

347092

P.- 36.711

Nº 9423
MEH: 1w
Deutsch et al case
1-X-HL 2660

Memoria descriptiva



8 ENE 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de SMITH KLINE & FRENCH LABORATORIES

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 1500 Spring Garden Street, Filadelfia,
Pensilvania, Estados Unidos de América.

por: "METODO DE PREPARAR UN MATERIAL DE ENSAYO SOLIDO Y
ESTABLE PARA DISOLVER EN AGUA" (Clase Internacional
G01n).

29.12.67



El presente invento se refiere a reactivos y mezclas de reactivos útiles para detectar y medir fosfatasas alcalinas y ácidas en líquidos biológicos, tales como suero, y a métodos para ensayar líquidos biológicos utilizando estas mezclas de reactivos.

5

La sal disódica del ácido para-nitrofenilfosfórico (p-NPP) es conocida en la técnica como sustrato para esta reacción enzimática. Sin embargo, su estabilidad en forma seca es limitada, y también es más difícil de preparar que las sales aquí descritas.

10

Se ha encontrado que se ha de preferir en gran manera como reactivo estable una sal de alcoholamina del ácido para-nitrofenilfosfórico. Preferido de forma máxima a causa de su mayor solubilidad es la sal de tris(hidroximetil) amino metano de p-NPP, seguida por la sal de di(ciclohexilamonio).

15

Esta sal es muy estable y puede ser hecha disponible en forma de cantidades unitarias en recipientes o cápsulas de papel metalizado. Cada una de estas unidades contendrá justamente la cantidad suficiente del material de ensayo para realizar un único ensayo de una muestra.

20

El ensayo en cuanto a fosfatasa alcalina está plagado especialmente de dificultades para determinar los cambios de proporción. Hasta ahora, los ensayos de fosfatasa disponibles han proporcionado sólo un margen extremadamente estrecho de unidades de enzima entre los valores normales y los anormales. En el pasado, este análisis ha dado lugar a frecuentes errores en las determinaciones.

25

Se ha descubierto adicionalmente que empleando sustancias polivalentes y polímeros de sustancias poliva-

30



lentes, de con uno a cinco grupos hidroxilo por unidad monomérica, hay un acrecentamiento notable de la sensibilidad del ensayo convencional para fosfatasa, empleando una sal del p-NPP como sustrato. Este acrecentamiento de velocidad de cambio se efectúa por un factor de al menos 2 ó más, sin ningún cambio observable en la cinética de orden cero.

Compuestos representativos de las sustancias polivalentes más útiles en este invento son manitol, sorbitol, inositol, lactosa y sacarosa, prefiriéndose máximamente el primeramente citado.

Estos agentes auxiliares se muestran activos en la reacción enzimática; más aún, parece que también aumentan la estabilidad del material de sustrato. Se ha encontrado que la cantidad de agente auxiliar que ha de ser añadido puede variar dentro de un amplio margen, ya que el efecto beneficioso es aproximadamente proporcional a la cantidad de sustancia polivalente disponible en el reactivo de ensayo. Parece ser que el límite superior es la solubilidad de la sustancia particular en agua a la temperatura a la que se han de efectuar las determinaciones, generalmente aproximadamente 37°C. Se ha establecido en experimentos reales que se logran resultados apreciables a partir de una cantidad tan pequeña como unos pocos miligramos de agente auxiliar por cada mililitro de reactivo de ensayo diluido en agua que ha de ser combinado con la muestra, hasta la solubilidad conocida de esta agente auxiliar en agua. En el caso del manitol, ésta oscila entre 25 a 180 mg por ml de reactivo de ensayo diluido en agua.

Además, se pueden añadir tampones y activadores



5 metálicos apropiados al reactivo para proporcionar una mezcla reativa total. Con el fin de realizar un ensayo, se selecciona un envase que contiene los materiales de ensayo para realizar el ensayo particular. Los materiales de ensayo contenidos en el envase han sido medidos previamente y tienen una actividad previamente determinada.

10 Correspondientemente, éstos pueden ser disueltos directamente en una cantidad normalizada de agua para formar un reactivo líquido. Este reactivo líquido es mezclado entonces con la muestra biológica para producir una reacción enzimática. La extensión o la velocidad a la que se desarrolla la reacción serán una función del grado o de la cantidad de actividad de la incognita original.

15 En una realización preferida, el material de ensayo es disuelto para formar un reactivo líquido y el reactivo es mezclado con la muestra, el sustrato reaccionará con la cantidad incognita de enzima. La cantidad del sustrato contenido en el reactivo es suficiente para permitir que el sustrato sea influenciado a una velocidad constante. Como resultado, el único factor que limita la velocidad de reacción de ensayo será la cantidad o grado de actividad de la enzima incognita que ha de ser medida.

20 El sustrato penetra en la reacción y se disocia o rompe el enlace de éster. La extensión en que es convertido el sustrato está determinada por la extensión en la que avanza la reacción de ensayo. El sustrato puede ser convertido fácilmente desde ácido para-nitrofenilfosfórico en para-nitrofenol. El sustrato absorbe luz con una longitud de onda que es diferente de la del producto. Así, midiendo la densidad óptica con la longitud de onda designada, se



puede determinar la cantidad convertida del sustrato. Mas
especificamente, midiendo la cantidad de cambio o veloci-
dad de cambio de la densidad óptica a la longitud de onda
designada, se puede medir la cantidad o velocidad de la
5 reacción de ensayo. Se ha encontrado que las sales de
p-NPP son transparentes en el margen de 300 a 415 milimi-
cras, mientras que la forma convertida de (para-nitrofenol)
muestra absorción de luz en el margen de 390 a 420 milimi-
cras con un valor máximo a una longitud de onda de aproxi-
10 madamente 405 milimicras en solución alcalina. Empleando
este sustrato, se puede observar la reacción de ensayo
midiendo siempre la densidad óptica en este último margen
de longitud de onda.

Se puede obtener ácido para-nitrofenilfosfórico
15 (p-NPP) libre por cualquier procedimiento normal, tal co-
mo el paso de una sal de metal alcalino de p-NPP a través
de una resina de intercambio catiónico, por ejemplo resi-
na Dowex 50, en la forma ácida.

Generalmente, las sales de amina de los ácidos
20 para-nitrofenilfosfóricos también pueden obtenerse hacien-
do reaccionar una amina apropiada con una sal de metal
alcalino de ácido para-nitrofenilfosfórico. De esta mane-
ra, la sal de amina del ácido para-nitrofenilfosfórico pue-
de ser precipitada por concentración, o por la adición
25 de un disolvente orgánico.

Alternativamente, el ácido para-nitrofenilfos-
fórico libre es neutralizado con la amina apropiada en so-
lución, y es precipitado por la adición de un disolvente
orgánico, o es evaporado hasta que comience la cristali-
30 zación. La correspondiente sal de amina de ácido para-ni-



trofenilfosfórico es lavada, recogida y secada.

5 Las sales de amina particulares empleadas dependerán de su disponibilidad y de su aptitud para estabilizar p-NPPA bajo las condiciones de ensayo. Las sales se escogerán normalmente entre una clase que incluye aminas alifáticas, aminas alcohólicas alicíclicas, aminas hidroxialcohólicas, aminas arílicas y aminas aralcohólicas.

10 Entre las aminas alcohólicas se encuentran las monoalcohólicas, dialcohólicas y trialcohólicas, con 1 a 18, preferiblemente 1 a 6, átomos de carbono en los grupos alcohol. Ejemplos específicos son metilamina, etil amina, tributilamina y dipropilamina.

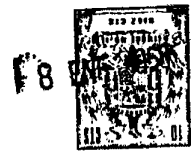
15 Entre las aminas alcohólicas alicíclicas se encuentran mono-ciclohexil amina, diciticlohexil amina, y triciclohexil amina.

20 Entre las aminas hidroxialcohólicas se encuentran las que tienen de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente 2 a 6 átomos de carbono, en dichos grupos alcohol, de las cuales son ilustrativas la monoetanolamina y el 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propano diol.

Las aminas aralcohólicas, con 5 a 15 átomos de carbono, preferiblemente 7 a 9 átomos de carbono, están ilustradas por la monobencil amina.

25 La preparación y utilización de los reactivos de este invento están ilustradas por los siguientes ejemplos.

30 EJEMPLO 1.- Preparación de para-nitrofenil fosfato de di(ciclohexil amonio).- Una solución de 12,5 g de para-nitrofenilfosfato disódico de alta pureza (procedente de CALBIOCHEM) en 50 ml de agua, fué hecha pasar a tra-



vés de una columna de 125 ml de una resina de intercambio
catiónico tal como resina Dowex 50, de 149 a 297 micras,
en la forma de ión hidrógeno. La columna fué lavada con
200 ml de agua. Al fluido saliente de la columna se añaden
5 10 g de ciclohexilamina. La solución es evaporada bajo pre-
sión reducida hasta aproximadamente 25 ml, y se añaden 400
ml de acetona. La mezcla es enfriada hasta 0°C durante 2
horas y el precipitado es recogido en un filtro, y es lava-
do con acetona. El producto es secado en vacío hasta peso
10 constante. Rendimiento: 8 g de sal de dicitclohexil amina
de ácido para-nitrofenilfosfórico.

EJEMPLO 2.- Preparación de sal de tris(hidroxi
metil)amino metano de ácido para-nitrofenilfosfórico.-

Una solución de 12,5 g de para-nitrofenil fosfato disódico
15 de alta pureza (procedente de CALBIOCHEM) en 50 ml de agua
es hecha pasar a través de una columna de 125 ml de resi-
na Dowex 50, de 149 a 297 micras en la forma de ión de hi-
drógeno. La columna es lavada con 200 ml de agua. Al flui-
do saliente de la columna se añade tris(hidroxi metil)
20 amino metano 3 molar, hasta un pH de 8,5. La solución re-
sultante fué concentrada hasta 50 ml, y se añadió una mez-
cla de 200 ml de metanol y 200 ml de acetona, con agitación
y enfriamiento. Después de 24 horas a 4°C el producto cris-
talino es recogido y secado a la temperatura ambiente en
25 vacío. El producto crudo fué recristalizado disolviendo
10 g en 30 ml de agua y añadiendo 100 ml de metanol y 100
ml de acetona. Después de enfriar durante 4 horas, el pro-
ducto fué recogido y secado a la temperatura ambiente en
alto vacío. Rendimiento: 8,5 g.

30 EJEMPLO 3.- Cuando la ciclohexilamina es sustituf-



da por las siguientes aminas en el procedimiento del Ejemplo 1, se obtienen los productos enumerados correspondientes.

	<u>Aminas</u>	<u>p-NPP estabilizado</u>
5	Metilamina	Sal de metilamina de p-NPPA
	Etilamina	Sal de etilamina de p-NPPA
	Dimetilamina	Sal de dimetilamina de p-NPPA
	Trimetilamina	Sal de trimetilamina de p-NPPA
	Monobencilamina	Sal de monobencilamina de p-NPPA
10	Furfurilamina	Sal de furfurilamina de p-NPPA
	Anilina	Sal de anilina de p-NPPA
	Dietanolamina	Sal de dietanolamina de p-NPPA
	Dimorfolina	Sal de dimorfolina de p-NPPA

15 La proporción de desprendimiento de p-nitrofenolato se conduce de acuerdo con el método de A. A. Bessey, O.H. Loury y M. J. Brock, J. Biol. Chem. 164, 321 (1946) y L.A. Bessey y R.H. Love, J. Biol. Chem. 196, 175 (1952).

COMPONENTES REACTIVOS

- 20 a) Tampón - pH 10,2.
Se disuelven 8 g de Na_2CO_3 + 2 g de NaHCO_3 + 300 mg de glutamato de magnesio en 1 litro de H_2O .
- b) Suero de control químico clínico anormal de Hyland; o Hyland Abnormal Clinical Chemistry Control Serum
- 25 c) Solución de sal de amina de PNPP, 0,03 molar cada una
- d) Sal de Na_2 de PNPP, 0,03 molar (como testigo)

CALCULOS

- 30 a) El porcentaje de concentración de una sal de amina de PNPP es igual a



$$\frac{\Delta A_{405}/\text{min. (amina)} \times 100}{\Delta A_{405}/\text{min. (Na}_2)}$$

$$\Delta A_{405}/\text{min. (Na}_2)$$

5 b) El porcentaje en peso de para-nitrofenol libre
 fué determinado disolviendo la muestra (100 mg) en
 100 ml de NaOH 0,01 normal. Si estaba presente material in-
 soluble, la solución fué filtrada. Se preparó una solución
 normalizada que correspondía a 1% de para-nitrofenol (10
 mg en 1000 ml de NaOH 0,01 normal). Se determinó la adsor-
 10 bencia o capacidad de adsorción a 405 milimicras de cada
 solución:

$$\text{Porcentaje de para-nitrofenol libre} = \frac{A_{405} \text{ para la muestra}}{A_{405} \text{ para el patrón}}$$

15

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SALES DE AMINA

Sal	Proporción	*% de para-nitrofenol libre
PNPP, disódica	100	0,04
PNPP, disódica	104	0,07
metilamina de PNPP	107	0,08
20 dimetilamina de PNPP	105	0,09
trimetilamina de PNPP	84	0,10
monoetanolamina de PNPP	98	0,05
morfolina de PNPP	86	0,12
monobencilamina de PNPP	50	0,06
25 furfurilamina de PNPP	66	0,04
anilina de PNPP	96	0,04
PNPP tris(hidroxiometil) aminometano	91	0,03
PNPP tris(hidroxiometil) aminometano (secada)	81	0,04
30 dicitclohexilamina de PNPP	104	0,04



(*) antes de la adición de suero

II) ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO O LIBERACIÓN DE PARA-NITROFENOL A PARTIR DE SALES DE PNPP BAJO DIVERSAS CONDICIONES DE AMBIENTE

5

PROCEDIMIENTO:

a) Se pesan tres muestras de 100 ml de cada sal.

b) Se coloca una muestra de cada sal de PNPP en un desecador seco; se coloca la segunda muestra en un desecador sobre solución saturada de sulfato de amonio para mantener constante la humedad; se deja la tercera muestra expuesta a las condiciones ambientes.

10

c) Se permite que todas las muestras estén expuestas de esta manera durante a lo menos 48 horas.

15

d) Se disuelve cada muestra en 5 ml de H₂O (**)
(se elimina sólido si no es completamente soluble).

e) Se introducen con pipeta 0,0 ml de muestra en una cubeta y se añaden 2,5 ml de tampón (de pH 10,2).

f) Se lee a 405 milimicras con cualquier espectrofotómetro apropiado.

20

(**) El para-nitrofenol libre se disolverá en 5 ml de H₂O

CALCULOS:

$$\text{Porcentaje de para-nitrofenol libre} = A_{405} \times 0,228$$

25

30



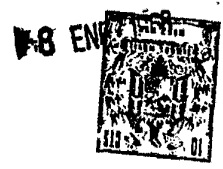
Porcentaje de para-nitrofenol libre

	<u>Sal</u>	<u>Inicial</u>	<u>Experimen to 1 condi ciones am- bientes</u>	<u>Experimen to 2, en seco</u>	<u>Experimen to 3, en húmedo</u>
5	PNPP, disódica	0,01	0,04	0,28	0,04
	PNPP, etilamina	0,009	0,07	0,07	0,07
	metilamina de PNPP	0,014	0,09	0,10	0,09
	dimetilamina de PNPP	0,006	0,07	0,11	0,20
10	trimetilamina de PNPP	0,004	0,15	0,14	0,11
	monoetanolamina de PNPP	0,007	0,05	0,04	0,05
	morfolina de PNPP	0,016	0,13	0,11	0,15
	monobencilamina de +PNPP	0,035	0,06	0,05	0,05
15	furfurilamina de +PNPP	0,01	0,04	0,04	0,04
	anilina de +PNPP	0,016	0,05	0,04	0,04
	PNPP, tris	0,005	0,02	0,02	0,02
	PNPP, tris (secado) no en- sayado		0,04,	0,04	0,04
20	ciclohexilamina de +PNPP	0,007	0,03	0,02	0,03

+ No completamente soluble

25 Se ha indicado antes que los efectos beneficio-
sos de la práctica de este invento se pueden obtener sin
cambio observable en la cinética de orden cero. Los siguien-
tes datos lo demuestran.

30 Condiciones: Gilford 2000 a 37°C a 415 milimicras
Suero: Suero de control Anormal de Hyland, Lote
número 368A16, unidades usuales de fosfa-
tasa alcalina = 11, margen aceptable =
10-12 (factor de conversión a unidades in-



t ternacionales micro-moles/minuto/litro =
16,66)

<u>Dilución de Hyland</u>	<u>Unidades teóricas</u>
1) Vial reconstituido (5 ml)	183 U.I.
2) 2,5 ml de (1) 2,5 ml. de H ₂ O	91,5 U.I.
3) 2,5 ml de (2) 2,5 ml. de H ₂ O	46 U.I.
4) 2,5 ml de (3) 2,5 ml. de H ₂ O	23 U.I.

Ensayo = 3,0 ml de H₂O + tableta de reactivo + 20λ de suero

Cálculos para 415 milimicras

101
$$\frac{\text{Unidades internacionales (U.I.)}}{\text{Litro de suero}} = \frac{A_{415} \text{ ml/min} \times \text{volumen total}}{17,7}$$

$$\times \frac{1000}{\text{ml de suero}}$$

Anormal de Hyland a 415 milimicras

Tableta D.O.	D.O. con una incubación previa de 10 minutos	D.O. a 20 minutos	$\frac{\Delta}{10'}$	D.O. a 30 minutos	$\frac{\Delta}{20'}$
1) 0,167	0,595	0,960	0,037	1,350	0,048
2) 0,168	0,380	0,600	0,022	0,795	0,021
3) 0,160	0,225	0,340	0,011	0,450	0,011
4) 0,159	0,200	0,250	0,005	0,300	0,005

Unidades internacionales

	$\frac{\Delta}{10'}$	$\frac{\Delta}{20'}$	<u>Valor medio</u>
1)	313	406	360
2)	186	177	181
3)	93	93	93
4)	42	42	42

30 EJEMPLO 5.- Procedimiento enzimático para la determinación de la fosfatasa alcalina y el efecto del manitol sobre la misma.



Solución A: Se disuelven los siguientes materiales en 100 ml de agua destilada

- 850 mg Na_2CO_3
- 205 mg NaHCO_3
- 50 mg Aspartato de magnesio
- 315 mg p-NPP, sal de di(ciclohexilamnio)

Solución B: Se disuelven 1000 mg de manitol en 10 ml de la solución A acabada de preparar.

Las soluciones A y B fueron combinadas entonces para producir 4 reactivos de ensayo tal como se describen seguidamente:

- Reactivo nº 1: 3 ml de agua destilada
- Reactivo nº 2: 3 ml de solución A + 0 ml de solución B (concentración de manitol 0 mg/ml de reactivo)
- Reactivo nº 3: 2 ml de solución A + 1 ml de solución B (concentración de manitol 33 mg/ml de reactivo)
- Reactivo nº 4: 0 ml de solución A + 3 ml de solución B (concentración de manitol 100 mg/ml de reactivo)

Los reactivos son transferidos a cubetas apropiadas.

Los reactivos anteriores son incubados previamente a 37°C durante 10 minutos; después de lo cual las indicaciones de D.O. (densidad óptica) a 415 milimicras son observadas y registradas.

La reacción enzimática es iniciada por la adición de 20 lambdas de suero anormal de Hyland (lote nº 368A15)

(*)

Las lecturas se toman 10 minutos después que se ha añadido el reactivo al suero (A_{10}) y nuevamente a los 15 minutos



(A_{15'}).

$$\text{Así, } \Delta \text{ D.O.} = \frac{A_{15'} - A_{10'}}{5 \text{ min.}}$$

Reactivo nº	A _{0'}	A _{10'}	A _{15'}	Δ/min	U.I. calculadas	% de aumento de concentración con relación al nº 2
1	--	--	--	--	--	----
2	0,051	0,480	0,645	0,033	279	----
3	0,051	0,560	0,772	0,042	355	27
4	0,051	0,652	0,932	0,056	473	70

10

(-) Este lote de suero ha sido previamente calibrado por métodos bien conocidos para determinar el número correspondiente de unidades internacionales (U.I.) como sigue:

15

Un micromol de (para-nitrofenol)/ml da un A₄₁₅ milimicras de 17,7 U.I./litro de suero = $\Delta A_{415} \text{ milimicras} \times \frac{\text{Volumen total}}{17,7} \times \frac{1000}{\text{ml de suero}}$

en que

20

$$\frac{A_{415} \text{ mp/min} = A_{415} \text{ mp a 10 min.} - A_{415} \text{ mp a 5 min.}}{5 \text{ minutos}}$$

Volúmen total = 3,0 ml

ml de suero = 0,020 ml (20 lambdas)

Se calcula U.I./litro de suero = $\Delta A_{415} \text{ mp/min.} \times \frac{3,0 \times 1000}{17,7 \times 0,020}$

Se calcula U.I./litro de suero = 8450

25

De acuerdo con este invento, se proporciona un polvo reactivo seco que contiene ácido para-nitrofenilfosfórico en forma de sal estabilizada preferiblemente en forma de una de sus sales de amina, y una sustancia polivalente, o un polímero de sustancias polivalentes. Preferiblemente, contiene un tampón de la clase que incluye sales de

30



5 metal alcalino de carbonatos, tales como carbonato disódico y carbonato de sodio e hidrógeno. También, se incluye un activador metálico, a saber una sal de magnesio, preferiblemente aspartato o glutamato de magnesio. Finalmente, se incluye una sustancia polivalente, tal como manitol, para aumentar la velocidad y la sensibilidad.

10 Generalmente, dependiendo de que se trate de una medición de fosfatasa ácida o fosfatasa alcalina, el pH es mantenido dentro del margen general entre 4 y 11, por selección apropiada de uno o más de los tampones bien conocidos en la técnica para este fin.

15 Siempre que este polvo sea mantenido seco, es muy estable y tendrá un largo período de duración en almacenamiento. Correspondientemente, puede ser dividido en cantidades unitarias para formar un reactivo líquido con agua, apropiado para realizar un único ensayo de un suero. Cada una de estas porciones puede ser envasada entonces en un envase o recipiente apropiado tal como una tableta o cápsula para subsiguiente utilización.

20 Alternativamente, una solución acuosa de la amina puede ser congelada y liofilizada, sin una formación de para-nitrofenol tan grande como en el caso de la sal de sodio.

25 La formulación del reactivo, antes de la dosificación es como sigue. Los siguientes ingredientes secos son mezclados en un mezclador Hobart, produciendo una mezcla seca apropiada para formar tabletas, o para formar cápsulas, por métodos bien conocidos en la técnica.

30

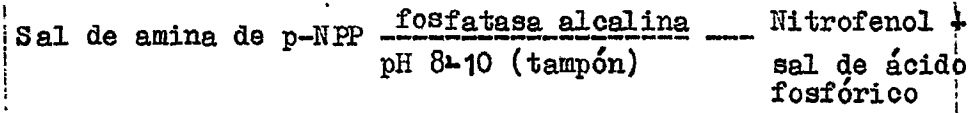


Formulación final para una tableta para fosfatasa alcalina de 3 ml utilizando PNPP-tris

<u>Cantidad</u>	<u>Ingrediente</u>
850 mg	Na ₂ CO ₃
50 mg	Aspartato de magnesio
600 mg	PNPP-tris
2830 mg	Manitol
<u>250 mg</u>	Carbowax 4000

Peso total 4580 mg/100 ml = $\frac{4.580}{33,33}$ mg = 137 mg/ de material de ensayo = tableta

Se disuelve una tableta (o cápsula que contiene los anteriores ingredientes) en 3,0 ml de agua en una cubeta óptica, dando un reactivo acuoso. Se añaden 20 lambdas de una muestra de suero que ha de ser ensayado. Tan pronto como el reactivo y la muestra son mezclados entre sí, tendrá lugar la siguiente reacción:



Se incuba a 37°C y se mide la velocidad de cambio de densidad óptica durante 10 minutos. Como esta es una reacción de proporciones la temperatura y los intervalos de medición han de ser observados cuidadosamente.

A continuación se proporcionan datos adicionales sobre los activadores ejemplares descritos, anteriormente. Empleando de nuevo un Gilford 2000 a 37°C a 415 milimicras, se mezclaron 50 lambdas de suero humano reunido con 3,0 ml. de agua, previamente inoculados con 0,5 milimoles de los activadores a ensayar, requiriéndose una muestra y una cubeta para cada activador.



Activador	mg/ml de reactivo	D.O. a 10 minutos	% de velocidad de aumento
Omitido	---	0, 118	----
Manita	91	0, 188	59
Sorbita	91	0, 214	81
Sacarosa	171	0, 142	20
Glicerina	46	0, 184	56

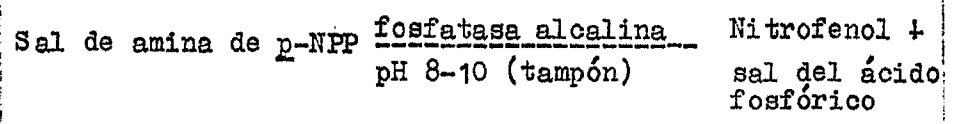
5

A fin de utilizar una de las cápsulas para hacer un ensayo del grado de actividad de la fosfatasa alcalina presente en un suero, se obtiene primero una muestra del fluido biológico tal como suero. Seguido a esto el material de ensayo en una de las cápsulas de este ejemplo se disuelve en una cantidad adecuada de agua. Esto originará un líquido reactivo que tiene la concentración adecuada de todos los reactivos para hacer un ensayo sencillo del suero. Este reactivo líquido se mezcla de esta manera con la muestra. Tan pronto como el reactivo y la muestra han sido conjuntamente mezclados, tendrá lugar la reacción siguiente:

10

15

20



25

Esta reacción es dependiente de ser catalizada por la enzima presente en el suero, y su sal se determina como se describe anteriormente.

30

Esta solicitud que corresponde a las presentadas en los Estados Unidos de América el 14 de noviembre de 1966 con el número 593.740 y el 31 de marzo de 1967 con el número 627.430, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



REIVINDICACIONES

5 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 si-
guientes:

10 1.- Método de preparar un material de ensayo sólido y estable para disolver en agua, para crear un reactivo líquido para ensayar una muestra en cuanto a las enzimas, fosfatasa ácidas o alcalinas, caracterizado por mezclar el sustrato de ácido para-nitrofenilfosfórico en la forma de una sal de amina; un tampón seco capaz de mantener el pH entre 4 y 11; y un activador metálico que comprende una sal de magnesio; estando presente cada una de las anteriores sustancias en la cantidad apropiada para asegurar una velocidad uniforme de reacción catalizada por la fosfatasa alcalina que se determina y para hacer que
15 esta velocidad sea óptima o máxima.

2.- Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se incorpora una sustancia polivalente, y polímeros de sustancias polivalentes con 1 a 5 grupos hidroxilo por unidad monomérica.

25 3.- Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha sustancia polivalente es manitol.

4.- Método de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por que dicha
30 sal de amina es tris(hidroximetil)aminometano o di(ciclo-



hexil)amina.

5.- Método de preparar un material de ensayo sólido y estable para disolver en agua.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 14 FEB 1969

P.A.

Arturo de Elzaburo
P. A. [Signature]