDALE, Florida, USA

ENUNCIADO: "UN METODO PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE UN ENZIMA".

Prioridad: Patente estadounidense n.º 817.181 del 17-4-69

378692



1 Este invento se refiere a un método de mejorar la
estabilidad de los enzimas y a los productos así estabili-
zados.

5 Los enzimas son generalmente inestables cuando per-
manecen en un medio acuoso líquido ya sea en su menstuo
natural (después de separarlos de la fuente de células vi-
vas) o después de aislarlos de su menstuo natural y vol-
ver a suspenderlos o redisolverlos (reconstitución) en un
10 medio acuoso preparado. Por lo tanto, los enzimas comercia-
les, es decir enzimas preparados y comercializados para uso
industrial y médico, están normalmente secos, aunque en al-
gunos casos ciertas preparaciones de enzimas pueden ser in-
troducidas en el mercado como jarabes concentrados. Para el
momento en que puede conseguirse el completo secado o con-
15 centración, puede haberse producido cierto deterioro de los
enzimas. Para su aplicación final, los enzimas deshidrata-
dos o concentrados se reconstituyen con frecuencia por sus-
pensión o disolución en un medio acuoso. Esta reconstitución
constituye una oportunidad de errores especialmente cuando
20 el material reconstituído debe tener un valor de la activi-
dad definido por cada unidad de peso o volumen. Además, el
enzima reconstituído está sometido a deterioro, dependiendo
la velocidad y el grado del mismo de diversos factores, ta-
les como temperatura, concentración, tiempo y naturaleza del medio
reconstituyente, por ejemplo pH.

25 Por ejemplo, en los procedimientos de diagnóstico
electrónico automatizado para el estudio diagnóstico de
fluidos corporales, como sangre, plasma sanguíneo, suero
sanguíneo y orina, se requiere un suero sanguíneo de control
30 que debe ser lo más similar posible al suero sanguíneo fres-

378692



1 co, natural y normal. El suero sanguíneo, naturalmente,
contiene muchos enzimas. En el pasado, ha sido necesario
liofilizar el suero sanguíneo vendido para este fin. Des-
5 pués el técnico tenía que reconstituir el material liofi-
lizado con agua para uso en sus procedimientos. Esto pre-
sentaba limitaciones e inconvenientes. La liofilización por
sí misma puede alterar el delicado equilibrio de constitu-
yentes del suero. La reconstitución de los materiales lio-
filizados conducía frecuentemente a graves errores. Con fre-
10 cuencia, había que preparar una multiplicidad de diferentes
productos de suero sanguíneo liofilizados a partir de los
cuales el técnico tenía que seleccionar uno o más, según
la diagnosis particular que tuviera que realizar. Además,
el material reconstituído tiene una duración limitada, de
15 forma que normalmente había que reconstituir y utilizar
diariamente un envase nuevo de material liofilizado.

Lo que precede ilustra los problemas que se plan-
tean a causa de la inestabilidad de las preparaciones de
enzimas y se ha discutido con detalle porque el suero san-
20 guíneo representa un material con enzimas especialmente de-
licado e inestable al cual es particularmente aplicable el
presente invento. Sin embargo, como se observará después,
el presente invento es aplicable a los enzimas en general,
ya sea en su menstuo natural (después de separarlos de su
25 fuente de células vivas naturales o ambiente) o reconsti-
tuído.

De acuerdo con el presente invento, se proporciona
un método de mejorar la estabilidad de un enzima que con-
siste en enfriar el enzima en un medio acuoso a menos de
30 50°F (10°C) y después, en rápida sucesión, (a) someter el

378692



1 enzima en una zona de tratamiento, mientras se mantiene en
un contenedor cerrado, permeable a las microondas, dentro
de dicha zona de tratamiento, a una energía microondulato-
ria a través de una atmósfera móvil de gas refrigerante, du-
5 rante un tiempo menor que el de inactivación del enzima, encon-
trándose dicha atmósfera móvil en contacto directo con las
paredes permeables a las microondas de dicho contenedor
pero fuera del contacto directo con dicho enzima y encon-
trándose a una temperatura inferior a unos 60°F (15°C) du-
10 rante su admisión a dicha zona de tratamiento; (b) interrumpir
la exposición de dicho enzima a dicha energía microon-
dulatoria transcurrido el citado periodo y (c) enfriar di-
cho enzima. Preferiblemente, la circulación del gas refri-
gerante se prosigue después de interrumpir la exposición
15 del enzima a la energía microondulatoria durante un periodo
suficiente para proporcionar por lo menos una parte de la
refrigeración indicada. También preferiblemente, el mate-
rial enzimático es enfriado por debajo de 50°F (10°C) y
por lo menos la última porción de este enfriamiento puede
20 realizarse por otros medios, por ejemplo poniendo en contac-
to un contenedor de dicho material enzimático con un líqui-
do frío, como agua fría. También se prefiere que el conte-
nedor de material enzimático gire durante la exposición a
la energía microondulatoria a una velocidad suficiente para
realizar por lo menos una rotación completa de 360° durante
25 dicha exposición y preferiblemente una multiplicidad de ro-
taciones de 360° para asegurar la presentación de todas las
paredes principales del contenedor a la energía microondu-
latoria durante la exposición indicada.

30 El invento también proporciona un suero sanguíneo

378692



1 que posee una mayor estabilidad contra el deterioro en com-
paración con un suero sanguíneo similar no tratado de esta
forma.

5 Se ha encontrado que el tratamiento anterior es ca-
paz de mejorar marcadamente la estabilidad de los enzimas
tratados contra el deterioro, es decir, contra la pérdida
permanente de actividad. Es sabido que los enzimas pueden
10 ser desactivados, incluso permanentemente, por tratamientos
términos más drásticos, incluido la exposición a la energía
microondulatoria. El tratamiento del presente invento, a
través de los efectos de pre-refrigeración y rápida post-
refrigeración, en combinación con los efectos del gas refri-
gerante durante la exposición a la radiación microondulato-
ria y la limitada prolongación de esta última, impide la
15 desactivación del enzima mientras que al mismo tiempo au-
menta la estabilidad del mismo. Este hecho es ilustrado en
los ejemplos dados más adelante y especialmente en el ejem-
plo que trata del suero sanguíneo.

20 La estabilización del presente invento se realiza
rápidamente - en cuestión de segundos - así como sencilla
y económicamente. Las condiciones pueden ser normalizadas
para cualquier enzima o mezcla de enzimas particular para
obtener resultados reproducibles de una vez a otra. Así,
25 cada lote o remesa puede ser analizado mediante técnicas
específicas para dicho enzima.

Hasta donde alcanzan nuestros conocimientos, cual-
quier enzima debe ser susceptible de mejorar de estabilidad
de acuerdo con el presente invento. Los enzimas son proteí-
nas, incluyendo metaloproteínas y proteínas conjugadas, y
30

378692

16



1 son producidos por las células vivas. Aunque existen va-
rias clasificaciones de enzimas, la clasificación acepta-
da es la de Webb, Biochemical Engineering, D. Van Nostrand
Co., Inc., Princeton, N.J., 1964 (véase también Encyclope-
5 dia of Chemical Technology, Kirk-Othmar, Segunda Edición
Vol. 8), que es la siguiente: (1) enzimas hidrolizantes
- proteasas y peptidasas, como pepsina, renina y simila-
res; carbohidrasas, como amilasas; esterases, como lipasas,
fosfatasas y similares; ureasa; desaminasa; etc; (2) enzi-
10 mas de transferencia - deshidrogenasas, como deshidroge-
nasa láctica; oxidasas; transaminasas, como transaminasas
glutámicas; quinasas, como fosfoquinasa creatina; (3) enzi-
mas de adición y substracción - como aconitasa, enolasa,
carboxilasa y aldolasa; (4) isomerasas - como racemasa
15 alanina; (5) sintetetasas- como sintetasa glutamina; y (6)
nucleasas - como desoxiribonucleasa. Como se ha indicado,
el presente invento es especialmente aplicable al trata-
miento de enzimas en el suero sanguíneo que comprenden fos-
20 fatasas, transaminasas, deshidrogenasas y fosfoquinasa.
Uno cualquiera o todos ellos pueden ser aislados del suero
sanguíneo y tratados separadamente, después de reconstitu-
ción si es necesario o bien puede tratarse el suero san-
guíneo como tal. El suero sanguíneo, que es el líquido trans-
25 parente que queda después de separar los elementos celula-
res (glóbulos rojos y blancos y plaquetas) y el mecanismo
coagulante (fibrinógeno) de la sangre completa, es uno de
los materiales especialmente preferidos tratados de acuerdo
con el presente invento.

30 El enzima tratado de acuerdo con el presente inven-

378692



1
5
10
15
20
25
30

to se encontrará en un medio acuoso, es decir, no estará seco. Puede encontrarse en su menstuo natural con o sin concentración o puede ser reconstituído por suspensión o disolución en un medio acuoso preparado después de aislamiento o concentración en su menstuo natural. La cantidad de medio acuoso asociada con el enzima no es crítica, siempre que sea suficiente para mojar el enzima y puede estar dictada por la aplicación final del producto o por consideraciones de manipulación. Por ejemplo, con frecuencia lo más conveniente es trabajar con una suspensión o solución líquida.

Como es sabido, la energía microondulatoria es la energía ondulatoria electromagnética cuya longitud de onda está comprendida en la región de microondas del espectro electromagnético. La Comisión de Comunicaciones Federal de los Estados Unidos de América ha separado actualmente, para el procesado con microondas, unas bandas de energía microondulatoria dentro del intervalo comprendido aproximadamente entre 400 y 20.000 megaciclos por segundo, con una longitud de onda que oscila entre unas 13 pulgadas (330,2 mm) para las frecuencias más bajas y unas 0,7 pulgadas (17,8 mm) para las frecuencias más altas; específicamente, frecuencias de 890-940 aproximadamente con una longitud de onda de unas 13 pulgadas (330,2 mm); frecuencias de 2400-2500 aproximadamente con una longitud de onda de unas 4-5 pulgadas (101,6-127,0 mm); y frecuencias de 17.850-18.000 con una longitud de onda de unas 0,7 pulgadas (17,8 mm). Sin embargo, la energía microondulatoria actualmente preferida para uso de acuerdo con el presente invento

378692

16



1 es un intervalo intermedio con una frecuencia de 1000 a
5000 megaciclos por segundo aproximadamente y más espe-
cialmente de unos 2000 a 3000 megaciclos por segundo. La
energía microondulatoria es generada en una fuente de alta
5 frecuencia adecuada, tal como un magnetrón.

Una característica del presente invento es la pre-
refrigeración del material enzimático. Así, el material en
el momento en que es expuesto por primera vez a la energía
microondulatoria debe encontrarse bastante por debajo de
10 la temperatura ambiente, es decir por debajo de unos 50°F
(10°C). Aunque en realidad puede estar congelado, ya que
fundirá al ser expuesto a la energía microondulatoria, no
hay necesidad de esto y, por razones de facilidad de mani-
pulación, se encuentra preferiblemente a una temperatura
15 superior a la de congelación. Es especialmente satisfacto-
ria una temperatura comprendida entre unos 35° y 45°F (+1,7°
y +7,2°C). El material enzimático puede ser pre-refrigerado
fuera de la cámara o zona de tratamiento o puede ser pre-
refrigerado dentro de la cámara o zona de tratamiento me-
20 diante el paso previo del gas refrigerante antes de la ge-
neración de la energía microondulatoria.

Otra característica del presente invento es mante-
ner el material enzimático que ha de ser tratado en un con-
tenedor sellado durante el tratamiento. Las paredes del con-
25 tenedor pueden ser materiales convencionales de embalaje,
esencialmente impermeables a los gases, como vidrio, poli-
(metacrilato de metilo), poliestireno y polietileno, en
forma de frascos, matraces y ampollas. El contenedor será
esencialmente impermeable a los gases.
30

378692

16 A



1 El contenedor que retiene el material enzimático
durante la exposición se mantendrá en una cámara o zona de
tratamiento mayor en la que la energía microondulatoria
es dirigida de forma que atraviese la pared permeable a las
5 microondas del contenedor y atraviese el enzima.

Todavía otra característica del invento es la cir-
culación de un gas refrigerante a través de la cámara o
zona de tratamiento y alrededor de las paredes del contene-
dor que retiene el material enzimático. El gas refrigerante
10 empleado puede ser cualquiera esencialmente inerte (no reac-
tivo con el ambiente en presencia de la energía microondu-
latoria) que se encuentre en forma gaseosa a las tempera-
turas empleadas, especialmente aire, nitrógeno o dióxido de
15 carbono. Aunque los gases como argon, helio, neon, kriptón,
xenon, óxido de etileno y mezclas de los mismos y similares
son equivalentes, son menos deseables en la actualidad de-
bido a su precio de coste.

La temperatura del gas refrigerante que entra en
la zona de tratamiento debe ser inferior a unos 60°F (15,6°C)
20 y preferiblemente es inferior a unos 55°F (12,8°C). Aunque
la temperatura del mismo puede ser incluso tan baja como
0°F (-32°C) no se encuentra ninguna ventaja en trabajar
por debajo de unos 20°F (-6,7°C) y a estas temperaturas tan
bajas pueden producirse problemas de congelación si el ma-
25 terial enzimático se deja en la zona de tratamiento que con-
tiene el gas frío durante periodos de tiempo prolongados
después de haber cerrado la fuente de energía microondula-
toria. Se ha encontrado especialmente adecuada una tempera-
tura para el gas entrante comprendida entre unos 30° y 50°F
30 (-1,1 y +10°C). El gas refrigerante se calienta ligeramen-

378692

16



1 te durante su paso a través de la zona de tratamiento, es-
pecialmente debido al contacto con las paredes del contena-
dor que retiene el material enzimático y el gas calentado
se saca de la zona de tratamiento dando paso al gas refri-
5 gerante entrante. Cuando el gas es recirculado para ser uti-
lizado de nuevo, la temperatura del mismo debe ser reducida
otra vez a la temperatura deseada para la admisión a la zo-
na de tratamiento.

10 Como la función principal del gas refrigerante es
mantener las paredes del contenedor a una temperatura muy
por debajo de la del material enzimático en tratamiento,
forzando el gas refrigerante en el interior de la cámara
de tratamiento y a lo largo de las paredes del contenedor
bajo una presión por lo menos algo positiva (por lo menos
15 ligeramente superior a la presión atmosférica) se consigue
una refrigeración global más eficiente sin que ninguna zo-
na o zonas de las paredes resulten insuficientemente en-
friadas. Se han utilizado presiones de solamente 0,03 psig
(0,0021 kg/cm² manométricos) y pueden ser convenientes unas
20 presiones de hasta 50 psig (3,5 kg/cm² manométricos). El
aire es especialmente satisfactorio a presiones positivas
bajas, mientras que a presiones más altas se prefiere un
gas esencialmente exento de oxígeno, especialmente nitró-
geno.

25 El tiempo exacto de tratamiento con energía micro-
ondulatoria de acuerdo con el presente invento puede depen-
der hasta cierto punto del enzima particular en tratamiento,
del volumen del material enzimático, de la concentración
del enzima en el material que está siendo tratado y de la
30 potencia del dispositivo generador de microondas. En gene-

378692

16



1 ral, el tiempo requerido es directamente proporcional al
volumen del material que contiene el enzima y a la concen-
tración del enzima en el mismo y es inversamente proporcio-
5 nal a la potencia del dispositivo generador de microondas,
Se ha encontrado que el tiempo de exposición, en cualquier
caso, será como mínimo de 1 segundo aproximadamente. Tam-
bién se ha encontrado que una exposición excesiva produce
una inactivación completa del enzima. Como esto es indesea-
ble de acuerdo con el presente invento, el tiempo total de
10 exposición será menor del necesario para producir esta irac-
tivación completa. Como este tiempo diferirá de un caso a
otro por las razones antes indicadas, puede ser necesario
realizar un ensayo o ensayos preliminares para observar
hasta que punto el enzima particular en tratamiento puede
15 ser sometido a la energía microondulatoria sin inactivarse
completamente. Cada enzima tiene su propio valor de forma
que puede ser fácilmente determinado si una muestra tratada
del mismo se ha inactivado completamente o no. En cualquier
caso, el tiempo es menor del necesario para producir un au-
20 mento de temperatura en el material enzimático hasta la tem-
peratura de inactivación permanente del enzima; generalmen-
te, el tiempo no es superior al necesario para producir un
aumento de temperatura en el material enzimático hasta más
de unos 125-130°F (51,7-54,4°C) y en la mayoría de los ca-
25 sos la temperatura asciende hasta unos 100-120°F (37,8-
48,9°C). El material enzimático puede ser sometido, de
acuerdo con el presente invento, a una sola exposición o
a una multiplicidad de exposiciones a la energía microondu-
latoria.

30 Una característica del procedimiento preferido del

378692



1 presente invento es la presentación de todas las paredes
principales del contenedor que retiene el material enzimá-
tico directamente a la energía microondulatoria durante la
exposición indicada. En la mayoría de los casos esto se
5 consigue utilizando como contenedor un frasco puesto de pie,
haciendo girar el frasco alrededor de su eje longitudinal
(vertical) por lo menos una vez (360°) y preferiblemente
muchas veces, durante la exposición del frasco a la ener-
gía microondulatoria dirigida hacia el mismo en una direc-
10 ción generalmente horizontal, es decir, en una dirección
generalmente perpendicular a las paredes principales del
contenedor. De esta forma, todas las paredes principales
del contenedor, ya sea de sección transversal circular,
cuadrada, rectangular o poligonal, son presentadas direc-
15 tamente a la radiación microondulatoria.

Después de la exposición a la energía microondula-
toria durante el periodo de tiempo requerido, se interrump-
pe la exposición a la energía microondulatoria y el mate-
rial enzimático es enfriado rápidamente. En este aspecto,
20 se prefiere continuar el efecto de enfriamiento del gas
refrigerante después de haber interrumpido la exposición
a la energía microondulatoria con objeto de enfriar o re-
frigerar el material enzimático tratado, preferiblemente
por lo menos hasta una temperatura de unos 85°F (29,4°C).
25 Esto puede realizarse dejando el contenedor de material en-
zimático en la zona de tratamiento a través de la cual cir-
cula el gas refrigerante después de haber apagado la fuente
de energía microondulatoria o bien, en el caso de una línea
en movimiento continuo de contenedores de material enzimá-
tico, prolongando el movimiento más allá del campo de expo-
30

378692

16 A



1

sición directa a las microondas mientras se prosigue el paso de gas refrigerante en contacto con los contenedores. Por otra parte, el material enzimático puede ser enfriado por otros medios, complementarios o sustitutivos de los medios citados, por ejemplo poniendo en contacto las paredes del contenedor con un líquido frío, como agua fría o colocando el contenedor en un refrigerador. En cualquier caso, es preferible enfriar el material enzimático tratado por debajo de 50°F (10°C).

5

10

El presente invento será comprendido más fácilmente teniendo en cuenta los siguientes ejemplos específicos que se dan con fines ilustrativos solamente y no han de ser considerados como limitativos del alcance del invento en modo alguno.

15

EJEMPLO 1

20

Se disuelve deshidrogenasa láctica ("DHL") en una base no sérica acuosa, regulada con fosfato (pH alrededor de 7,2) para proporcionar 627 unidades/ml y la solución se filtra a través de un filtro bacteriano. Se llenan con la solución unos pequeños frascos de vidrio estériles (7 ml de capacidad nominal), se tapan y los frascos se enfrían a 40°F (4,4°C). Después se colocan 48 frascos en una cámara a presión, equipada con un magnetrón de 2 kw conectado a una fuente de 200 voltios de corriente alterna y capaz de suministrar energía microondulatoria a la cámara a unos 2450 megaciclos por segundo. Los frascos se dividen en grupos de 3 y cada uno de los grupos se mantiene en una pequeña mesa giratoria individual. Todas las pequeñas mesas giratorias individuales se fijan a una mesa giratoria mayor, de forma que mientras la mesa giratoria grande está girando

25

30

378692

16



1 a 24 rpm, las pequeñas mesas giratorias individuales están
girando a 60 rpm; es decir, las pequeñas mesas giratorias
individuales giran 2,5 veces por cada revolución de la me-
sa giratoria grande. El sistema de mesas giratorias está
5 construido en poli(metacrilato de metilo). Se hace pasar
nitrógeno gaseoso frío a través de la cámara, a una presión
manométrica de 2,5 psi (0,175 kg/cm²), siendo su temperatu-
ra de entrada de unos 35°F (+1,7°C). A continuación se hace
funcionar el magnetrón durante 62 segundos, encontrándose
10 situados el magnetrón y el guía-ondas asociado de forma que
dirigen la energía microondulatoria en dirección horizontal
hacia las paredes laterales de los frascos. La temperatura
máxima alcanzada por la soluciones de unos 120°F (48,9°C).
Después de apagar el magnetrón (transcurridos los 62 segun-
15 dos de exposición), se prosigue la circulación de nitrógeno
gaseoso frío durante un corto tiempo hasta que la solución
ha regresado a unos 80°F (26,7°C). Se detiene la rotación
del sistema de mesas giratorias, se abre la cámara y los
frascos se sacan de la cámara y se enfrían inmediatamente
20 a 40°F (4,4°C) en un baño de agua de hielo. Las muestras
tratadas, junto con los controles no tratados, se mantienen
a diversas temperaturas y se analizan de vez en cuando con
los siguientes resultados:

material tratado:

- 25 40°F (4,4°C) - después de 13 días, 583 unidades/ml; después
de 20 días, 375 unidades/ml.
70°F (21,1°C) - después de 13 días, 497 unidades/ml; des-
pués de 20 días, 375 unidades/ml.
100°F (37,8°C) - después de 13 días, 520 unidades/ml; des-
30 pués de 20 días, 400 unidades/ml.



378692

control:

40°F (4,4°C) - después de 1 semana, 315 unidades/ml; después de 13 días, 0.

70°F (21,1°C) - después de 1 semana, 0.

100°F (37,8°C) - después de 48 horas, 0.

EJEMPLO 2

Una transaminasa glutámica oxalacética de suero ("TGOS") se disuelve en una base acuosa no sérica, regulada con fosfato (pH alrededor de 7,2) para proporcionar 37 unidades/ml y se filtra a través de un filtro bacteriano. La solución se envasa, se trata, se mantiene y se analiza como en el Ejemplo 1, con los siguientes resultados:

material tratado:

40°F (4,4°C) - después de 13 días, 26,7 unidades/ml; después de 20 días, 20 unidades/ml.

70°F (21,1°C) - después de 13 días, 13 unidades/ml; después de 20 días, 10 unidades/ml.

100°F (37,8°C) - después de 13 días, 16 unidades/ml; después de 20 días, 3 unidades/ml.

control:

40°F (4,4°C) - después de 1 semana, 0.

70°F (21,1°C) - después de 4 días, 0.

100°F (37,8°C) - después de 48 horas, 0.

EJEMPLO 3

Se reconstituyen 5 mg de desoxiribonucleasa, procedente de páncreas bovino, con 1 ml de agua destilada y después se diluye hasta 800 ml con agua destilada. La solución se filtra a través de un filtro bacteriano. La potencia inicial después de la filtración es de 786 unidades/mg.

16 ABR



378692

1 Se llenan con la solución unos pequeños frascos de vidrio
 estériles (7 ml de capacidad nominal), se tapan y se en-
 frian a 40°F (4,4°C). Después se tratan varias muestras
 (24 frascos por lote) como en el Ejemplo 1 pero durante
 5 tiempos de exposición diferentes, de la siguiente forma:

<u>Muestra</u>	<u>Tiempo de exposición (segundos)</u>	<u>Temperatura máxima de la muestra</u>
A	60	alrededor de 112°F (44,4°C)
B	68	alrededor de 115°F (46,1°C)
C	74	alrededor de 122°F (50,0°C).

10

15

20

Después de sacar de la cámara a unos 80°F (26,7°C)
 y enfriar a 40°F (4,4°C) en un baño de agua de hielo, las
 muestras tratadas junto con los controles no tratados se
 mantienen a 77°F (25,0°C) durante 21 días. Todas las mues-
 tras son después analizadas para determinar la densidad
 óptica en un espectrofotómetro Beckman DU con una longi-
 tud de onda en la región del ultravioleta, utilizando el
 método de análisis de Kunitz, M., J. Gen. Physiol., 33,
 349 (1950).

Los resultados fueron los siguientes:

<u>Muestra</u>	<u>Resultados* (unidades/mg)</u>
A	475
B	520
C	450
control	200

25

* Valores medios de dos frascos para cada tratamiento, tres
 muestras distintas de cada frasco.

EJEMPLO 4

30

Se disuelve un isoenzima deshidrogenasa láctica de

378692



1970

1 una fracción de hígado, extraído de un corazón bovino, en
2 agua destilada estéril hasta 1 unidad/ml y la solución se
3 filtra a través de un filtro bacteriano. Se llenan con la
4 solución unos pequeños frascos de vidrio estériles (7 ml
5 de capacidad nominal), se tapan y se enfrían a 40°F
6 (4,4°C). Después se exponen 48 frascos a la energía micro-
7 ondulatoria en presencia de una corriente de nitrógeno ga-
8 seoso frío como en el Ejemplo 1, pero durante un tiempo
9 de exposición de 56 segundos. Después de sacar de la cáma-
10 ra a una temperatura de unos 80°F (26,7°C) y enfriar a
11 40°F (4,4°C), las muestras tratadas junto con los contro-
12 les no tratados se mantienen a la temperatura ambiente.
13 Los controles se vuelven completamente inactivos después
14 de permanecer en reposo durante la noche, mientras que el
15 material tratado es tan activo como el original después de
16 transcurridas tres semanas. Al cabo de tres meses, se ha
17 producido una pérdida de actividad inferior al 10 % en el
18 material tratado.

EJEMPLO 5

19 Se disuelve un isoenzima deshidrogenasa láctica de
20 fracción de corazón, extraído del músculo del conejo, en
21 agua destilada estéril hasta 1 unidad/ml y la solución se
22 filtra a través de un filtro bacteriano. Después de embote-
23 llar y tapar, el material se trata y a continuación se al-
24 macena como en el Ejemplo 4. Los controles se vuelven com-
25 pletamente inactivos al cabo de una noche, mientras que el
26 material tratado es tan activo como el original después de
27 transcurrir tres semanas. Al cabo de tres meses, se ha pro-
28 ducido una pérdida de actividad inferior al 10 % en los
29 materiales tratados.
30

378692



1970

EJEMPLO 6

1 Se prepara una solución acuosa de amilasa (1000
unidades/ml) y se filtra a través de un filtro bacteriano,
5 introduciendo unas porciones de 10 ml de la misma en seis
pequeños frascos de vidrio estériles (10 ml de capacidad
nominal) que a continuación se tapan. Los seis frascos
se enfrían después a 40°C (4,4°C) y tres de ellos se in-
trodueen en una cámara de presión equipada con un magne-
trón de 2 kw conectado a una fuente de 220 voltios de co-
rriente alterna y capaz de proporcionar energía microcondu-
10 latoria a la cámara a unos 2450 megaciclos por segundo.
Cada uno de los frascos se mantiene en una pequeña mesa
giratoria individual, todas ellas fijadas a una mesa gi-
ratoria mayor, de forma que cuando gira la mesa giratoria
15 grande, las pequeñas mesas giratorias individuales y los
frascos que se encuentran sobre las mismas también están
girando. El sistema de mesas giratorias está construido en
poli(metacrilato de metilo). La mesa giratoria grande y
las pequeñas mesas giratorias individuales se mueven a
20 30 rpm. Después se hace pasar nitrógeno gaseoso frío a
través de la cámara, a una presión manométrica en el in-
terior de la cámara de 2,5 psi (0,175 kg/cm²), siendo su
temperatura de entrada de unos 35°F (+1,7°C). A continua-
ción se hace funcionar el magnetron durante 7 segundos,
25 encontrándose situados el magnetron y el guía-ondas aso-
ciado para dirigir la energía microondulatoria en direc-
ción horizontal hacia las paredes laterales de los fras-
cos. Después de apagar el magnetron (transcurridos los 7
segundos de exposición), se prosigue la circulación de ni-
trógeno frío durante un corto tiempo hasta que la solución
30

378692

16 AB



1

de amilasa en los frascos expuestos ha vuelto a unos 80°F (26,7°C). El sistema de mesas giratorias se detiene y los frascos se sacan de la cámara, se enfrían inmediatamente a 40°F (4,4°C) en un baño de agua de hielo y, junto con los tres frascos de control no tratados, se mantienen a 40°F (4,4°C) durante 48 horas. En todas las muestras se determina después la actividad de amilasa con los siguientes resultados (las cifras son los valores medios):

5

material tratado	800 unidades/ml
control	200 unidades/ml.

10

EJEMPLO 7

15

Un suero de sangre humana fresca se filtra a través de un filtro bacteriano y se introduce en unos frascos de vidrio estériles, a razón de 30 ml por frasco y estos últimos se tapan y enfrían a 40°F (4,4°C). A continuación se exponen tres de los frascos a la energía micro-ondulatoria, en presencia de una corriente de nitrógeno gaseoso bajo presión, como en el Ejemplo 6 pero durante 15 segundos. Después de sacarlas de la cámara a unos 72-75°F (22,2-23,9°C), los frascos son enfriados inmediatamente a 40°F (4,4°C) en un baño de agua de hielo. A continuación los frascos junto con los controles no tratados se mantienen a 40°F (4,4°C) y se analizan de vez en cuando. Transcurridas dos semanas, los valores del ensayo bioquímico de los controles han cambiado de forma que ya no se encuentran dentro de los límites normales para los enzimas. Después de un mantenimiento prolongado a 40°F (4,4°C), el material tratado es analizado de vez en cuando a lo largo de un periodo de 9 meses, con los siguientes resultados:

20

25

30

378692

16



TABLA I

Valores después de los días indicados

Constitu- yente	días:	Valores después de los días indicados				
		30	90	150	210	270
5 Sodio	límite superior	145	143	142	142,5	142
	medio	141,8	140,8	140,9	141	141,5
	límite inferior	140	139	139,5	139,7	139
Potasio	límite superior	4,3	4,4	4,3	4,4	4,4
	medio	4,0	4,0	4,0	4,3	4,3
	límite inferior	3,9	3,8	3,92	3,94	3,8
Glucosa	límite superior	101	100,4	102	100	100
	medio	98,8	99,0	98,8	97,5	97,5
	límite inferior	90,5	93,6	93,5	93,2	91,4
10 Fosfata sa alca lina	límite superior	34,1	34,5	35,0	34,0	34,1
	medio	32,9	33,2	33,4	33,0	33,0
	límite inferior	30,0	30,2	31,0	30,9	30,5
TGOS*	límite superior	27,0	25,7	25,0	24,0	23,5
	medio	25,1	24,5	24,0	23,8	22,8
	límite inferior	22,5	21,8	21,0	20,0	20,0
15 TGPS*	límite superior	21,0	20,7	20,0	20,0	19,0
	medio	20,2	19,0	19,2	19,0	18,7
	límite inferior	19,5	18,4	18,3	18,0	17,8
DHL* (total)	límite superior	210	204	204	201	198
	medio	200	196	196	196	190
	límite inferior	190	192,2	192	190	188
20 DHL de frac ción manien- to de iso enzimas de una frac- ción de hi- gado (DHL ₁)	límite superior	23,4	22,6	22,8	22,1	22,5
	medio	22,5	21,5	21,3	21,4	21,2
	límite inferior	21,2	20,4	20,0	19,4	19,0
fracción de cora- ción (DHL ₅)	límite superior	46,5	45,8	44,0	43,6	43,1
	medio	44,6	44,0	43,2	42,9	42,6
	límite inferior	40,8	41,8	41,0	40,2	40,3
Fracciones restantes (DHL _{2,3,4})	límite superior	134	134	134	132	132
	medio	132,5	132,4	132	131,4	130,2
	límite inferior	130,6	130,2	129,5	129,2	128
25 Amilasa	límite superior	68	67	65	66,5	65
	medio	65	64	63,6	63,7	62,6
	límite inferior	62,5	61,8	61,3	61,6	61,4
Creatina fosfoqui nasa (C.P.K.)	límite superior	6,1	5,8	5,7	**	**
	medio	5,3	5,4	5,0		
	límite inferior	4,8	4,5	4,2		
30 Protei- na total	límite superior	7,5	7,5	7,5	7,5	7,4
	medio	7,2	7,4	7,3	7,3	7,3
	límite inferior	6,9	7,0	7,1	7,0	7,0

378692

16



TABLA I (continuación)

Constitu- yente	días:	Valores después de los días indicados				
		30	90	150	210	270
Albúmina	límite superior	4,00	4,25	4,12	4,19	4,11
	medio	3,82	3,87	3,90	3,87	3,92
	límite inferior	3,42	3,44	3,56	3,51	3,70
Globu- lina	límite superior	3,00	3,02	3,00	2,94	2,98
	medio	2,80	2,90	2,88	2,91	2,90
	límite inferior	2,55	2,66	2,61	2,60	2,70

* TGOS es transaminasa glutámica oxalacética de suero.

TGPS es transaminasa glutámica pirúvica del suero.

DHL es deshidrogenasa láctica.

** No se realizaron más determinaciones.

El material tratado presenta una electroforesis normal a lo largo del periodo de ensayo.

Los valores normales para estos constituyentes son los siguientes:

TABLA II

Constituyente	Valores normales
Sodio	135-145 meq/litro
Potasio	3,5-5,0 meq/litro
Glucosa	65-110 mg %
Fosfatasa alcalina	5-35 unidades internacionales
TGOS	5-40 unidades internacionales
TGPS	5-35 unidades internacionales
DHL (total)	150-500 unidades internacionales
Fracción de hígado DHL	10-20 % del total
Fracción de corazón DHL	20-40 % del total

378692

16



TABLA II (continuación)

<u>Constituyente</u>	<u>Valores normales</u>
Fracciones restantes DHL	35-55 % del total
Amilasa	50-160 unidades (Diatasa)
5 Creatina fosfoquinasa	hasta 35 unidades internacionales
Proteína total	6,8 - 8,0 mg %
Albúmina	3,25 - 5,70 g %
Globulina	1,5 - 3,0 g %

10

Es posible introducir considerables modificaciones en los materiales enzimáticos tratados y en las técnicas particulares empleadas sin apartarse de los límites del invento.

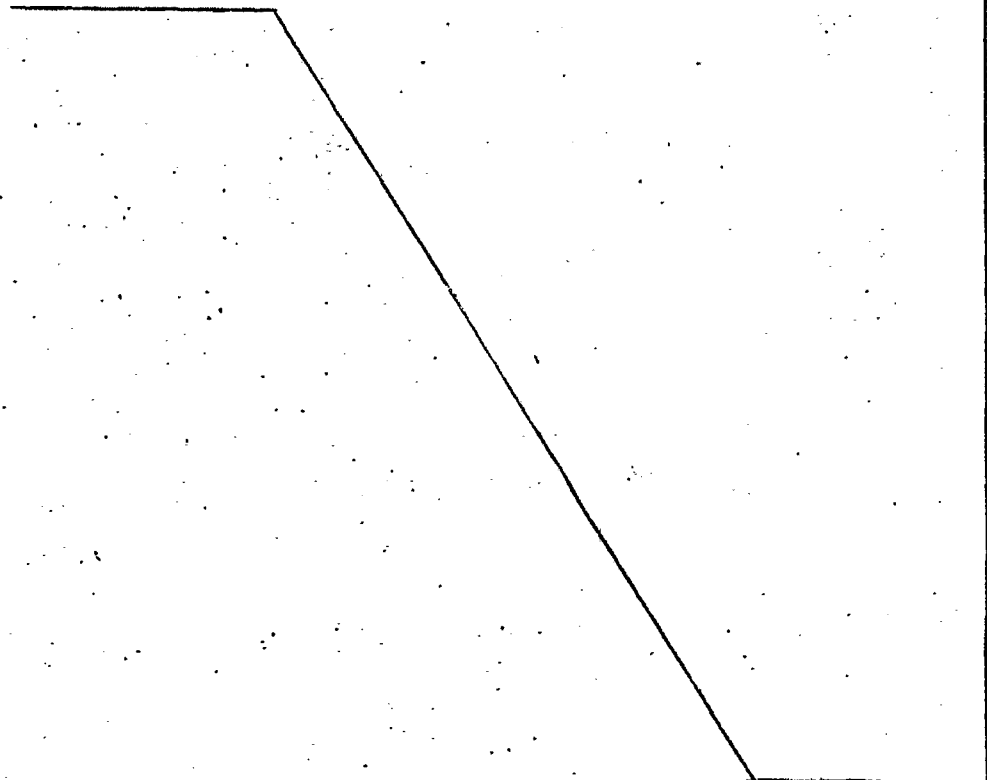
15

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

20

25

30



378692

16 APR



REIVINDICACIONES

1

5

10

15

1. Un método para aumentar la estabilidad de un enzima caracterizado por enfriar el enzima en un medio acuoso a una temperatura inferior a 50°F (10°C) y después, en rápida sucesión, (a) someter el enzima en una zona de tratamiento, mientras se mantiene en un contenedor cerrado, permeable a las microondas, dentro de dicha zona de tratamiento, a una energía microondulatoria a través de una atmósfera móvil de gas refrigerante, durante un periodo de tiempo inferior al necesario para la inactivación del enzima, encontrándose dicha atmósfera móvil en contacto directo con las paredes permeables a las microondas de dicho contenedor pero fuera del contacto directo con dicho enzima y estando a una temperatura inferior a unos 60°F (15,6°C) cuando es admitido a dicha zona de tratamiento; (b) interrumpir la exposición de dicho enzima a dicha energía microondulatoria al final del periodo citado y (c) enfriar dicho enzima.

20

2. Un método según la Reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicha energía microondulatoria tiene una frecuencia comprendida entre 1000 y 5000 megaciclos por segundo aproximadamente.

25

3. Un método según la Reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que dicha energía microondulatoria tiene una frecuencia de 2000 a 3000 megaciclos por segundo aproximadamente.

30

4. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que dicha energía microondulatoria tiene una frecuencia de 2400 a 2500 megaciclos por segundo

378692



1

aproximadamente.

5

5. Un método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que después de la exposición a la energía microondulatoria, el enzima tratado en el contenedor continúa estando sometido a la acción de dicho gas refrigerante.

10

6. Un método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por el hecho de que dicho enzima en el medio acuoso es por lo menos uno de los enzimas del suero sanguíneo.

15

7. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, caracterizado por el hecho de que el enzima en el medio acuoso es suero sanguíneo.

20

8. Un método según la Reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que el suero sanguíneo es enfriado a una temperatura comprendida entre 35° y 45°F aproximadamente (1,7° y 7,2°C) antes de la exposición a dicha energía microondulatoria.

25

9. Un método según las Reivindicaciones 7 ú 8, caracterizado por el hecho de que el suero sanguíneo no pasa de una temperatura de unos 125°F (51,7°C) durante dicha exposición a la citada energía microondulatoria.

30

10. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por el hecho de que después de interrumpir la exposición de dicho suero sanguíneo a dicha energía microondulatoria, el citado suero sanguíneo es enfriado a una temperatura inferior a unos 50°F (10°C).

11. Un método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones caracterizado por el hecho de que

378692

116



1 prácticamente todas las paredes principales permeables a las microondas del contenedor citado son presentadas directamente a la citada energía microondulatoria durante la exposición mencionada.

5 12. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE UN ENZIMA".

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

Madrid, 16 Abril 1970

BERNARDO UNGRIA

P. D.

15

20

25

30