

432961



P.- 59.226

HOE 73/B 023

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. G01N

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN SUBSTRATO PARA LA DETERMINACION DE PROTEINASA"

(Clase Internacional G01n)



La invención se refiere a un substrato sólido para la determinación de proteinasa, que es apropiado en especial para la utilización en soluciones coloreadas, por ejemplo en medios que contienen hemoglobina o clorofila.

Para la determinación de proteinasa se describen en la bibliografía un gran número de procedimientos, que esencialmente pueden ser clasificados en dos grupos, a saber, de una parte aquéllos en los que son desdoblados cuerpos proteínicos de alto peso molecular, y de otra parte aquéllos que se basan en una hidrólisis de sustancias de bajo peso molecular, tales como ésteres y amidas. En el segundo grupo, los productos de desdoblamiento poseen frecuentemente una absorción de luz modificada respecto a la del substrato intacto. La modificación de la absorción de la luz en el máximo de absorción de los productos de desdoblamiento se emplea en este caso la mayoría de las veces como una medida de la actividad enzimática. De ordinario se admite que el efecto de la proteinasa sobre substratos de alto peso molecular transcurre en el mismo sentido que con un material de bajo peso molecular. Sin embargo, esta suposición no se da en sistemas complejos, que junto a las enzimas contienen también inhibidores, por ejemplo en la sangre.



5 Con substratos de alto peso molecular, tales como hemoglobina, gelatina o caseína, el efecto proteolítico de una solución se puede determinar correctamente. No obstante, éstos tienen el inconveniente de que, después del tiempo de incubación con la enzima, deben ser separados por precipitación de los productos de degradación y a continuación frecuentemente tienen que ser identificados además por medio de reacciones químicas sensibles. En estas mediciones de actividad resultan de ello amplios márgenes de error. Además, de ello, en ambos grupos de métodos de determinación aparecen defectos considerables cuando los procedimientos de medición requieren una lectura óptica, y la solución que contiene proteinasa manifiesta una absorción propia, que interfiere con el intervalo de medición.

15 Se ha intentado ya teñir substratos de alto peso molecular mediante colorantes reactivos y determinar fotométricamente el efecto hidrolítico de la proteinasa por medición de la cantidad de colorante desdoblada [Bibliografía: H. Rinderknecht y otros, Clin. Chim. Acta 21, 197-203 (1968)]. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que su sensibilidad es influenciada esencialmente, en el caso de utilización de polvo cutáneo coloreado, por el tamaño de partículas de éste.

13 FEB 1975

Se ha encontrado ahora un substrato sólido muy sensible para la determinación de proteinasa, que está caracterizado porque una proteína substrato es unida covalentemente en fina distribución en o sobre la superficie de un vehículo sólido y es teñida con colorantes reactivos. Por medio de la distribución fina, los substratos de alto peso molecular son muy bien accesibles para las proteinasas que han de ser determinadas, y el desdoblamiento del substrato conduce a una liberación del colorante copulado con él, que es dependiente de la actividad enzimática.

Como proteínas substrato en el sentido de la invención son adecuadas todas las proteínas desdoblables por proteinasas - en especial hemoglobina, caseína, fibrinógeno o colágeno, así como sus productos de transformación o de degradación, tales como fibrina térmica, α -caseína, gelatina, así como productos de hidrólisis de estos compuestos, reticulados de nuevo, por ejemplo polipéptidos reticulados de nuevo procedentes de gelatina degradada, que se preparan según la patente alemana 1 118 792 y están en el comercio como Haemaccel[®] (marca Comercial de la firma Behringwerke AG).

Como vehículos para estos substratos son adecuados, sobre todo, copolímeros de un monómero activo,

es decir, de uno que contiene grupos activos, tales como la agrupación anhídrido de ácido carboxílico o la agrupación isotiocianato, y de un monómero inactivo, sin tales grupos, por ejemplo un compuesto de ete

5 no. Como monómeros activos son adecuados en especial anhídrido de ácido maleico, o anhídrido de ácido crotonico o alilisotiocianato, y como monómeros inactivos, por ejemplo, propileno, acrilamida o butadieno.

Los copolímeros pueden constar de monómero

10 activo y de monómero inactivo en cualquier proporción cuantitativo. En consecuencia, en el polímero pueden estar contenidas unidades monómeras del monómero activo en concentraciones desde 0,01 hasta 99,99 % en moles. El copolímero de anhídrido de ácido maleico y

15 acrilamida contendrá ventajosamente menos de aproximadamente 6 % en moles de anhídrido de ácido maleico, el copolímero de anhídrido de ácido maleico y butadieno contendrá menos de aproximadamente 90 % en moles de anhídrido de ácido maleico, mientras que el copolímero

20 de anhídrido de ácido maleico y propileno constará ventajosamente de aproximadamente 50 % de anhídrido de ácido maleico y 50 % de propileno. Si tiene que existir una proporción especialmente elevada de grupos activos, se puede emplear también el homopolímero del monómero activo, por ejemplo del anhídrido de ácido malei-

25



co, como material de vehículo de la proteína substrato.

5 El vehículo debe ser hecho reaccionar luego con la proteína substrato, de modo que los grupos activos de ambos componentes formen entre sí enlaces covalentes. El tipo de la reacción y del enlace covalente formado de este modo dependen, naturalmente, del carácter de los grupos activos que entran en reacción. Por ejemplo, por medio de correspondientes reacciones de adición o de condensación, pueden ser unidos enlaces de péptido, urea, tiourea, éster, acetal o éter.

10 Si en el material de vehículo tienen que quedar grupos activos en exceso, que no hayan entrado en reacción con las proteínas substrato, éstos pueden ser separados, si así se desea, por reactivos adecuados de bajo peso molecular, por ejemplo, los grupos de anhídrido de ácido por medio de una amina, tal como hexametilendiamina.

20 Otras posibilidades según la invención para la unión en o sobre un vehículo inerte (por ejemplo, poliacrilamida, poliamida) consisten en la introducción de grupos capaces de reaccionar, tales como isotiocianato, dobles enlaces capaces de reaccionar, grupos diazonio, grupos azo o halógenos capaces de reaccionar, en la proteína substrato, que después de ello se hacen

25



reaccionar con el vehículo según los métodos químicos habituales. Si, por su parte, el vehículo está provisto de grupos capaces de reaccionar, el substrato se puede unir con él de modo conveniente tal como se ha
5 mostrado anteriormente.

La elección del colorante reactivo se ajusta según el campo preferente de utilización del substrato. Para la medición de la proteinasa en la sangre o en medios que contienen hemoglobina - en especial en
10 extractos de órganos - se emplean de preferencia colorantes cuyo máximo de absorción está en el intervalo de longitudes de onda > 600 nm, puesto que en tal caso disminuye fuertemente una influencia por la absorción propia de la hemoglobina. Especialmente adecuado es en
15 este caso el Remazol[®], obtenible en el comercio (Remazol[®] = marca comercial registrada de la firma Farbwerke Hoechst AG) y el azul turquesa B (C.I. (= Colour Index) Reactive blue 77). Otros colorantes que son adecuados para la tinción del substrato son Procion^{® x)}, azul
20 turquesa H 7 G (C.I. Reactive blue 3), Remazol[®] negro RL (C.I. Reactive black 31), Cibacron^{® xx)} azul turquesa G-E (C.I. Reactive blue 7), Cibacron[®] azul turquesa FGF-P (C.I. 74460, Reactive blue 15), por entresacar algunos ejemplos.

25 X) Procion[®] = marca comercial registrada de la firma ICI



XX) Cibacron [®] = marca comercial registrada de la firma
Ciba AG

5 En el caso de extractos de plantas que contienen clorofila se pueden elegir colorantes, que tienen por lo menos un máximo de absorción que no interfiere con el verde de las plantas, por ejemplo Remazol [®] rojo brillante FB (C.I. Reactive red 104), Remazol [®] rojo brillante BB (C.I. Reactive red 21).

10 Para la tinción del sustrato unido covalentemente sobre o en el vehículo, se eligen condiciones de pH y de temperatura como las que son recomendadas por el fabricante del colorante. Después de la reacción del colorante con el sustrato, se elimina por lavado el colorante en exceso con control de la extinción en el
15 correspondiente máximo de absorción. Un sustrato sólido para la determinación de proteinasa, preparado según este procedimiento, es más sensible, por un factor de 5 a 100, que los sustratos de alto peso molecular teñidos, según la situación actual de la técnica.

20 La invención se refiere también a la utilización del sustrato y de medios que contienen el sustrato, para la medición de actividades de proteinasa. Después de incubación de las soluciones que contienen proteinasa con el sustrato teñido, unido al vehículo,
25 que puede ser llevada a cabo a 0°C - 80°C, según la sen



sibilidad frente a la temperatura de la proteinasa que se ha de determinar - de preferencia se emplean temperaturas de 20-40°C - se separa el vehículo, fácilmente centrifugable y filtrable, y se mide el colorante liberado en el máximo de absorción de éste. La extinción obtenida de este modo es, en un amplio intervalo, linealmente dependiente de la actividad de proteinasa a medir. Extinciones por fuera del intervalo lineal pueden ser evitadas por dilución de la solución de enzima. Por medio de la unión covalente de la proteína substrato con el vehículo, y del colorante con la proteína substrato, el substrato es estable en un amplio intervalo de pH (pH 2 - pH 12) durante el tiempo necesario para el ensayo. Mientras que los substratos depositados sobre el vehículo por absorción son fácilmente desprendidos por variación del medio salino o por una presencia de proteínas, por ejemplo de albúmina, el substrato según la invención permite el empleo de diversos sistemas tampón, según el que se considere óptimo para la medición de la proteinasa en cuestión.

Los substratos según la invención son adecuados para determinar proteinasas con una sensibilidad hasta ahora no observada en el caso de uno de los substratos conocidos, tales como por ejemplo, tripsina, quimotripsina, colagenasa, bromelafina, ficina o pronasa. La pre-

13 

paración, según la invención, del substrato, y la utilización de éste para la determinación de proteinasas, en especial en la sangre y en extractos de tejidos y de plantas, se describe en los siguientes ejemplos.

5

Ejemplo 1

400 mg de un polímero en forma de polvo a base de anhídrido de ácido maleico y propileno, en la proporción molar 1:1, se empastan con 10 ml de tampón de fosfato 0,2 M de pH 7,5 y, en un baño de enfriamiento de una mezcla de agua y hielo, se completan a 20 ml con el mismo tampón de fosfato. Se añade una solución de 120 mg de fibrinógeno humano en 12 ml de solución de NaCl 0,15 M. Después se añaden a esto 8 ml de hexametildiamina para el bloqueo y fijación de los grupos anhídrido en exceso. La carga se agita durante la noche, se separa por decantación y el gel se lava tres veces cada vez con 40 ml de solución de sal común al 0,9 por ciento. Después de esta separación por lavado del fibrinógeno no fijado, el gel se suspende en 75 ml de un tampón de fosfato trisódico, que contiene 720 mg de Na PO₄ . 12 H₂O, y con adición de 360 mg de Remazol[®] azul turquesa B (C.I. Reactive blue 77) se agita durante 3 horas a 40°C, en un baño de agua. A continuación se precipita el gel por centrifugación, se agita con 400 ml

4-1-75



de una solución de sal común al 0,9 por ciento a 80°C,
y después se centrifuga de nuevo. Esta operación de
lavado para la eliminación del colorante en exceso,
no unido covalentemente, se repite en total 10 veces,
5 llevándose a cabo los dos primeros lavados con una so-
lución de sal común que contiene, por 100 ml, 0,2 ml
de una lejía de sosa 2 N. Los 5 lavados siguientes se
realizan con solución de sal común sin ninguna adición.
El 8º lavado se lleva a cabo con solución de sal común
10 que contiene, por 100 ml, 0,5 g de albúmina de ganado
vacuno. La solución de lavado para los dos últimos la-
vados no contiene ningún aditivo. Después de ello se
centrifuga de nuevo y se determina el rendimiento. Se
obtiene 1,2 g de substrato, pesado en estado húmedo.
15 Para la producción de una preparación de substrato pa-
ra la determinación de plasmina, el precipitado se sus-
pende en 3,6 ml de un tampón de citrato de sodio 0,1 M,
de pH 7,4. El substrato de proteinasa obtenido de este
modo puede ser empleado directamente para la determi-
20 nación de la actividad.

Se obtienen valores igualmente buenos si el
substrato se liofiliza para el almacenamiento, e in-
mediatamente antes de la utilización se suspende de
nuevo en la cantidad correspondiente de agua.

25



Ejemplo 2

150 mg de fibrinógeno de ganado vacuno en 20 ml de NaCl
0,15 M se mezclan con 5 ml de tampón de fosfato 0,1 M,
de pH 7,6, y a continuación, en porciones, con 15 mg de
5 anhídrido de ácido maleico, y se dejan reaccionar duran-
te media hora a temperatura ambiente. El maleoilfibrinó-
geno así resultante se copolimeriza con acrilamina en
una carga de polimerización según L.Ornstein (Annal. N.Y.
Acad. Sci. 121, 321, 1964). Para la carga de polimeriza-
10 ción se emplean las soluciones A y C, propuestas por Orns-
tein, así como una solución de peroxidisulfato de amonio,
de la composición siguiente:

Solución A : 48 ml de HCl 1 N
15 36,3 g de trishidroximetilaminometano
0,46 ml de TEMED = tetraetilmetil-etilen-
diamina
hasta 100 ml de agua destilada

20 Solución C :
(según Ornstein, modificada)
30 g de acrilamida
1,5 g de metilenbisacrilamida
hasta 100 ml de agua destilada

25 Peroxidisulfato de amonio:
Solución al 1 por ciento de agua destilada

13 ENE 1975

La copolimerización de 25 ml de la solución de maleoilfibrinógeno antes obtenida se inicia por medio de adición de 5 ml de la solución A, 6,25 ml de la solución C y 1,25 ml de la solución de peroxidisulfato de amonio, y se completa dejando reposar durante una hora a temperatura ambiente. Después se cubre el gel con 80 ml de solución de sal común al 0,9 por ciento y se desmenuza con un homogeneizador de laboratorio (Ultra Turrax). El producto se centrifuga y se agita con la misma cantidad de solución de sal común al 0,9 por ciento, después se separa de nuevo por centrifugación y el residuo se suspende en 24 ml de un tampón de fosfato trisódico, que contiene 0,9 g de fosfato trisódico. A ello se añaden 0,45 g de Remazol ^(R) azul turquesa B (C.I. Reactive blue 77). La mezcla se agita durante 3 horas a 40°C. Después, el colorante en exceso se elimina por lavado, como se ha descrito detalladamente en el ejemplo 1, empleándose para una operación de lavado, cada vez 240 ml de una solución al 0,9 por ciento de sal común, y eventualmente las adiciones mencionadas en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

3 g de hemoglobina de caballo se disuelven en 300 ml de tampón de fosfato 0,1 M, de pH 7,4, y se mezclan con 900 mg de anhídrido de ácido maleico pulverizado. A continua



13 ENE. 1975

5 ción se agita durante media hora más. La maleoilhemoglobina así formada se copolimeriza con acrilamida, de modo correspondiente al del ejemplo 2, para formar un gel de acrilamida al 5 por ciento. Para la polimerización se emplean las soluciones según Ornstein, mencionadas en el ejemplo 2, en las siguientes proporciones cuantitativas:

10 A 300 ml de la solución de maleoilhemoglobina se añaden 60 ml de la solución A según Ornstein, 75 ml de la solución C y 15 ml de la solución de peroxidisulfato de amonio al 1 por ciento.

15 Después de 1 hora a temperatura ambiente, el gel se cubre con 900 ml de una solución de sal común al 0,9 por ciento y se desmenuza con un homogeneizador de laboratorio (Ultra Turrax). El copolímero se centrifuga y se agita brevemente con el mismo volumen de una solución de sal común al 0,9 por ciento, después se centrifuga y el residuo se suspende en 450 ml de un tampón de fosfato trisódico, que contiene 10,8 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, y se agita durante 18 horas a 25°C con 5,4 g de Remazol ^(R) azul turquesa B (C.I. Reactive blue 77). El colorante en exceso se elimina por lavado, del modo descrito en el ejemplo 1, empleándose cada vez 4,5 litros de la solución de lavado, en el orden de sucesión mencionado.

25 Ejemplo 4

1 g de fibrinógeno se disuelve en 100 ml de tam



13 ENE 1975

pón de fosfato 0,2 M, de pH 7,4, y se hace reaccionar con
10,4 mg (10 μ l) de anhídrido de ácido crotónico. El deri
vado crotonílico del fibrinógeno, formado al dejar repo
sar la carga, se copolimeriza, de modo correspondiente
5 al del ejemplo 2, con acrilamida, a pH 8,5, para dar un
gel al 4 por ciento. Para ello se hacen reaccionar 100 ml
de la solución de crotonilfibrinógeno con las soluciones
de polimeración según Ornstein, descritas en el ejemplo
2, añadiéndose en este caso 25 ml de solución A, 20 ml
10 de solución C y 5 ml de peroxidisulfato de amonio. Des
pués de 1 hora se cubre el gel con 300 ml de solución de
cloruro de sodio al 0,9 por ciento, se desmenuza con un
homogeneizador de laboratorio, a continuación se centri
fuga, se lava una vez con solución de sal común, se cen
15 trifuga de nuevo, y se suspende en 150 ml de un tampón de
fosfato trisódico, que contiene 1 g de fosfato trisódico,
y se hace reaccionar con 0,5 g de Remazol ^(R) azul turque
sa B (C.I. Reactive blue 77) a 40°C. El colorante en ex
ceso se elimina por lavado, según el ejemplo 1, emplean
do cada vez 1,5 litros de la solución de lavado.
20

Ejemplo 5

10 g de gelatina se disuelven a 60°C en tampón
de fosfato 0,1 M, de pH 8,5, y se hacen reaccionar, a apro
ximadamente 30°C con 56,5 μ l (58,5 mg) de alilisotiociana
25

13 ENE. 1975



to. Se forma el derivado de alilisotiourea. Este se co-
polimeriza, de modo correspondiente al del ejemplo 2, con
acrilamida, a pH 8,5, para dar un gel al 4 por ciento. Pa-
ra ello se hacen reaccionar 100 ml de una solución al 10
5 por ciento de alilisotiourea-gelatina con las soluciones
según Ornstein, mencionadas en el ejemplo 2, utilizándose
en este caso 25 ml de solución A, 20 ml de solución C y 5
ml de solución de peroxidisulfato de amonio. Al cabo de
1 hora el gel se cubre con 300 ml de solución de sal co-
10 mún al 0,9 por ciento, se desmenuza con un homogeneizador
de laboratorio, se centrifuga, se lava una vez con solu-
ción de sal común, se centrifuga de nuevo, se suspende en
150 ml de un tampón de fosfato trisódico, que contiene
9,2 g de fosfato trisódico, y se hace reaccionar con 4,6
15 g de Remazol (R) azul turquesa B (C.I. Reactive blue 77),
a 40°C. El colorante en exceso se elimina por lavado según
el ejemplo 1, empleando cada vez 1,5 litros de la solución
de lavado.

20 Ejemplo 6

100 ml de Haemaccel (R) con un contenido de pro-
teína de 10 %, se mezclan con 100 ml de tampón de fosfato
0,1 M, de pH 8,5, y se hacen reaccionar con 56,5 mg de
anhídrido de ácido maleico, a 30°C. El Haemaccel maleoila
25 do se copolimeriza, según el ejemplo 2, con acrilamida a

13 ENE 1975



pH 8,5, para dar un gel al 4 por ciento. Para ello se hacen reaccionar 200 ml de la solución de maleoil-Haemaccel con las soluciones de polimerización según Ornstein, descritas en el ejemplo 2, añadiéndose en este caso 50 ml de solución A, 40 ml de solución C y 10 ml de solución de peroxidisulfato de amonio. Al cabo de 1 hora el gel se cubre con 600 ml de solución de sal común al 0,9 por ciento, se desmenuza con un homogeneizador de laboratorio, se centrifuga, se lava una vez con solución de cloruro de sodio, se centrifuga de nuevo, se suspende en 300 ml de un tampón de fosfato trisódico, que contiene 9,2 g de fosfato trisódico, y se hace reaccionar con 4,6 g de Remazol (R) azul turquesa B (C.I. Reactive blue 77), a 40°C. El colorante en exceso se elimina por lavado, según el ejemplo 1, empleando cada vez 3 litros de la solución de lavado.

Ejemplo 7

1 g de caseína se disuelve en tampón de citrato 0,1 M, de pH 7,4 para dar una solución al 10 por ciento. A temperatura ambiente se añaden 0,2 ml de polietilenglicol- α , ω -di-(sulfofenil-4-isotiocianato) con un peso molecular entre 1000 y 6000, y se agita hasta la solidificación. Al cabo de 1 hora se desmenuza el gel. Después de la eliminación de la proteína no fijada, por lavado con

13 CNE-1975

2 porciones de 50 ml de un tampón de citrato 0,1 M, de
pH 7,4, el gel se centrifuga, se suspende en 50 ml de un
tampón de fosfato trisódico, que contiene 1 g de fosfato
trisódico, se mezcla con 0,5 g de Remazol ^(R) rojo bri-
5 llante FB (C.I. Reactive red 104) y se mantiene a 40°C
durante 3 horas. El colorante en exceso se elimina por
lavado, según el ejemplo 1, empleando cada vez 1 litro
de la solución de lavado.

10 Ejemplo 8

600 mg de α -caseína se disuelven en tampón de
trishidroximetilaminometano (tris) 0,05 M, de pH 7,5, que
contiene NaCl 0,09 M, para dar una solución al 3 por cien-
to, y se calienta durante 1 hora a 80°C. Después de en-
15 friamiento a 30°C, se añaden 0,15 ml de polietilenglicol-
- α , ω -di-(sulfofenil-4-isotiocianato), con un peso mole-
cular entre 500 y 1000, y la mezcla se agita hasta la so-
lidificación. Al cabo de 1 hora se desmenuza el gel, y la
proteína no fijada se elimina por lavado con 2 porciones
20 de 100 ml de un tampón de citrato 0,1 M, de pH 7,4, se
centrifuga, y se suspende en 20 ml de un tampón de fosfa-
to trisódico, que contiene 600 mg de fosfato trisódico.
A esta suspensión se añaden 300 mg de Procion ^(R) azul
turquesa H 7 G (C.I. Reactive blue 3), se mantiene a 40°C
25 durante 30 minutos y a continuación se calienta a 80°C

13 ENE 1975

durante 30 minutos más. Después del enfriamiento, el colorante en exceso se elimina por lavado, según el ejemplo 1, empleando cada vez 200 ml de la solución de lavado.

5 Ensayo 1

A 50 mg de un substrato según el ejemplo 2, se cado por congelación a partir de una suspensión en sal común fisiológica, se añaden con una pipeta 2 ml de agua destilada y 2 ml de tampón de citrato 0,1 molar, de pH 7,4, y la carga se deja durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, con una varilla de vidrio, se prepara una suspensión homogénea y se incuba ésta durante 5 minutos a 37°C en baño de agua. 2 ml de citrato-sangre de un paciente sometido a terapia de fibrinólisis se añaden al substrato inmediatamente después de la toma de la vena del brazo, y la carga se mezcla bien. Se incubaba durante 15 minutos a 37°C, con agitación en tres veces. La degradación se detiene al cabo de 15 minutos por adición de 1 ml de una solución diluída del inhibidor de tripsina Kunitz, con 500 unidades internacionales K/ml. Después de la separación del substrato por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga de laboratorio, la porción sobrenadante transparente se separa por sifonación y se mide a 665 nm en el espectrofotómetro. Por medio de una curva de calibrado se puede leer la activi-



13 EN 1975

dad de plasmina. Para un paciente después de 10 minutos de terapia de fibrinólisis resultó, por ejemplo, un ΔE 665 nm de 0,235 unidades O. De una curva de calibrado, que había sido construída con ayuda de cantidades defini

5 das de plasmina y que está incluida como figura 1, se lee una actividad de plasmina de 0,16 unidades según Remmert y Cohen, para este momento.

Por variación de las condiciones de ensayo, se pueden determinar, por ejemplo, las siguientes enzimas:

10

Enzima	Substrato ^{x)}	Tampón	pH	Temperatura de incubación	Duración de la incubación
Tripsina	Haemaccel	Tris 0,05 M	8,0	37°C	15 minutos
15 Quimo-tripsina	Gelatina	Fosfato 0,05 M	7,5	37°C	15 minutos
Colagenasa	Colágeno	Citrato 0,1 M	7,4	37°C	30 minutos
20 Bromelaina	Caseína	Acetato 0,1 M	4,0	40°C	30 minutos
Ficina	Hemoglobina	Tris 0,05 M	8,5	40°C	20 minutos
Pronasa	Caseína	Borato 0,06 M	9,0	40°C	10 minutos

25

x) El vehículo y el colorante pueden ser elegidos a volun-

13 ENE 1975

tad dentro del marco de la invención.

Experiencia 2

5 Comparación de la sensibilidad del sustrato
 preparado según la invención, con un producto comercial
 correspondiente a la situación actual de la técnica cono
 cida hasta ahora, preparado a partir del colágeno desna
 turalizado de piel de vaca, sobre el que se ha fijado un
 colorante azul, en el máximo de absorción correspondien
 10 te. Como enzima se emplea tripsina (Serva, 2 veces cris
 talizada). La degradación se lleva a cabo durante 15 mi
 nutos, a 37°C, en trishidroximetilaminometano 0,05 M, de
 pH' 7,8, y se detiene con un inhibidor de proteinasas. El
 volumen de la carga de reacción fué de 6 ml.

15	Cantidad de tripsina	Substrato I	Substrato II
	ng	(producto comercial)	(sustrato se- gún la inven- ción)
		ΔE 595 nm	ΔE 665 nm
	0	0,00	0,00
20	10	no ensayado	0,045
	50	0,001	0,260
	100	0,004	0,485
	10.000	0,670	no ensayado

25 Como puede verse a partir de los números compa-



130

rativos, el substrato preparado según la invención es esencialmente más sensible que el substrato según el estado actual de la técnica.

5 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el 21 de Diciembre de 1.973, bajo el número P 23 63 854.2, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Procedimiento para la preparación de un subtrato para la determinación de proteinasa, caracterizado por que una proteína substrato es hecha reaccionar directa o indirectamente con al menos un compuesto químico polimerizable o polímero, y la proteína unida al polímero es teñida con un colorante reactivo.

25

28-9-75

-22-



2^a.- Procedimiento para la preparación de un
substrato para la determinación de proteínasa, caracteri-
zado porque un vehículo, a base de un copolímero de un mo-
nómero activo con un monómero inactivo, se hace reaccio-
5 nar con una proteína substrato, de forma que los grupos
activos del vehículo formen enlaces covalentes con los de
la proteína substrato, y porque el producto de reacción
se tiñe con un colorante reactivo.

3^a.- Procedimiento para la preparación de un
10 substrato para la determinación de proteínasa, caracteri-
zado porque un vehículo, que no contiene ningún grupo ac-
tivo, se hace reaccionar con una proteína substrato con
ayuda de una sustancia que proporciona grupos activos, y
porque el producto de reacción se tiñe con un colorante
15 reactivo.

4^a.- Procedimiento para la preparación de un
substrato para la determinación de proteínasa, caracteri-
zado porque se introducen grupos reactivos en una proteí-
na substrato, que después se copolimeriza con un monómero
20 inactivo.

5^a.- Procedimiento para la preparación de un
substrato para la determinación de proteínasa, caracteri-
zado porque un polímero soluble, provisto de grupos reac-
tivos, se reticula con la proteína substrato.

25 6^a.- Procedimiento para la determinación de pro



teinasa, caracterizado porque se utiliza un substrato que puede obtenerse según las reivindicaciones 1ª a 5ª.

7ª.- Procedimiento para la preparación de un substrato para la determinación de proteinasa.

5

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado

Esta Memoria consta de veinticuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

10

Madrid,

13 OCT. 1975

P.A.

Alberto de Cárdenas

Por Poder.

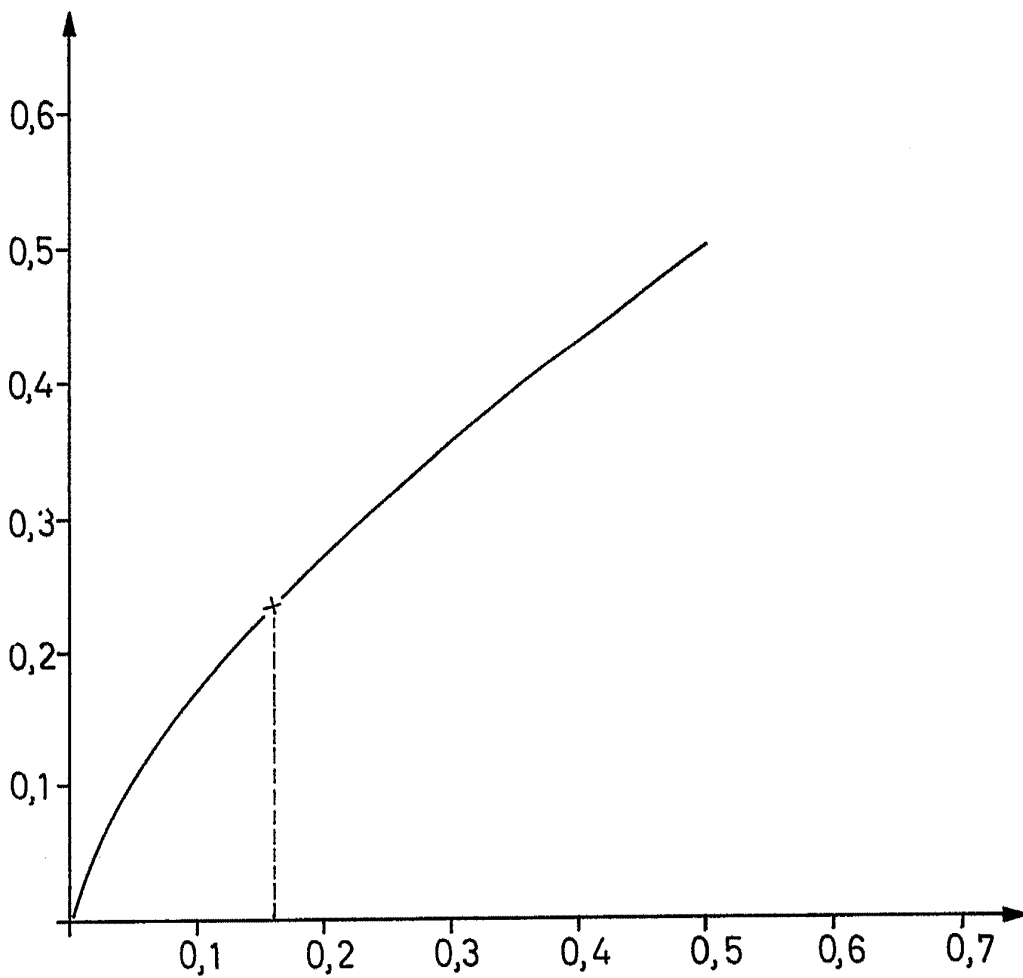
28-9-75

1fg.

-24-



13 ENI 1975



Alberto de Lizasoain
Por Poderes