



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 318 905**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/26 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99953363 .1**
(96) Fecha de presentación : **28.05.1999**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1082453**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2001**

(54) Título: **Conjunto de reactivos líquido, para la determinación del L-lactato.**

(30) Prioridad: **29.05.1998 US 87230**
09.06.1998 US 94235

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

(73) Titular/es: **Roche Diagnostics Operations, Inc.**
9115 Hague Road, P.O. Box 50416
Indianapolis, Indiana 46250-0416, US

(72) Inventor/es: **Dorn, Allan, R.;**
Hurt, Catherine, J.;
Mountain, Larry, D. y
Siedel, Joachim

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 318 905 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjunto de reactivos líquidos, para la determinación del L-lactato.

5 **Campo técnico**

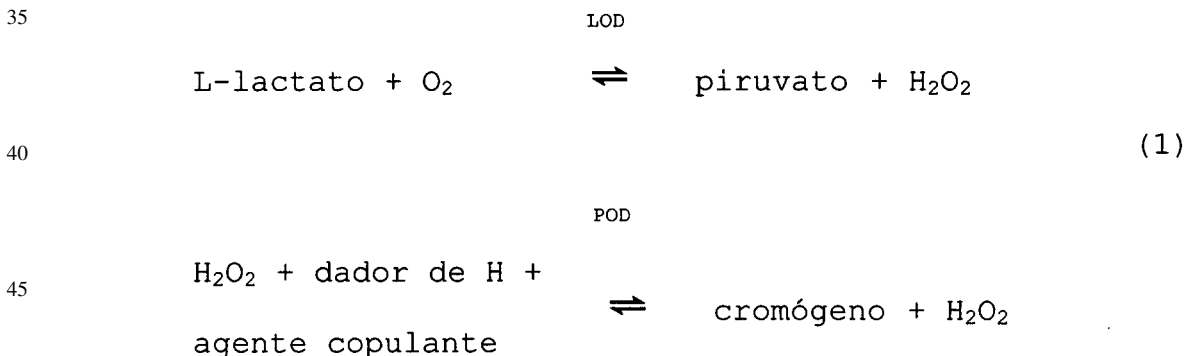
La presente invención se refiere a conjuntos de reactivos líquidos que proporcionan estabilidad de calibración en un ensayo espectrofotométrico basado en enzimas, para la medición del lactato en muestras de un paciente. La presente invención se refiere también a un método para el empleo de los reactivos líquidos.

10 **Antecedentes**

Para diagnosticar una enfermedad, un médico busca a menudo la aparición de un marcador químico en un paciente. El marcador químico es un compuesto específico que se expresa, o bien en cantidades anormalmente altas o bien en cantidades bajas durante el curso de una enfermedad. Un clínico examina el plasma de un paciente y/o el fluido cefalorraquídeo, empleando un ensayo específicamente diseñado para determinar cuantitativamente la concentración del marcador. Cuando un médico observa las anormales concentraciones del marcador, comprende que el paciente puede estar padeciendo una enfermedad asociada.

20 El L-lactato es un marcador químico que está asociado con un buen número de estados patológicos que resultan de una reducida oxigenación de los fluidos biológicos. Un shock, una neumonía y un fallo cardíaco congestivo producen niveles aumentados de L-lactato en plasma. Se observan niveles de L-lactato en el fluido cefalorraquídeo anormalmente altos, como resultado de la meningitis bacteriana, la hipocapnia y la isquemia cerebral.

25 Los científicos han desarrollado un cierto número de ensayos enzimáticos para la determinación cuantitativa del L-lactato en soluciones biológicas. El ensayo empleado más corrientemente, se basa en la conversión enzimática del lactato en piruvato (esquema 1). Ver la patente U.S. nº 4.166.763. El L-lactato se oxida a piruvato mediante la lactato oxidasa (LOD). El peróxido de hidrógeno resultante es utilizado por la peroxidasa (POD), la cual induce la copulación de un dador de hidrógeno y un agente de copulación; se forma un compuesto coloreado (cromógeno). La concentración del cromógeno se mide espectrofotométricamente. Debido a que la concentración del cromógeno, es directamente proporcional a la concentración de lactato en la solución inicial, se puede calcular la concentración del lactato observado.



50 Los ensayos clínicos de L-lactato se efectúan principalmente por técnicos en los laboratorios del hospital. Estos ensayos no se efectúan normalmente como parte de un panel de ensayos de rutina. Cuando un paciente padece una reducida oxigenación de los fluidos biológicos, existe una necesidad crítica de un diagnóstico inmediato. En consecuencia, un técnico debe ser capaz de determinar las concentraciones de L-lactato tan rápidamente y eficientemente como sea posible.

55 Existen varios pasos que un técnico debe realizar para efectuar un ensayo espectrofotométrico basado en enzimas, para el L-lactato. En primer lugar se escoge la longitud de onda adecuada para la medición espectrofotométrica del cromógeno. En segundo lugar se establece un "factor de calibración", que permite la conversión matemática de la medición espectrofotométrica del cromógeno en la concentración observada del L-lactato. Se recoge la muestra de plasma o fluido cefalorraquídeo de un paciente, y se prepara para el ensayo. Finalmente la muestra preparada se mezcla con los reactivos enzimáticos adecuados y se procede a la medición espectrofotométrica de la absorbancia de la radiación por el cromógeno.

65 El técnico establece el factor de calibración para la concentración de L-lactato, mediante la correlación de la concentración original de L-lactato en una muestra con la cantidad de radiación absorbida por el cromógeno resultante. Para establecer esta correlación hay que ser capaz de separar la absorbancia del cromógeno de la absorbancia de otros componentes en el sistema de ensayo. Este procedimiento está representado por el esquema 2.

$$\text{Factor de calibración} = \left(\begin{array}{c} \text{absorbancia} \\ \text{de la muestra} \\ \text{con una con-} \\ \text{centración} \\ \text{conocida de} \\ \text{L-lactato} \end{array} \right) \text{ menos } \left(\begin{array}{c} \text{absorbancia} \\ \text{de la muestra} \\ \text{conteniendo} \\ \text{todos los reac-} \\ \text{tivos excepto} \\ \text{el L-lactato} \end{array} \right) \quad (2)$$

El técnico combina concentraciones conocidas de los reactivos del ensayo: lactato oxidasa, peroxidasa, un dador de hidrógeno, un agente copulante, y cualquier otro elemento químico necesario para efectuar la determinación espectrofotométrica. Se retira un alícuota de la combinación del reactivo y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro. A la solución de reactivo en stock, el técnico añade una cantidad predeterminada de L-lactato y deja que la reacción enzimática que proporciona el cromógeno, tenga lugar hasta que ha terminado esencialmente. A continuación se retira un alícuota de la solución que contiene el cromógeno, y se efectúa una segunda lectura de la absorbancia sobre el espectrofotómetro. La diferencia entre las lecturas espectrofotométricas final e inicial, del técnico, es el "factor de calibración".

Un técnico puede emplear un único conjunto de reactivos durante un largo período de tiempo; 90 días no es inusual cuando el técnico refrigera los recipientes abiertos. Debido a que los reactivos no son estables, el factor de calibración debe determinarse frecuentemente durante este período de tiempo. Si se pudiera calcular el factor de calibración para un conjunto de reactivos una vez, y a continuación emplear dicho número durante cada ensayo espectrofotométrico con el conjunto de reactivos, se ahorraría una sustancial cantidad de tiempo en realizar un ensayo de L-lactato. Este ahorro de tiempo permitiría al médico una mayor rapidez y eficiencia en la interpretación de los resultados del ensayo y en emitir un diagnóstico.

La patente EP-A-0 371 513 describe una composición de un reactivo líquido de lactato en la cual, el color formado por el dador de hidrógeno es el N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS). Esta sustancia tiene un grupo hidroxilo en el radical sulfopropilo y conduce a una variación muy alta de la absorbancia durante un período de almacenamiento de 21 días. De esta forma, el reactivo de la patente EP-A-0 371 513 no conduce a un reactivo que proporciona una alta calibración y una estabilidad al almacenamiento.

Tamaoku *et al.*, (Analytica Chimica Acta vol. 136, 1982, páginas 121-127) describe el compuesto TOPS (N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina), como un dador de hidrógeno perfeccionado para la determinación espectrofotométrica del peróxido de hidrógeno, aunque solamente por razones espectrales, lo cual es igualmente válido también para el compuesto TOOS³ (ver Tamaoku *et al.*, Chem. Pharm. Bull. vol. 30(7), 1982, páginas 2492-2497). Ninguna de las referencias de Tamaoku da una insinuación para emplear el compuesto TOPS en lugar del compuesto TOOS en un reactivo líquido previsto para un ensayo espectrofotométrico del L-lactato, debido a su mayor estabilidad de calibración.

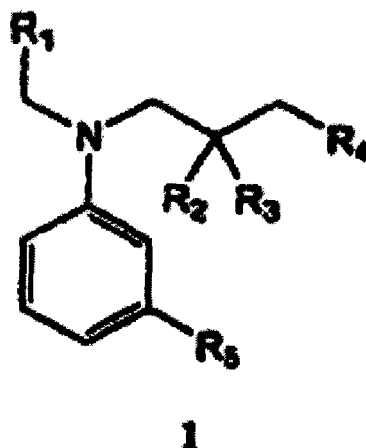
Descripción de la invención

El empleo de un factor de calibración durante un extenso período de tiempo, requiere que el factor de calibración permanezca relativamente constante. En consecuencia, los componentes del conjunto de reactivos no deben reaccionar químicamente entre sí en el marco de tiempo dado para obtener productos que absorben la radiación en la misma longitud de onda que el cromógeno.

Un conjunto de reactivos de ensayo puede estar, o bien en forma de un cartucho de fase sólida, o bien en forma líquida. Los cartuchos de fase sólida están limitados a ser empleados en instrumentos especializados diseñados para recibir los cartuchos. Los reactivos líquidos, por otra parte, pueden emplearse en una gran variedad de instrumentos generalizados. Esta versatilidad permite a los laboratorios de los hospitales, que tengan menos instrumentos y por lo tanto reduce los costes asociados a los ensayos de laboratorio. Además, cuando un reactivo está en forma líquida, el usuario no necesita reconstituirlo antes de efectuar el ensayo. Un técnico puede determinar más rápidamente la concentración del L-lactato en un fluido biológico y también eliminar los errores de mezclado asociados con la reconstitución del reactivo.

El desarrollo de un conjunto de reactivos líquido para un ensayo de L-lactato, que presenta un factor de calibración relativamente constante, satisface una importante necesidad. Proporciona un diagnóstico más eficiente de un conjunto de condiciones médicas críticas. La presente inversión proporciona un conjunto de reactivos líquido para un ensayo espectrofotométrico del L-lactato.

En una versión, el conjunto de reactivos líquido incluye una lactato oxidasa, una peroxidasa, un dador de hidrógeno de estructura 1, un agente que oxida por lo menos el 90% del ascorbato de la muestra,



un agente que oxida por lo menos el 90% de la bilirrubina de una muestra, un compuesto que copula con un dador de hidrógeno oxidado, dando por resultado la formación de un agente cromógeno en un tampón.

Los substituyentes del dador de hidrógeno 1 se definen como sigue: R_1 es hidrógeno o alquilo; R_2 y R_3 son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo o arilo, R_4 es SO_3M ó CO_2M , en donde M es hidrógeno o un catión; y R_5 es hidrógeno o alquilo. En esta versión el conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 10% durante un período de aproximadamente 20 días, cuando el conjunto de reactivos se almacena a 4°C.

En otra versión, la lactato oxidasa se aísla a partir de un microorganismo.

En otra versión, la peroxidasa se aísla a partir del rábano silvestre.

En otra versión, los substituyentes del dador de hidrógeno, se definen como sigue: R_1 es alquilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es un catión; y R_5 es alquilo.

En otra versión, el agente que previene substancialmente la interferencia del ácido ascórbico, es un agente biológico oxidante.

En otra versión, el agente que previene substancialmente la interferencia de la bilirrubina, es un agente oxidante químico.

En otra versión, el agente de copulación es la 4-aminoantipirina, o un análogo de la 4-aminoantipirina.

En otra versión, el tampón es un tampón de fosfato.

En otra versión, el conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 7% durante un período de aproximadamente 40 días.

En otra versión, el conjunto de reactivos comprende además un conservante.

En otra versión, el conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 7% durante un período de aproximadamente 40 días, y los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es sodio; y R_5 es metilo.

En otra versión, el conjunto de reactivos comprende además un conservante, y dicho conservante es la azida de sodio.

En otra versión, el conjunto de reactivos comprende además un conservante, y el conservante es la azida de sodio. En esta versión, los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es sodio; y R_5 es metilo.

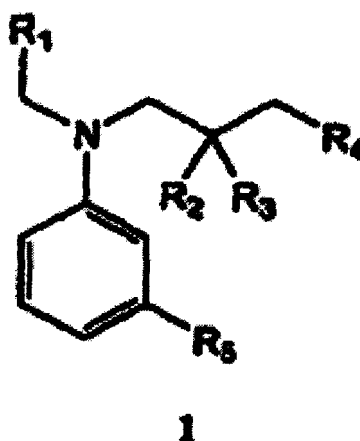
En otra versión, el conjunto de reactivos comprende un conservante, y el conservante es la azida de sodio. En esta versión, el tampón es un tampón de fosfato, y los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es sodio; y R_5 es metilo.

En otra versión, el conjunto de reactivos comprende además un conservante, y el conservante es la azida de sodio. En esta versión el tampón es un tampón de fosfato, y los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es sodio; y R_5 es metilo. Este conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 7% durante un período de aproximadamente 40 días.

En otra versión, el conjunto de reactivos comprende un conservante, y el conservante es la azida de sodio. En esta versión, el tampón es un tampón de fosfato, y los sustituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3M , en donde M es sodio; y R_5 es metilo. Este conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 5% durante un período de aproximadamente 60 días.

La presente inversión proporciona también un método para la determinación de la concentración del L-lactato en un fluido biológico.

En una versión, el método incluye los siguientes pasos: recogida de un fluido biológico a partir de un individuo; y, realización de un ensayo espectrofotométrico sobre un fluido biológico recogido de un individuo empleando un conjunto de reactivos líquido. El conjunto de reactivos líquido en esta versión incluye una lactato oxidasa, una peroxidasa, un dador de hidrógeno de estructura 1, un agente que oxida por lo menos el 90% del ascorbato de una muestra, un agente que

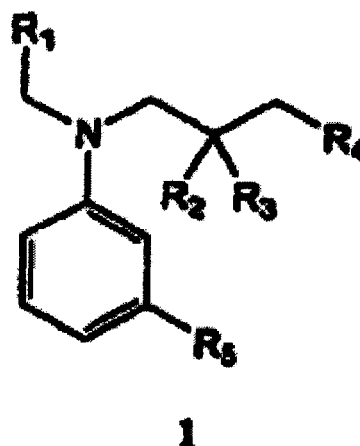


oxida por lo menos el 90% de la bilirrubina de una muestra, un compuesto que copula con un dador de hidrógeno oxidado, dando por resultado la formación de un agente cromógeno, y un tampón. Los sustituyentes del dador de hidrógeno 1 se definen como sigue: R_1 es hidrógeno o alquilo; R_2 y R_3 son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo o arilo; R_4 es SO_3M ó CO_2M , en donde M es hidrógeno o un catión; y R_5 es hidrógeno o alquilo. El conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente el 10% durante un período de aproximadamente 20 días, cuando el conjunto de reactivos se almacena a 4°C.

En otra versión, los sustituyentes del dador de hidrógeno del conjunto de reactivos líquido empleados en el método de la determinación del L-lactato, se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M , en donde M es el ión sodio; y R_5 es metilo.

La presente invención proporciona también un método para la determinación de la concentración del L-lactato en un fluido biológico, en el cual el conjunto de reactivos empleado en la determinación, incluye un conservante.

En una versión, el método incluye los siguientes pasos: recogida de un fluido biológico de un individuo; y realización de un ensayo espectrofotométrico sobre el fluido biológico empleando un conjunto de reactivos líquido. El conjunto de reactivos líquido en esta versión incluye una lactato oxidasa, una peroxidasa, un dador de hidrógeno de estructura 1, un agente que evita sustancialmente la interferencia del ácido ascórbico, un



agente que evita substancialmente la interferencia de la bilirrubina, un agente de copulación, un tampón, y un conservante. Los substituyentes sobre el dador de hidrógeno 1 se definen como sigue: R_1 es hidrógeno o alquilo; R_2 y R_3 son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo o arilo; R_4 es SO_3M ó CO_2M , en donde M es hidrógeno o un catión; y R_5 es hidrógeno o alquilo. El conjunto de reactivos tiene un factor de calibración que varía en menos del 10% durante un período de aproximadamente 20 días, cuando el conjunto de reactivos se almacena a 4°C.

En otra versión, los substituyentes del dador de hidrógeno del conjunto de reactivos líquido empleado en el método de determinación del L-lactato, se definen como sigue: R_1 es metilo; R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M , en donde M es el ión sodio; y R_5 es metilo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una estructura general para un dador de hidrógeno de la presente invención.

Mejor forma de efectuar la invención

Definiciones

“Fluido biológico” se refiere a cualquier sustancia líquida extraída de un organismo vivo. De preferencia, el fluido biológico será o bien un plasma o bien un fluido cefalorraquídeo. Con más preferencia, el fluido biológico será, o bien un plasma o bien un fluido cefalorraquídeo de un humano.

“Factor de calibración” es un número que permite que matemáticamente se convierta la medición espectrofotométrica de un cromógeno en la concentración observada de L-lactato. Se obtiene este número correlacionando una concentración conocida de L-lactato en una muestra, con la cantidad de radiación UV absorbida por el cromógeno producido por la reacción del L-lactato. Este proceso se ilustra en el esquema 2.

“Dador de hidrógeno” se refiere a un compuesto que es oxidado en una reacción química, dando por resultado la formación de un cromógeno en un ensayo espectrofotométrico. Los dadores de hidrógeno son ya conocidos en la técnica, y ejemplos de dadores de hidrógeno incluyen, aunque no están limitados a, el siguiente compuesto: sal sódica de la N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina.

“Agente copulante” se refiere a un compuesto que copula con un dador de hidrógeno oxidado, dando por resultado la formación de un cromógeno en un ensayo espectrofotométrico. Agentes copulantes son ya conocidos en la técnica, y ejemplos de agentes copulantes incluyen, aunque no están limitados a, los siguientes compuestos; 4-aminoantipirina; 4-amino-3-pirazolina-5-onas trisubstituidas, como por ejemplo la 1-(2,4,6-tricloro-fenil)-2,3-dimetil-4-amino-pirazolin-5-ona, y la 1-(3,5-di-clorofenil)-2,3-dimetil-4-amino-3-pirazolin-5-ona; y análogos de la 4-aminoantipirina, como por ejemplo la 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-3-pirazolin-5-ona. De preferencia, el agente copulante es la 4-aminoantipirina.

“Factor de calibración substancialmente estable”, se refiere a un factor de calibración que no varía en más de aproximadamente un 10% durante un período de aproximadamente 20 días. De preferencia, el factor de calibración no varía en más de aproximadamente el 7% durante un período de aproximadamente 20 días. Con más preferencia, el factor de calibración no varía en más de aproximadamente el 7% durante un período de aproximadamente 40 días. Todavía con mayor preferencia, el factor de calibración no varía en más del 5% durante un período de aproximadamente 40 días. Con la máxima preferencia, el factor de calibración no varía en más de aproximadamente el 5% durante un período de 60 días.

“Agente que previene substancialmente la interferencia del ácido ascórbico”, se refiere a un compuesto oxidante químico o biológico. La interferencia del ácido ascórbico resulta de la conversión del ácido ascórbico en ascorbato, el cual actúa para reducir un cromógeno en un ensayo espectrofotométrico. El agente químico o biológico oxida por lo menos el 90% del ascorbato a ácido ascórbico en una muestra, con lo cual previene substancialmente la interferencia. De preferencia, el agente oxida por lo menos el 95% del ascorbato a ácido ascórbico. Con más preferencia, el agente oxida por lo menos el 99% del ascorbato a ácido ascórbico.

“Agente que previene substancialmente la interferencia de la bilirrubina”, se refiere a un compuesto oxidante químico o biológico. La interferencia de la bilirrubina resulta debido a que la bilirrubina absorbe luz a las longitudes de onda corrientemente empleadas en los ensayos espectrofotométricos. El agente químico o biológico oxida por lo menos el 90% de la bilirrubina en una muestra, por lo que previene substancialmente la interferencia. De preferencia, el agente oxida por lo menos el 95% de la bilirrubina. Con mayor preferencia, el agente oxida por lo menos el 99% de la bilirrubina.

Ensayo espectrofotométrico del L-lactato, basado en enzimas

La presente invención se refiere a conjuntos de reactivos líquidos que proporcionan estabilidad de calibración en un ensayo espectrofotométrico basado en enzimas, para la medición del lactato en muestras de pacientes. Los conjuntos de reactivos para el ensayo espectrofotométrico incluyen una lactato oxidasa, una peroxidasa, un dador de hidrógeno,

un agente que previene substancialmente la interferencia del ácido ascórbico, un agente que previene substancialmente la interferencia de la bilirrubina, un agente copulante, un tampón y, opcionalmente, un conservante.

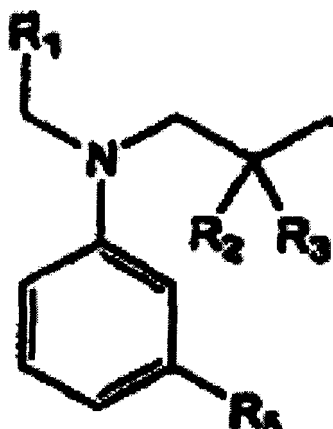
Un experto normalmente experimentado en la especialidad, comprenderá que puede emplearse cualquier lactato oxidasa que sea adecuada para el ensayo espectrofotométrico. La lactato oxidasa debe ser específica para el L-lactato, soluble, libre de catalasa y altamente estable. Un ejemplo no limitante de una lactato oxidasa que satisface estos criterios es la producida por el *Streptococcus faecalis*. Ver la patente U.S. n° 4.166.763. De preferencia, la lactato oxidasa empleada en la presente invención se aísla a partir de un microorganismo.

La lactato oxidasa está presente en el conjunto de reactivos a una concentración que oscila desde aproximadamente 2,6 U/ml a aproximadamente 17,5 U/ml. Con más preferencia la lactato oxidasa está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 10,0 U/ml hasta aproximadamente 17,5. Con mayor preferencia, la lactato oxidasa está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 12,5 U/ml hasta aproximadamente 17,5 U/ml. Con la máxima preferencia, la lactato oxidasa está presente en una concentración de aproximadamente 15,0 U/ml.

La peroxidasa empleada en la presente invención puede aislarse a partir de una variedad de fuentes. Una lista no limitante de fuentes de peroxidasa incluye el rábano silvestre, las patatas, la savia de higuera, los nabos (peroxidasa vegetal), la leche (peroxidasa láctea), corpúsculos blancos de la sangre (verdo peroxidasa) y microorganismos. Ver la patente U.S. n° 4.166.763. Ciertas peroxidasas sintéticas son también adecuadas para emplear en la presente invención. Ver Theorell *et al.*, (1950) Act Chem. Scand. 4:422-433. De preferencia, la peroxidasa se aísla a partir del rábano silvestre.

La peroxidasa está presente en el conjunto de reactivos a una concentración que oscila desde aproximadamente 2,0 U/ml hasta aproximadamente 30,0 U/ml. De preferencia, la peroxidasa está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 10 U/ml hasta aproximadamente 30,0 U/ml. Con más preferencia, la peroxidasa está presente a una concentración que oscila desde aproximadamente 20 U/ml hasta aproximadamente 30,0 U/ml. Con la máxima preferencia, la peroxidasa está presente en una concentración de aproximadamente 24 U/ml.

El dador de hidrógeno empleado en la presente invención es una anilina derivada de la siguiente estructura:



En donde R_1 es hidrógeno o alquilo; R_2 y R_3 son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo o arilo; R_4 es SO_3M ó CO_2M , en donde M es hidrógeno o un catión; y R_5 es hidrógeno o alquilo. De preferencia R_1 es alquilo, R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M ; y R_5 es alquilo. Con más preferencia R_1 es metilo, etilo o propilo; R_2 y R_3 son hidrógeno, R_4 es SO_3Na ; y R_5 es metilo, etilo o propilo. Con la máxima preferencia R_1 es metilo, R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3Na ; y R_5 es metilo (sal de sodio de la N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina). (Para la síntesis de estos compuestos, ver Tamaoku *et al.*, (1982). Anal. Chim. Acta 136: 121-127 y Tamaoku *et al.*, (1982) Chem. Pharm. Bull. 30: 2492-2497).

Un dador de hidrógeno empleado en la presente invención no reaccionará químicamente consigo mismo u otros componentes del conjunto de reactivos para proporcionar una cantidad sustancial de un producto cromogénico a aproximadamente 4°C. Se puede seleccionar un dador de hidrógeno para emplear en la presente invención, por ejemplo, midiendo la absorbancia de un conjunto particular de reactivos, el cual se almacena a aproximadamente 4°C durante un extenso período de tiempo. Por ejemplo, el día 0 se mezclan alícuotas de los reactivos A y B. Después de un tiempo de 143-190 segundos, se mide la absorbancia de la muestra a 660 nm.

TABLA 1

Conjunto de reactivos A y B

A	B
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O 0,008 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM
NaN ₃ 14,6 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM
Dador de hidrógeno 3,5 mM	NaN ₃ 14,6 mM
Ascorbato oxidasa 30 kU/L	K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3H ₂ O 0,3 mM
pH 7,80	4-AAP 5 mM
	lactato oxidasa 15 kU/L
	peroxidasa 24 kU/L
	pH 7,80

En los días 7, 14 y 21, se repite el procedimiento. Cuando el valor de la absorbancia en el día 21 es más de aproximadamente el 10% diferente del valor de la absorbancia en el día 0, el conjunto de reactivos no proporciona un factor de calibración relativamente estable; el dador de hidrógeno incluido en el conjunto de reactivos no debe seleccionarse.

Este procedimiento puede ilustrarse además a través del empleo de un cálculo de muestra. El dador de hidrógeno X está incluido en un conjunto de reactivos. En el día 0, el conjunto de reactivos proporciona una lectura de la absorbancia de 100. Las lecturas de la absorbancia para el conjunto de reactivos en los días 7, 14 y 21 son respectivamente, 104, 109 y 114. Entre el día 21 y el día 0 ha habido una variación del 14% en la lectura de la absorbancia: $(114 - 100) / 100 = 14\%$. El dador de hidrógeno X no debe ser seleccionado para emplear en la presente invención.

El dador de hidrógeno está presente en el conjunto de reactivos en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,48 g/l (1,75 mM) a aproximadamente 1,92 g/l (7 mM). De preferencia, el dador de hidrógeno está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,75 g/l hasta aproximadamente 1,5 g/l. Con más preferencia, el dador de hidrógeno está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,85 g/l hasta aproximadamente 1,25 g/l. Con más preferencia, el dador de hidrógeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,98 g/l.

El agente que previene substancialmente la interferencia del ácido ascórbico es un agente oxidante, o bien químico o bien biológico. Los agentes oxidantes químicos que previenen la interferencia del ácido ascórbico incluyen, sin limitación, el Fe(III)-HEDTA y yodato. La ascorbato oxidasa es un ejemplo de agente oxidante biológico que se emplea en la presente invención. De preferencia el agente es un agente oxidante biológico. Con más preferencia, es la ascorbato oxidasa.

El agente que previene substancialmente la interferencia del ácido ascórbico está presente en el conjunto de reactivos en una concentración que oscila desde aproximadamente 26,0 U/ml hasta aproximadamente 34,0 U/ml. De preferencia, el agente está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 28,0 U/ml hasta aproximadamente 32 U/ml. Con mayor preferencia, el agente está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 29,0 U/ml hasta aproximadamente 31,0 U/ml. Con la mayor preferencia, el agente está presente en una concentración de aproximadamente 30,0 U/ml.

El agente que previene substancialmente la interferencia de la bilirrubina es un agente oxidante o bien químico o bien biológico. La bilirrubina oxidasa es un ejemplo de un agente oxidante biológico que se emplea en la presente invención. Los agentes químicos de oxidación que previenen la interferencia de la bilirrubina, incluyen, sin ser limitante, el ferrocianuro de potasio, el ferrocianuro de sodio, el ferrocianuro de calcio, el ferrocianuro de amonio, y los compuestos que son capaces de generar ferrocianuro. De preferencia, el agente es un agente de oxidación químico. Con más preferencia es el ferrocianuro de potasio (K₄[Fe(CN)₆]).

ES 2 318 905 T3

El agente que previene substancialmente la interferencia de la bilirrubina está presente en el conjunto de reactivos en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,08 g/l a aproximadamente 0,2 g/l. De preferencia, el agente está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,09 g/l a aproximadamente 0,15 g/l. Con más preferencia, el agente está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,1 g/l hasta aproximadamente 0,14 g/l. Con la mayor preferencia, el agente está presente en una concentración de aproximadamente 0,13 g/l.

El agente copulante es un compuesto que copula con un dador de hidrógeno oxidado para proporcionar un cromógeno. Ejemplos de agentes copulantes incluyen, pero no están limitados por, los siguientes compuestos: 4-aminoantipirina; 4-amino-3-pirazolin-5-onas trisustituidas, tales como la 1-(2,4,6-triclorofenil)-2,3-dimetil-4-amino-pirazolin-5-ona y la 1-(3,5-diclorofenil)-2,3-dimetil-4-amino-3-pirazolin-5-ona; y análogos de la 4-aminoantipirina tales como la 1-fenil-2,3-dimetil-4-dimetilamino-3-pirazolin-5-ona. De preferencia, el agente copulante es la 4-aminoantipirina o un análogo de la 4-aminoantipirina. Con más preferencia, el agente copulante es la 4-aminoantipirina.

El agente copulante está presente en el conjunto de reactivos a una concentración que oscila desde aproximadamente 1,0 mM hasta aproximadamente 7,0 mM. De preferencia el agente copulante está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 2,0 mM hasta aproximadamente 6,0 mM. Con más preferencia, el agente copulante está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente 2,5 mM hasta aproximadamente 5,5 mM. Con la mayor preferencia, el agente copulante está presente en una concentración de aproximadamente 2,9 mM.

El tampón es de una capacidad tamponante adecuada para mantener un margen de pH desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,9 en el conjunto de reactivos. De preferencia, el sistema tampón conserva un margen de pH de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,9. Con más preferencia, el sistema tampón conserva un margen de pH de aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 7,9. Con la mayor preferencia, el sistema tampón conserva un margen de pH de aproximadamente 7,7 hasta 7,9.

Ejemplos no limitantes de un tampón, incluyen el fosfato, HEPES, ácido 4-morfolin propanosulfónico (MOPS), ácido 2-[tris(hidroxiometil)metilamino]-1-etano-sulfónico (TES), y TRIS. De preferencia, el tampón es un tampón de fosfato.

Los conjuntos de reactivos de la presente invención contienen opcionalmente un conservante. Ejemplos no limitantes de conservantes incluyen, la azida de sodio, el ácido hidroxibenzoico, la gentamicina, el timol y conservantes exentos de mercurio. De preferencia, el conservante es la azida de sodio.

El conservante cuando está en el conjunto de reactivos, está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 0,4%. De preferencia, el conservante está presente en un margen de concentración desde aproximadamente el 0,075% hasta aproximadamente el 0,3%. Con más preferencia, el conservante está presente en un margen de concentración desde aproximadamente el 0,085% hasta aproximadamente el 0,25%. Con la máxima preferencia el conservante está presente en una concentración que oscila desde aproximadamente el 0,09% hasta aproximadamente el 0,2%.

Un conjunto de reactivos de la presente invención que no contiene un conservante en presencia de un dador de hidrógeno, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 35°C, proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 10% durante un período de aproximadamente 20 días. De preferencia, el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 10% durante un período de aproximadamente 40 días. Con más preferencia, el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 7% durante un período de aproximadamente 40 días.

Un conjunto de reactivos de la presente invención que contenga un conservante en presencia de un dador de hidrógeno, cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 4°C, proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 10% durante un período de aproximadamente 20 días. De preferencia, el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 7% durante un período de aproximadamente 20 días. Con más preferencia, el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 7% durante un período de aproximadamente 40 días. Todavía con mayor preferencia, el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de aproximadamente un 5% durante un período de aproximadamente 40 días. Con la máxima preferencia el conjunto de reactivos proporcionará un factor de calibración que varía en menos de un 5% durante un período de aproximadamente 60 días.

Versiones preferidas

El conjunto de reactivos que consiste esencialmente en composiciones R1 y R2 es una versión preferida de la presente invención. El reactivo R1 contiene $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, azida de sodio, ascorbato oxidasa y N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina, sal de sodio, como el dador de hidrógeno. El reactivo R2 contiene $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, azida de sodio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}]$, 4-AAP, lactato oxidasa y peroxidasa.

ES 2 318 905 T3

TABLA 2

Composición del conjunto de reactivos R1 y R2

R1	R2
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O 0,008 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM
NaN ₃ 14,6 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM
TOPS 3,5 mM	NaN ₃ 14,6 mM
ascorbato oxidasa 30 kU/L	K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3H ₂ O 0,3 mM
pH 7,80	4-AAP 5 mM
	lactato oxidasa 15 kU/L
	peroxidasa 24 kU/L
	pH 7,80

El conjunto de reactivos R1 y R2 proporciona una estabilidad de calibración en un ensayo espectrofotométrico basado en enzimas, para la medición del lactato. La absorbancia del conjunto de reactivos a 660 nm se midió en los días 0, 7, 14 y 21. En el día 0, la absorbancia fue de 86. En los días 7, 14 y 21, la absorbancia fue respectivamente de 83, 83 y 83. Entre los días 21 y 0, por lo tanto, hubo una variación en la absorbancia de aproximadamente solamente el 3,5%: (86 - 83)/86.

Este resultado debe ser contrastado con un conjunto de reactivos similar, en donde el dador de hidrógeno, la N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina, sal de sodio, fue sustituida por la N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina, sal de sodio. Al igual que con el conjunto de reactivos anteriores, la absorbancia se midió en los días 0, 7, 14 y 21. La absorbancia en aquellos días fue respectivamente de 59, 105, 131 y 155. Hubo una variación en la absorbancia de aproximadamente el 163% entre los días 21 y 0: (155 - 59)/59.

En otra versión preferida, el conjunto de reactivos consiste esencialmente en los reactivos R3 y R4. El reactivo R3 contiene NaH₂PO₄ x H₂O, Na₂HPO₄ x 2H₂O, ascorbato oxidasa y N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina, sal de sodio, como dador de hidrógeno. El reactivo R4 contiene CaCl₂ x 2H₂O, NaH₂PO₄ x H₂O, Na₂HPO₄ x 2H₂O, azida de sodio, K₄[Fe(CN)₆] x 3H₂O, 4-AAP, lactato oxidasa y peroxidasa.

TABLA 3

Composición del conjunto de reactivos R3 y R4

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O 0,008 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 7,7 mM
TOPS 3,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 94,5 mM
Ascorbato oxidasa 30 kU/L	NaN ₃ 14,6 mM
pH 7,80	K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3H ₂ O 0,3 mM
	4-AAP 5 mM
	lactato oxidasa 15 kU/L
	peroxidasa 24 kU/L
	pH 7,80

ES 2 318 905 T3

El conjunto de reactivos R3 y R4 proporcionan también una estabilidad de calibración en un ensayo espectrofotométrico basado en enzimas, para la medición del lactato. Se midió la absorbancia del conjunto de reactivos R3 y R4 a 660 nm durante un período de 48 días a 35°C y se comparó con la absorbancia del conjunto de reactivos R1 y R2 en las mismas condiciones. El conjunto de reactivos R1 y R2 tuvo una variación de aproximadamente un 23% durante un período de 48 días; el conjunto de reactivos R3 y R4 tuvo una variación de aproximadamente un 7% durante un período de 48 días.

Ejemplos

Abreviaciones

LOD, lactato oxidasa; POD, peroxidasa; 4-AAP, 4-aminoantipirina; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; TOPS, N-etil-N-sulfofopropil-m-toluidina; TOOS, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfofopropil)-m-toluidina; NaN₃, azida de sodio.

General

Las mediciones de lactato se efectuaron empleando un analizador Boehringer Mannheim/Hitachi 717. La longitud de onda primaria empleada para el análisis espectrofotométrico fue 660 nm. La longitud de onda secundaria empleada para el análisis espectrofotométrico fue 700 nm. Los siguientes reactivos se obtuvieron en Boehringer Mannheim GmbH: lactato oxidasa (número ID 1 798 197); peroxidasa (número de catálogo 012 1606 102); K₄[Fe(CN)₆]x 3H₂O (número ID 0 034 592 001); ascorbato oxidasa (número de catálogo 0 199 605 102); y tampón de fosfato (número de ID 0 004 537). La azida de sodio se compró en Fairmont Chemical Company (número de catálogo 4565). La N-etil-N-sulfofopropil-m-toluidina, sal de sodio, fue adquirida en Research Organics (número de catálogo 3026 E). Otros dadores de hidrógeno fueron sintetizados de acuerdo con los métodos descritos en Tamaoku *et al.*, (1982) Anal. Chim. Acta 136:121-127 y Tamaoku *et al.*, (1982) Chem. Pharm. Bull. 30:2492-2497.

Procedimiento para la medición del lactato empleando los reactivos números R1 y R2

Una muestra de fluido biológico (3 µl), se introdujo en una cubeta a 37°C (baño María controlado), en un analizador Boehringer Mannheim/Hitachi 717. Se añadió el reactivo R1 (tabla 1, 250 µl) y se mezcló con la muestra biológica. Después de 5 minutos de incubación, se añadió el reactivo R2 (tabla 1, 50 µl) y se mezcló. La cubeta se dejó en reposo durante 140-193 segundos. Se midió la absorbancia de la muestra a 660 nm.

Preparación de 1 litro de reactivo R1

Se introdujeron aproximadamente 800 ml de agua desionizada, de alta pureza, en un recipiente de polipropileno. Se disolvieron NaH₂PO₄ x H₂O (1,06 g) y Na₂HPO₄ x 2H₂O (16,82 g), en el agua desionizada. A continuación se añadieron NaN₃ (0,95 g), TOPS (0,98 g), y 30.000 unidades de ascorbato oxidasa, a la solución y se disolvieron. La solución se agitó y el volumen se ajustó a 1,0 litros con agua desionizada, de alta pureza. El reactivo R1 se almacenó a 2-8°C.

Preparación de 1 litro de reactivo R2

Se introdujeron aproximadamente 800 ml de agua desionizada, de alta pureza, en un recipiente de polipropileno. Se disolvieron CaCl₂ x 2 H₂O (1,17 mg), NaH₂PO₄ x H₂O (1,06 g) y Na₂HPO₄ x 2H₂O (16,82 g), en el agua desionizada. A continuación se añadieron NaN₃ (0,95 g), K₄[Fe(CN)₆] x 3 H₂O (0,127 g) y 4-AAP (1,016 g), a la solución y se disolvieron. Se añadió LOD (15.000 unidades) cuidadosamente, y se disolvió. Se añadió POD (24.000 unidades) cuidadosamente y se disolvió. El volumen de la solución se ajustó a 1,0 litro con agua desionizada, de alta pureza. El reactivo R2 se almacenó a 2-8°C.

Procedimiento para la medición del lactato empleando el conjunto de reactivos R3 y R4

Una muestra de fluido biológico (3 µl), se introdujo en una cubeta a 37°C (baño María controlado), en un analizador Boehringer Mannheim/ Hitachi 717. El reactivo R3 (tabla 1, 250 µl) se añadió y se mezcló con la muestra biológica. Después de 5 minutos de incubación, se añadió el reactivo R4 (tabla 1, 50 µl) y se mezcló. La cubeta se dejó en reposo durante 140-193 segundos. Se midió la absorbancia de la muestra a 660 nm.

Preparación de 1 litro de reactivo R3

Se introdujeron aproximadamente 800 ml de agua desionizada, de alta pureza, en un recipiente de polipropileno. Se disolvieron NaH₂PO₄ x H₂O (1,06 g) y Na₂HPO₄ x 2H₂O (16,82 g), en el agua desionizada. A continuación se añadieron TOPS (0,98 g), y 30.000 unidades de ascorbato oxidasa, a la solución y se disolvieron. La solución se agitó y el volumen se ajustó a 1,0 litros con agua desionizada, de alta pureza. El reactivo R3 se almacenó a 2-8°C.

ES 2 318 905 T3

Preparación de 1 litro de reactivo R4

Se introdujeron aproximadamente 800 ml de agua desionizada, de alta pureza, en un recipiente de polipropileno. Se disolvieron $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (1,17 mg), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (1,06 g) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (16,82 g), en el agua desionizada. A continuación se añadieron NaN_3 (0,95 g), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (0,127 g) y 4-AAP (1,016 g), a la solución y se disolvieron. Se añadió LOD (15.000 unidades) cuidadosamente, y se disolvió. Se añadió POD (24.000 unidades) cuidadosamente y se disolvió. El volumen de la solución se ajustó a 1,0 litros con agua desionizada, de alta pureza. El reactivo R4 se almacenó a 2-8°C.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

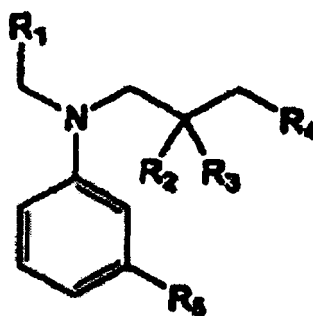
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de reactivos líquido para un ensayo espectrofotométrico del L-lactato, el cual conjunto de reactivos comprende:

- a) una lactato oxidasa;
- b) una peroxidasa,
- c) un dador de hidrógeno de estructura 1



en donde R_1 es hidrógeno o alquilo, R_2 y R_3 son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo, o arilo; R_4 es SO_3M ó CO_2M , en donde M es hidrógeno o un catión; y R_5 es hidrógeno o alquilo;

- d) un agente que oxida por lo menos un 90% del ascorbato de una muestra
- e) un agente que oxida por lo menos un 90% de la bilirrubina de una muestra
- f) un compuesto que copula con un dador de hidrógeno oxidado, dando por resultado la formación de un agente cromógeno; y
- g) un tampón,

en donde el conjunto de reactivos presenta un factor de calibración que varía en menos de un 10% durante un período de 20 días, cuando el conjunto de reactivos se almacena a aproximadamente 4°C.

2. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lactato oxidasa se aísla a partir de un microorganismo.

3. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la peroxidasa se aísla a partir de rábanos silvestres.

4. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los substituyentes del dador de hidrógeno son como sigue: R_1 es alquilo; R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M , en donde M es un catión; y R_5 es alquilo.

5. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente que oxida por lo menos un 90% del ascorbato en una muestra, es un agente oxidante biológico.

6. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente que oxida por lo menos un 90% de la bilirrubina en una muestra, es un agente oxidante químico.

7. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente copulante es la 4-aminoantipirina.

8. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tampón es un tampón de fosfato.

9. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el conjunto de reactivos presenta un factor de calibración que varía en menos del 7% durante un periodo de 40 días.

10. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo, R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M , en donde M es Na; y R_5 es metilo,

ES 2 318 905 T3

y en donde el tampón es un tampón de fosfato y en donde el conjunto de reactivos comprende además azida de sodio como conservante, y en donde el conjunto de reactivos presenta un factor de calibración que varía en menos del 5% durante un período de 60 días.

5 11. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el conjunto de reactivos comprende además un conservante.

10 12. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el conservante es la azida de sodio.

13. Un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los substituyentes del dador de hidrógeno se definen como sigue: R_1 es metilo, R_2 y R_3 son hidrógeno; R_4 es SO_3M , en donde M es Na; y R_5 es metilo, y en donde el tampón es un tampón de fosfato.

15 14. Un método para la determinación de la concentración de L-lactato en un fluido biológico, que comprende la realización sobre un fluido biológico el cual ha sido extraído de un individuo, un ensayo espectrofotométrico empleando un conjunto de reactivos líquido, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

20

25

30

35

40

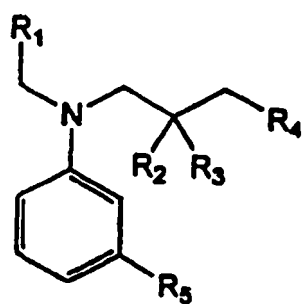
45

50

55

60

65



1