



19 ES	11	NUMERO	452054	10 A1
	21			
	22	FECHA DE PRESENTACION	-1 OCT. 1976	

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
75.11148-4	6-octubre-1975	Suecia.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 01 N 33/16	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"METODO PARA EL ESTUDIO DE REACCIONES ENZIMATICAS Y OTRAS REACCIONES BIOQUIMICAS".		
71 SOLICITANTE (ES)		
AKTIEBOLAGET KABI		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
S-104 25.- ESTOCOLMO (Suecia)		
72 INVENTOR (ES)		
Hans Rune Arwin, y Kurt Ingemar Lundström.		
73 TITULAR (ES)		
AKTIEBOLAGET KABI		
74 REPRESENTANTE		
D. Santiago Hesse Murga.- Agente Oficial.		



Método para el estudio de reacciones enzimáticas y otras reacciones bioquímicas.

La presente invención se refiere a un procedimiento pa  
ra estudiar las reacciones enzimáticas y otras reacciones  
5 bioquímicas del tipo en que la sustancia, cuya actividad  
o concentración se quiere determinar, afecta a un substra  
to específico para la reacción bioquímica.

Se pretende que el método sea utilizado, entre otras  
cosas, para la determinación de la actividad enzimática,  
10 especialmente para los enzimas del tipo de las proteasas  
séricas, (trombina, plasmina, tripsina, etc). Algunos de  
estos enzimas regulan la coagulación de la sangre y la fi  
brinólisis, y las alteraciones en las cantidades normales  
de enzimas explican algunos cambios patológicos tales co  
15 mo las hemorragias o las trombosis.

El método puede también ser utilizado para estudiar re  
acciones inmunológicas tales como los acoplamientos anti-  
geno-anticuerpo. Entre otros sistemas que también pueden  
estudiarse se encuentran los acoplamientos inhibidor-enzi  
20 ma, los acoplamientos receptor-hormona y los acoplamien  
tos receptor-esteroide.

Se conoce previamente el estudio de las reacciones en  
zimáticas por medio de "electrodos", en los que se mide  
la diferencia de potencial sobre las membranas, específi  
25 ca para los productos de desecho de la reacción. Véase



también Gough D.A. y Andrade J.D. Enzyme Electrodes, Science Vol 180, pp 380-384.

Al estudiar las reacciones inmunológicas, se conoce la utilización de placas de vidrio metalizadas con níquel sobre las que se han absorbido antígenos formando una capa superficial de manera que cuando la placa de vidrio se sumerge en una solución conteniendo anticuerpos, hay un acoplamiento entre los antígenos y los anticuerpos, con el resultado de que aumenta el espesor de la capa. El acoplamiento se detecta midiendo ópticamente el espesor de la capa por medio de un elipsómetro. Véase también Rothen A., "Immunologic and enzymatic reactions carried out at a solid-liquid interface, Physiol Chem & Physics 5, 1973".

Se conoce también previamente la determinación de la actividad enzimática por medio de un procedimiento conductométrico, véase Lawrence A.J. y Moores G.R., "Conductometry in Enzyme Studies, Eur J. Biochem 24 (1972), pp 538-546".

También se conoce el hecho de que las moléculas orgánicas pueden absorberse sobre superficies de los electrodos y cambiar las propiedades eléctricas de los electrodos, véase Bockris J. O'M y Reddy A.K.N., "Modern Electrochemistry, Plenum Press, Vol 2. chap 7".

También se han desarrollado substratos especiales con elevada susceptibilidad a los enzimas en cuestión, espe-



cialmente del tipo de substrato de amida, con su capacidad propia para ser hidrolizado en presencia del enzima dando como resultado productos cromofóricos. El cambio de colores que se presenta puede medirse fácilmente por  
55 medios espectrofotométricos, por ejemplo, por medio de un espectrómetro óptico de absorción. En la patente de los Estados Unidos nº 3.884.896 se describe un substrato que puede ser utilizado para la detección óptica de la actividad enzimática, y que facilita la prueba clínica, por  
60 ejemplo, de ciertas cantidades de antitrombina y protrombina.

Uno de los inconvenientes que se observa en el método de detección óptica es que se necesita un aparato más -- bien complicado y caro, y se precisa también una cantidad  
65 considerable de substrato en el procedimiento de medición. Por otra parte, no es posible estudiar directamente en la sangre la actividad enzimática debido a la turbidez de la sangre. Por el contrario, es necesario trabajar con el plasma (después de retirados los glóbulos rojos) o el suero (después de retirado también el fibrinógeno).  
70

La finalidad de la presente invención es la de proporcionar un método simple en el que se eliminan los inconvenientes antes citados. La invención, pues, se caracteriza fundamentalmente por el hecho de que en primer lugar se mide la capacitancia entre dos electrodos en presencia --  
75 del substrato solo y posteriormente se mide la capacitancia



80      cia añadiendo la sustancia cuya actividad o concentra-  
ción se quiere determinar, con lo que el cambio de capa-  
citanancia por unidad de tiempo o el cambio total de capa-  
citanancia es la medida de la actividad o concentración de  
la sustancia.

A continuación se describirá la invención con más de-  
talle con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

85      La figura 1, muestra un aparato eléctrico de medición,  
para medir la capacitancia entre dos electrodos; la figu-  
ra 2, muestra un diagrama simplificado de un circuito --  
equivalente del dispositivo de medición; la figura 3, --  
muestra una curva de la capacitancia medida en función del  
tiempo, cuando se añade el substrato; la figura 4, muestra  
90      una vista esquemática del procedimiento para determinar la  
actividad enzimática; la figura 5, muestra una curva del  
recubrimiento de moléculas de substrato absorbidas ( $1/C_g$ )  
en función de la concentración del substrato en la solu-  
ción; la figura 6, muestra una vista esquemática del pro-  
95      cedimiento cuando se estudia una reacción inmunológica y,  
la figura 7 muestra una vista esquemática del procedimien-  
to cuando se estudia una reacción bioquímica en la que que-  
da afectado el substrato de la solución circundante.

100      En el primer ejemplo de realización, la invención se -  
describe en relación con la determinación de la actividad  
enzimática de las proteasas séricas. La invención se basa



en el hecho de que el substrato que se utiliza tiene la propiedad inherente de absorberse sobre una superficie metálica de absorberse en presencia de los enzimas en --  
105 cuestión. En la figura 1 se representa un aparato de medición por medio del cual se mide la impedancia de la ten sión alterna entre dos electrodos de platino 2,3, sumergidos en una solución 4. El aparato de medición comprende un puente de impedancia 1, un generador de señales 5  
110 y un amplificador con un detector de cero 6. Al comienzo, el dispositivo de medición contiene solo una solución tam pón con un  $\text{Ph} = 8,2$  y una resistencia iónica de 0,15. Con este valor de pH y esta resistencia iónica, los enzimas -- en cuestión investigados tienen una actividad óptima. Da-  
115 do que la resistencia iónica es elevada, dá origen a la -- polarización de los electrodos si se evalúa la medición a una frecuencia relativamente baja (100 kHz en este caso). La resistencia en serie  $R_s$  se determina por la conductivi dad del electrolito y la capacitancia  $C_s$  se determina prin-  
120 cipalmente por la polarización de los electrodos y una posible capa absorbida de moléculas.

Según la figura 1, es evidente que el dispositivo de me dición está conectado de forma que constituya uno de los brazos del puente de impedancia. Si en este momento se aña  
125 de a la solución tampón una pequeña cantidad de un substra to de polipéptido del tipo mencionado en la patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 3.884.896, la capacitancia medida  $C_s$  vá-



ría en función del tiempo, véase figura 3. La capacitancia  $C_g$  disminuye en función del tiempo, véase la curva a en la figura 3, según el hecho de que las moléculas de polipéptido se absorvan sobre las superficies de los electrodos. Gradualmente se obtiene un equilibrio entre las moléculas de polipéptido en la solución y las moléculas absorvidas sobre las superficies de los electrodos. En este momento puede suponerse que se absorbe sobre las superficies de los electrodos una capa monomolecular de moléculas del substrato.

Si en este momento se añade en el punto A, figura 3, una solución enzimática con capacidad para separar el polipéptido, cambiará de nuevo la capacitancia medida  $C_g$ . La capacitancia  $C_g$  aumenta y vuelve a su valor original, véase curva b en la figura 3. El cambio de capacitancia depende fundamentalmente del hecho de que el enzima añadido afecta al polipéptido absorvido. El enzima añadido puede ser, por ejemplo, trombina, tripsina o plasmina (proteasas séricas), que hidrolizan el substrato polipeptídico, con lo que las moléculas absorvidas se sueltan o "se consumen" total o parcialmente, de forma que cambia la capacitancia del dispositivo de medición. El cambio de capacitancia por unidad de tiempo, la inclinación inicial de la curva b en la figura 3, es una medición de la actividad enzimática.

El dispositivo de medición puede calibrarse por medio de una cantidad conocida de enzima. A continuación puede utilizarse



155 zarse la curva de calibración, cuando se mida sobre una  
solución con una cantidad desconocida de enzima. Cuando  
se realiza la medición en el plasma de la sangre, es in-  
terésante la cantidad de anti enzima. La cantidad mencio-  
nada puede determinarse añadiendo una cantidad conocida  
de enzima al plasma de la sangre. Después de algunos mi-  
160 nutos, cuando se queda inhibido el anti enzima, se mide  
la cantidad restante de enzima. Si este procedimiento se  
evalúa para dos cantidades diferentes de enzima o plasma,  
puede extrapolarse la cantidad original de anti enzima.

El procedimiento que se describe a continuación para  
165 determinar la actividad enzimática se ilustra esquemáti-  
camente en la figura 4, en la que la figura 4a muestra  
el dispositivo de medición con los electrodos sumergi-  
dos en la solución del substrato, con lo que las molécu-  
las de substrato S se distribuyen entre moléculas en la  
170 solución y moléculas adsorbidas en las superficies del  
electrodo. A una baja concentración, la reacción entre  
ellas se mantiene constante. Cuando aumenta la concentra-  
ción, las superficies de los electrodos se rellenarán gra-  
dualmente y quedará adsorbida una parte cada vez menor de  
175 las moléculas añadidas. En la figura 5, un diagrama ilus-  
tra el espesor de la capa a diferentes concentraciones del  
substrato polipeptídico (la cantidad de polipeptido de la  
concentración 1 mm. en 0.5 ml. de solución tampón). El dia-  
grama ilustra que, a elevadas concentraciones de péptidos,



180 posiblemente se absorve una capa única de moléculas de  
péptidos. La adición ulterior del substrato aumenta en  
tonces fundamentalmente al número de moléculas en la so  
lución.

Se a continuación se añade un enzima, véase figura 4b,  
185 las moléculas enzimáticas E afectarán a las moléculas de  
la solución así como a las moléculas absorvidas. En la fi  
gura 4c se ilustra como varía la capacitancia en serie  $C_s$ ,  
en función del tiempo, cuando se añaden moléculas S del  
substrato y posteriormente moléculas E del enzima. Dado  
190 que el dispositivo de medición únicamente detecta los cam  
bios en el número de moléculas absorvidas, es conveniente  
que la mayor cantidad posible afecte a las moléculas ab--  
sorvidas. En consecuencia, se espera un punto óptimo de  
sensibilidad en presencia de una cierta cantidad de pépti  
do añadido. A una baja concentración de péptido, se obser  
195 va una pérdida de sensibilidad porque las superficies de  
los electrodos tienen una pequeña eficiencia de llenado y  
a elevadas concentraciones la mayoría del enzima añadido  
afecta a las moléculas en la solución. Las medidas indican  
200 igualmente que existe este punto óptimo.

En el ejemplo que acabamos de describir, el substrato  
consiste en un polipéptido del tipo descrito en la paten  
te de los Estados Unidos 3.884.896, con susceptibilidad  
a la trombina y otros enzimas proteolíticos del tipo de  
205 las peptidohidrolasas peptídicas. El substrato que ha si-



do utilizado se hidroliza en presencia de los enzimas en cuestión y produce un producto cromofórico que puede ser medido espectrofotométricamente. El substrato utilizado no es en absoluto óptimo para la detección eléctrica que acabamos de describir, siendo lo principal que el substrato se adhiere a fondo de los electrodos y que una parte significativa se suelta en la hidrólisis enzimática que da origen a un importante cambio en la capacitancia de los electrodos metálicos. En consecuencia, el substrato se adherirá de forma que el enlace "sensible" quede accesible al enzima. Los experimentos realizados han indicado que el substrato no saturará totalmente la superficie para una eficiencia óptima de la detección.

220 En el ejemplo que hemos descrito el substrato se ha añadido también a la solución tampón en el dispositivo de medición, con lo que el substrato se absorbe sobre los electrodos metálicos. Una alternativa es la de proporcionar a los electrodos una capa de substrato antes de la medición, es decir, utilizar electrodos previamente preparados y estudiar el cambio de capacitancia resultante cuando estos electrodos se sumergen en la solución enzimática en cuestión. En consecuencia, no es necesario que el substrato se absorva sobre el electrodo metálico ya que el substrato, por ejemplo, puede unirse químicamente a la superficie del electrodo, a condición de que las moléculas de substrato tengan propiedades tales que el enlace "sensible" es



235 té accesible al enzima y que se suelte una parte de toda la molécula del substrato, cuando el enzima afecte a la molécula.

La figura 6 muestra un ejemplo en el que se utiliza el dispositivo de medición para estudiar una reacción inmunológica del tipo unión antígeno-anticuerpo. De acuerdo con el ejemplo que se acaba de describir, se mide la capacitancia entre dos electrodos 2, 3, por medio de un puente de impedancia 1 con las mismas características de construcción que el de la figura 1. Las superficies de los electrodos se preparan con antígenos ya desde el comienzo, o bien se sumergen los electrodos en una solución de antígenos, con lo que los antígenos se absorben sobre las superficies del electrodo y se mide la capacitancia en este caso. A continuación se sumergen los electrodos en la solución que contiene anticuerpos, con lo que los anticuerpos unen a los antígenos absorbidos, de forma que aumenta la capa en las superficies de los electrodos, es decir, disminuye la capacitancia  $C_g$ . La figura 6a ilustra los electrodos sumergidos en una solución tampón 4, y cuando se añaden moléculas de antígeno (indicadas con S) existe una absorción sobre las superficies de los electrodos de moléculas de antígeno, hasta que finalmente se alcanza el equilibrio entre los antígenos en la solución y los antígenos absorbidos en la superficie de los electrodos, véase figura 6b. En la figura 6c finalmente se ilustra el procedimiento de añadir anticuerpos E a la so-

240

245

250

255



260 lución. Algunos de los anticuerpos están unidos a anti-  
genos en la solución y otros a antígenos en la superfi-  
cie de los electrodos. También en este caso se alcanza  
un equilibrio, véase la curva 6d, que ilustra la capaci-  
tancia en serie  $C_g$  entre la superficie de los electro-  
265 dos como función del tiempo cuando se añaden antígenos  
(S) y anticuerpos (E). La inclinación inicial de la cur-  
va, después de añadir los anticuerpos (E) se determina  
por la concentración de anticuerpos, Lo que proporciona  
una medida cuantitativa de la misma. También puede obte-  
270 nerse una medida cuantitativa de la concentración de an-  
ticuerpos por el cambio total de capacitancia cuando se  
añaden anticuerpos.

En el ejemplo que se describe a continuación, el subs-  
trato específico consiste en antígenos cuyas moléculas  
275 deben tener la capacidad para adherirse a los electrodos  
de forma que las moléculas de los anticuerpos puedan unir-  
se a las moléculas de antígeno y además que la capa anti-  
geno-anticuerpo que se forme se mantenga suficientemente  
fuerte sobre el electrodo. Si el complejo antígeno-anti-  
280 cuerpo se suelta de la superficie del electrodo, este  
procedimiento puede aplicarse de acuerdo con el ejemplo  
anterior.

Incluso para la detección de anticuerpos existe una  
concentración óptima de antígenos que depende del equi-  
285 librio que ocurre entre los antígenos en la solución y



los antígenos en la superficie del electrodo, incluso un equilibrio entre moléculas de antígeno y anticuerpo simples y unidas respectivamente.

290 En caso de que la sustancia que se estudia afecte únicamente al substrato en la solución, el procedimiento se aplica del siguiente modo.

295 Cuando se añade una sustancia a la solución en el dispositivo de medición, cuya sustancia afecta únicamente al substrato en la solución, disminuirá la concentración de moléculas del substrato. Con el fin de mantener el equilibrio entre el substrato en la solución y el substrato absorbido, el substrato absorbido se soltará de la superficie de los electrodos, dando lugar a una disminución de la capa situada sobre la superficie de los electrodos y a un  
300 aumento de la capacitancia  $C_s$ , véase figura 7d. El cambio de capacitancia por unidad de tiempo, la inclinación de la curva cuando se añade la sustancia en cuestión, se determina por la concentración de la sustancia que proporciona una medida cuantitativa de la misma. Lo mismo ocurre con el cambio total de capacitancia (después de un  
305 tiempo prolongado), que por consiguiente puede utilizarse como medida de concentración o actividad de la sustancia en cuestión.

310 En muchos casos la sustancia añadida afecta tanto al substrato en solución como al substrato sobre los electrodos. El cambio de capacitancia depende pues de dos pro



cesos, pero sigue siendo una medida cuantitativa de la -  
concentración o actividad de la sustancia añadida.

315 En los ejemplos que se han descrito, se utilizaron elec-  
trodos de platino. Como material para los electrodos pue-  
den también utilizarse otros metales. Metales como el co-  
bre, la plata, el molibdeno, el titanio, el oro, el pala-  
dio y el cromoníquel, se ha demostrado que pueden utili-  
zarse perfectamente como material para los electrodos. Se  
320 ha observado, sin embargo, que también pueden utilizarse  
otros tipos de electrodos, como electrodos de semiconduc-  
tores. En los ejemplos se considera además que el puente  
de impedancia se proporciona preferentemente con salidas  
que exponen el cambio de capacitancia por unidad de tiem-  
325 po ("actividad enzimática e instantánea") y cambio total  
de capacitancia ("actividad enzimática integrada") para  
la muestra en cuestión.

La invención no se limita a los métodos expuestos co-  
mo ejemplos, sino que pueden introducirse diversas modi-  
330 ficaciones sin apartarse por ello del espíritu ni del ám-  
bito de la invención.



## REIVINDICACIONES

- 1.- METODO PARA EL ESTUDIO DE REACCIONES ENZIMATICAS Y OTRAS REACCIONES BIOQUIMICAS, en el que una sustancia, cuya actividad/concentración quiere determinarse, afecta a un substrato específico para la reacción bioquímica, caracterizado porque se determina como valor de control la capacitancia en un dispositivo de medición que contiene electrodos recubiertos con substrato, con lo que la sustancia, cuya actividad/concentración quiere determinarse, se introduce en el dispositivo de medición del cambio de capacitancia, de modo que se consiga una medida cuantitativa de la actividad/concentración de la sustancia, presente en la muestra y que afecta al substrato específico unido a los electrodos.
- 2.- Método, según la reivindicación anterior, caracterizado porque la capa de substrato en la superficie de los electrodos se forma por inmersión de los electrodos en una solución que contiene substrato con capacidad de absorberse sobre la superficie de los electrodos.
- 3.- Método, según la reivindicación 2, caracterizado porque cuando se añade la sustancia cuya actividad o concentración se quiere determinar, las moléculas de substrato absorbidas en las superficies de los electrodos, se dosifican totalmente o en parte.
- 4.- Método, según la reivindicación 2, caracterizado porque las moléculas del substrato absorbido, cuando se añade la sustancia cuya actividad o concentración se quiere determinar, se unen a las moléculas añadidas, con lo que aumenta el espesor de la ca-

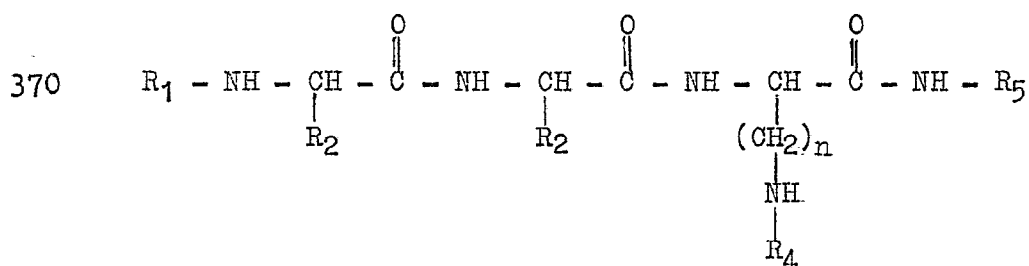


pa situada sobre la superficie de los electrodos

360 5.- Método, según la reivindicación 1, caracterizado por-  
que la capacitancia entre los electrodos se mide por me--  
dio de un puente eléctrico de impedancia.

365 6.- Método, según la reivindicación 1, caracterizado por-  
que se determinan proteasas séricas, con lo que el subs--  
trato consiste en polipéptidos escindibles sintéticos, es-  
pecíficos para las proteasas séricas.

7.- Método, según la reivindicación 6, caracterizado por-  
que el substrato está representado por la fórmula:



o sus sales, en donde R<sub>1</sub> es hidrógeno, un alquilo-carboni-  
375 lo que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un ω-aminoalquil-  
carbonilo con 1-12 átomos de carbono en una cadena recta,  
ciclohexil-carbonilo ω-ciclohexilalquil-carbonilo con 1-6  
átomos de carbono en una cadena recta, 4 amino-etil-ciclo-  
hexil-carbonilo, benzoílo, benzoílo sustituido con uno o  
380 más sustituyentes seleccionados entre átomos de halógeno,  
grupos metilo, amino y fenilo, un ω fenil-alquil-carboni-  
lo con 1-6 átomos de carbono en cadena recta, benzensulfo-  
nilo, 4-toluensulfonilo o N<sup>α</sup>-benzoil-fenilalanilo; R<sub>2</sub> es fe



385 nilo, benzilo, 4-hidroxibenzilo, 4-metoxibenzilo o 4 metilbenzilo;  $R_3$  es un alquilo recto, ramificado o cíclico con 3-8 átomos de carbono, fenilo o benzilo;  $n$  es 3 o 4;  $R_4$  es hidrógeno o guanil; y  $R_5$  es fenilo, nitrofenilo, metilnitrofenilo, dinitrofenilo, naftilo, nitronaftilo, quinolilo o nitroquinolilo.

390 8.- Método, según la reivindicación 4, caracterizado por que las moléculas del substrato absorbidas son inhibidores de las moléculas cuya actividad o concentración se pretende determinar.

395 9.- Método, según la reivindicación 4, caracterizado por que las moléculas del substrato absorbidas consisten en receptores de hormonas cuya actividad o concentración se pretende determinar.

400 10.- Electrodos recubiertos con substrato bioquímicamente específico, para la determinación de sustancias con actividad enzimática inmunológica u otra actividad bioquímica, en los que el substrato queda afectado por la sustancia que se quiere analizar, de forma que la capacitancia en una célula de medición con los electrodos recubiertos cambia en comparación con los valores de control medidos en el dispositivo de medición, en ausencia de la sustancia que afecta el substrato.

405

11.- METODO PARA EL ESTUDIO DE REACCIONES ENZIMATICAS Y OTRAS REACCIONES BIOQUIMICAS.

Cons.....



17

ta esta memoria descriptiva de diecisiete folios mecano  
grafiados a una sola cara, a los cuales se unen cuatro  
hojas de planos de dibujos para su mejor comprensión.

Madrid, - 1 OCT. 1976 .

AKTIEBOLAGET KABI,

P.p.

*AA*

*AA*

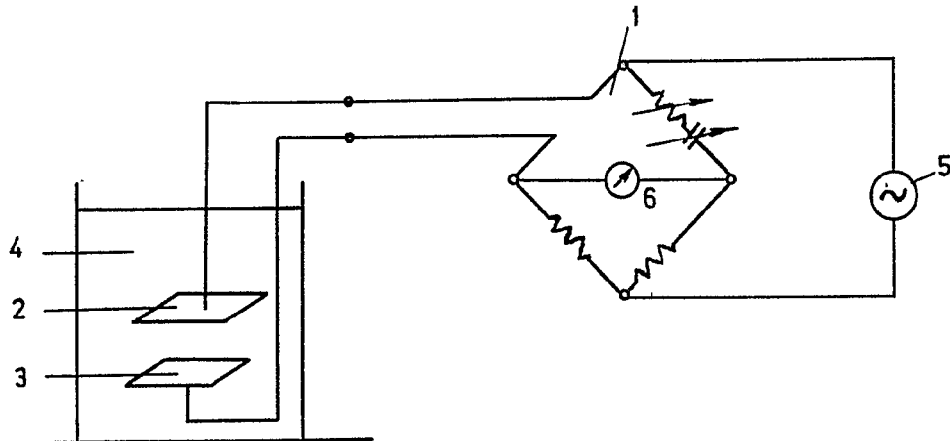


Fig. 1

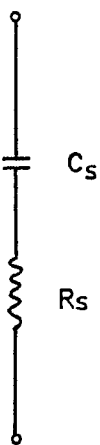


Fig. 2

Escala variable  
Madrid, - 1 OCT. 1976

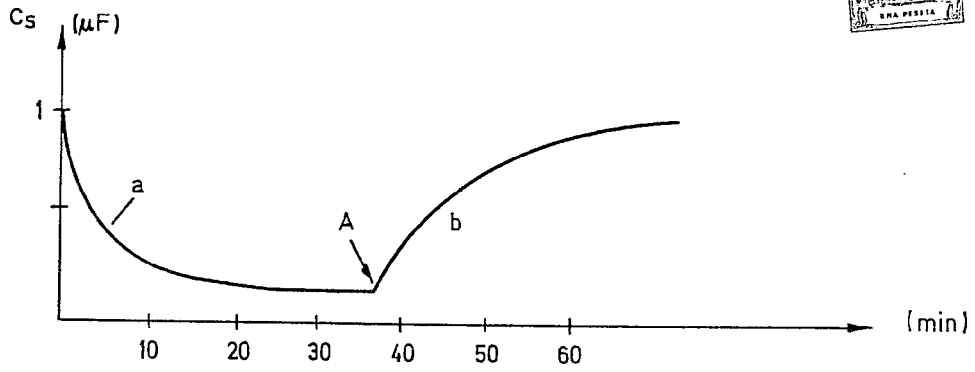


Fig. 3

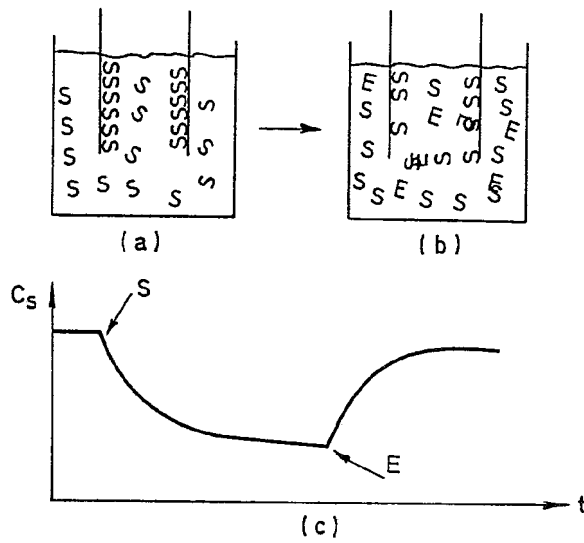


Fig. 4

Escale variable  
Madrid, - 1 OCT. 1976

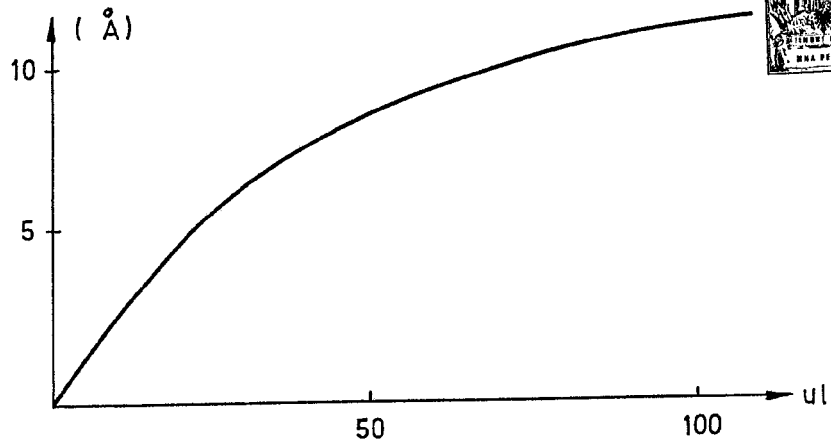


Fig. 5

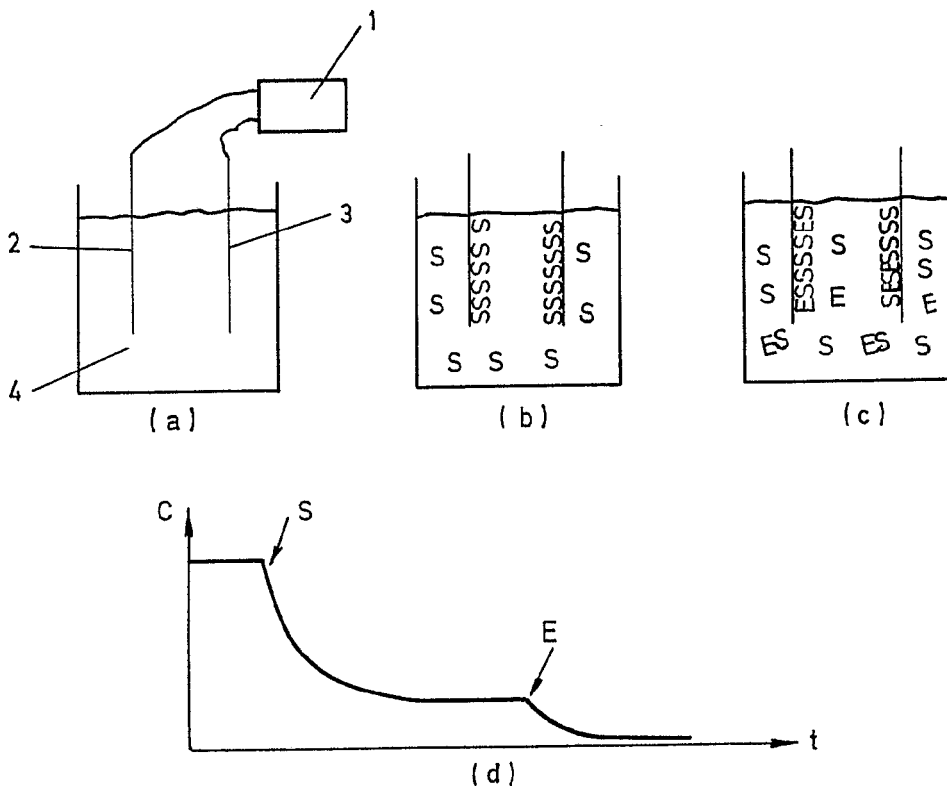
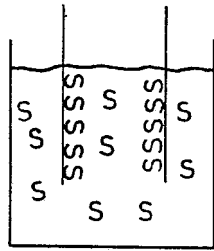
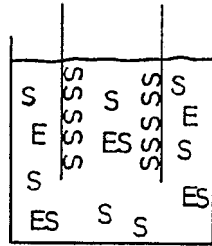


Fig. 6

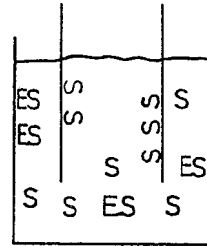
Escala variable  
Madrid, 1 OCT. 1976



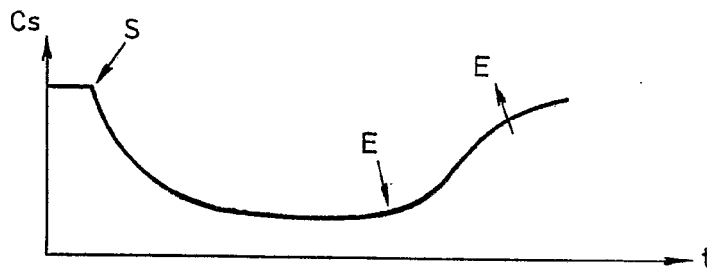
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 7

Escala variable.  
Madrid, - 1 OCT. 1976