

371259

P.- 42.650

Green Case  
2 HL 30611



371259

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>G-01</u>
SUBCLASE <u>N</u>

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: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN MATERIAL DE ENSAYO  
- PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DESCONOCIDO DE  
ACIDO LACTICO EN UNA MUESTRA" (Clase Internacional  
G01n).

BAD ORIGINAL

47 SEP. 19

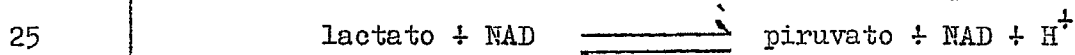


Esta invención se refiere a mezclas de reactivos útiles para detectar y medir sustancias que producen ácido láctico por acción enzimática.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una mezcla reactiva. En otros aspectos, se refiere a un procedimiento para su empleo en la determinación de ácido láctico en los flúidos y tejidos del cuerpo. En otro aspecto más, se refiere a un artículo fabricado, que comprende una nueva mezcla de reactivos, en forma unitaria herméticamente cerrado.

10 La determinación del ácido láctico en la sangre y en la orina del hombre ha ido haciéndose cada vez más importante; ya que se deriva de la glicolisis de la glucosa, y constituye un producto final en el metabolismo de los hidratos de carbono. Corrientemente se emplean tres clases o tipos de procedimientos de determinación: químico, enzimático, y por cromatografía de gases. De ellos, el método enzimático tiene las ventajas de su exactitud, alta especificidad para el ácido L-láctico en los flúidos del cuerpo, facilidad de realización en el laboratorio, alta sensibilidad, y requerimiento de equipo barato.

25 El método enzimático para la determinación del ácido láctico depende de los siguientes cambios químicos.



30 La conversión del lactato en piruvato transcurre hasta su finalización siempre que el último de estos productos sea separado y la reacción sea efectuada en disolución alcalina. En presencia de cantidades adecuadas de la enzima (LDH), el lactato es oxidado a piruvato, con

24.9.69

- 2 -

371259



27582

5 la formación de NAD reducido, que absorbe luz a una longitud de onda de 340 milimicras. La medida del grado de cambio en la absorción de luz permite el cálculo de la cantidad de lactato convertido durante la determinación, y por tanto su concentración en la muestra que se somete a ensayo.

10 Hasta ahora, el agente colector o de bloqueo del piruvato empleado más generalmente en esta determinación era la semicarbazida, en forma de su sal de clorhidrato ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-NH}_2\cdot\text{ClH}$ ).

15 Este método es adecuado para la determinación del lactato, pero requiere aproximadamente media hora para que la reacción llegue a ser completa. Hay algunas aplicaciones médicas en las que es deseable conocer lo más rápidamente posible cual es la concentración de lactato en la sangre del paciente. Además, el descubrimiento de un tiempo reducido para efectuar esta determinación representa un ahorro de tiempo para el personal de laboratorio.

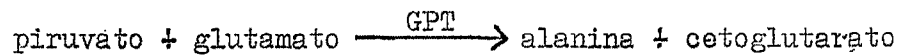
20 Se observó que aumentando la concentración de LDH y otros componentes en la secuencia de reacción antes citada no se disminuía el tiempo necesario para que la reacción fuera completa. Se dedujo, por tanto, que la velocidad de reacción de la semicarbazida el factor limitativo para conseguir determinaciones rápidas.

25 Se ha descubierto ahora en la invención que, bajo ciertas condiciones de reacción, la glutamato-piruvato transaminasa (GPT) cataliza el bloqueo del piruvato formado a partir del ácido láctico, como sigue:

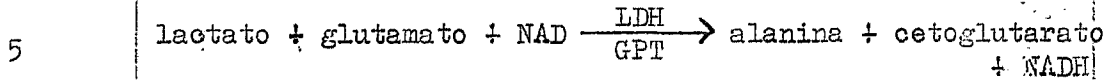
30

371259

27 SEP



Acción neta resultante:



Bajo condiciones apropiadas, que se exponen en primer lugar en la Memoria, esta reacción puede transcurrir hasta su finalización en cinco minutos.

10

Es un objeto de esta invención proporcionar un nuevo reactivo para la determinación de ácido láctico, en el que se emplea un agente colector o de bloqueo del ión de piruvato producido en la oxidación enzimática del ácido láctico presente en un fluido biológico.

15

Otro objeto de esta invención es proporcionar un reactivo para la determinación de ácido láctico basado en reacciones catalizadas enzimáticamente, en el que se emplea un agente de bloqueo de carbonilo para el que las encimas son menos susceptibles de inhibición de lo que hasta ahora ha sido posible.

20

Otro objeto más es proporcionar un método de determinación empleando un nuevo reactivodetector en el que se emplea un agente bloqueante o colector que convierte el piruvato más rápidamente que los empleados hasta ahora.

25

Otro objeto adicional es proporcionar un nuevo reactivo para la determinación de lactatos, en el que se emplea un agente colector o de bloqueo que es relativamente insensible a las condiciones de alta humedad y pH variable, para su incorporación en un reactivo estable empleado para la determinación de etanol.

30

Otro objeto más es proporcionar un artículo fa-

24.9.69

37 1259



27 SEP 1969

bricado compuesto de una nueva mezcla reactiva en una forma de ensayo unitaria herméticamente cerrada.

Del estudio de la exposición siguiente y de las reivindicaciones anexas se deducirán, para los expertos en la técnica, otros objetos y ventajas.

La velocidad de transferencia de hidrógeno es función de varios factores en la mezcla de reacción. Cuando todos los factores están presentes en proporciones óptimas, esta velocidad depende fundamentalmente de la velocidad de eliminación del piruvato. La reacción transcurre lentamente cuando se utiliza semicarbazida como agente de eliminación de piruvato. El tiempo necesario para que la reacción llegue a ser completa con semicarbazida es de 30 a 60 minutos. Se ha descubierto que la conversión de la ión de piruvato anterior catalizada por GPT daba velocidades de reacción considerablemente mayores. Por ejemplo, en una mezcla de reacción que contiene GPT y glutamato, el tiempo necesario hasta completar la reacción variaba entre tres y quince minutos, según la cantidad de piruvato presente. La ventaja de un procedimiento analítico más breve, sin pérdida de precisión, es manifiesta en las situaciones en que se requieren determinaciones frecuentes y rápidas de lactato.

La lactato deshidrogenasa (LDH) y la glutamato-piruvato transaminasa se encuentran entre las muchas enzimas inestables. Las preparaciones más estables de las enzimas cristalinas implican su suspensión en disoluciones concentradas de sulfato de amonio. Estas suspensiones no pueden ser utilizadas en el reactivo que se describe más adelante. La sequedad completa es una propiedad esencial

37 1259

27 SEP



de todos los componentes del reactivo. Por tanto, es imperativa la liofilización de las enzimas. La invención se refiere a un artículo fabricado en forma anhidra que está herméticamente cerrado para mantener la estabilidad durante su almacenamiento.

5

Como es sabido, las enzimas de este tipo son generalmente muy inestables. De hecho, hasta ahora, para mantener enzimas de este tipo en un estado estable, ha sido necesario mantenerlas en forma concentrada y a bajas temperaturas. Además, de estar concentrada, usualmente ha sido necesario también que la disolución o suspensión de enzima incluyera una proporción sustancial de una sal tal como el sulfato de amonio, para mantener una actividad óptima.

10

15

En la presente invención, para preparar el material de ensayo en forma seca, una de las operaciones del procedimiento es convertir la enzima procedente de una disolución en una forma sólida y seca, tal como un polvo, en que la enzima es muy estable. Para conseguir esto, a la disolución que contiene la enzima pueden añadirse uno o más compuestos estabilizantes. Los estabilizantes particulares añadidos a la disolución de enzima varían, en parte, con la enzima particular que ha de ser estabilizada. No obstante, para enzimas de este tipo, se selecciona al menos un estabilizante de uno o más de los grupos siguientes. Se ha comprobado que, bajo ciertas circunstancias, es ventajoso emplear una combinación de estabilizantes que puede comprender un estabilizante de entre varios de los grupos siguientes, o incluso un estabilizante de cada grupo.

20

25

30

Grupo I.- Gomas mucilaginosas o polisacáridos,

37 1259

24.9.69



tales como la goma arábica, goma de carragenina, tragacantina, ácido algínico y sustancias pectínicas. Se ha comprobado que la goma arábica es particularmente adecuada para este propósito. Además de las gomas, o como alternativa a las mismas, el estabilizante puede comprender otros polímeros que contienen grupos hidroxílicos u otros grupos sustitutivos hidrófilos que hacen al polímero resultante esencialmente soluble en agua, tales como la polivinil pirrolidina, el carbowax (glicoles de polietileno sólidos) y el poli(alcohol vinílico). Esto asegura también que todo el material de ensayo se disuelve rápidamente en el agua al ser preparado el reactivo. No obstante, es posible emplear también cualquier otro polímero que por sus largas cadenas o su sustituyente hidrófilo es sólo parcialmente soluble en agua, pero que se equilibra con la fase acuosa, tal como las resinas de cambio de iones, celulosa cambiadora de iones, carboximetilcelulosa.

Grupo II.- Un tampón que consta de una hidroxialcohilamina, que incluye las aminas primarias tales como el tris(hidroximetil)aminometano, o una amina terciaria tal como la trietanolamina, pero no se limita a éstas.

Grupo III.- Un agente inhibidor o formador de complejos, tal como el ácido etileno diamino tetraacético o una de sus sales, que ha demostrado ser particularmente adecuado.

Grupo IV.- Una proteína soluble inerte, tal como la albúmina de suero bovino.

Grupo V.- Sales de un anión polivalente, tal como el sulfato de amonio, o el tartrato de potasio y sodio, que han demostrado ser particularmente adecuados.

371259

275



Una vez que uno o más de los estabilizantes de las clases descritas anteriormente ha sido disuelto completamente o dispersado uniformemente en toda la mezcla, la enzima o enzimas en disolución son muy estables. Se ha comprobado que añadiendo estos estabilizantes a la disolución, la actividad de las enzimas es aumentada frecuentemente. Se cree que esto es el resultado de la eliminación de ciertos inhibidores que están presentes usualmente con las enzimas. En el caso de que se desee disminuir la actividad de la disolución, ésta puede ser diluida añadiendo agua. Contrariamente, si se desea concentrar o aumentar la cantidad de actividad de esta disolución de enzimas, puede ser eliminada una parte del líquido. Preferiblemente, el líquido es eliminado por evaporación, manteniendo la disolución al mismo tiempo a una temperatura relativamente baja. Puede verse pues que en este punto se proporciona una disolución de enzimas muy estable, y que la estabilidad de la disolución es independiente de la concentración de la enzima o de las sales que hay en la misma, y muestra esta estabilidad en un intervalo más amplio de temperaturas.

Un objeto global es proporcionar un material de ensayo o determinación integral, que es seco, estable, enzimático, unido por piridina nucleótido, y de resultados uniformes bajo condiciones variables climáticas y de almacenamiento.

La disolución de enzimas estabilizada anteriormente descrita puede ser empleada para numerosos fines en forma de una disolución. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, tales como la preparación del material de ensayo

371259

24.9.69



279

o determinación de la presente invención, puede ser deseable convertir la disolución en una mezcla o polvo que contiene la enzima. Esto puede conseguirse liofilizando la disolución, o secándola por congelación. Más particularmente, la totalidad de la disolución es congelada para proporcionar una masa sólida, y es colocada bajo vacío. El vacío es de magnitud suficiente para hacer que el líquido congelado sublime. La masa congelada es mantenida bajo este vacío durante un tiempo suficiente para asegurar que es eliminada toda el agua presente y otros materiales volátiles en estas condiciones. Con ello quedará un residuo sólido que contiene la enzima o enzimas en relación o mezcla íntima con los estabilizantes, tales como la gome arábiga, etc. Estos estabilizantes son efectivos para proteger la actividad de la enzima durante un prolongado período de tiempo, aun cuando la enzima está en forma de un sólido.

El término "estabilizante", tal como se utiliza en la Memoria, se refiere en líneas generales a una sustancia que evita el cambio o destrucción de un componente reactivo. Tiene tres aspectos fundamentales en la presente invención: 1) permitir un manejo conveniente de los componentes durante su fabricación; 2) permitir la preparación y almacenamiento de un componente en forma seca; y 3) dar una larga duración de almacenamiento al producto acabado.

El residuo se encuentra normalmente en un estado escamoso o fofo. No obstante, si se desea, el residuo puede ser molido hasta ser reducido a una mezcla en polvo fino. La molienda puede ser efectuada por cualquier medio



27 SEP 1969

5 adecuado, por ejemplo por medio de un molino de bolas. El  
 hecho de que la mezcla en polvo está sustancialmente seca  
 contribuye a la estabilidad física de la mezcla, y elimi-  
 na sustancialmente la tendencia a aglomerarse o formar te-  
 rrones, etc. Como la mezcla puede ser mantenida en forma  
 de polvo suelto, es fácil de manejar y tratar. Asimismo,  
 puede ser medida fácilmente, tanto volumétrica como gravi-  
 métricamente. En este punto, se proporciona un polvo que  
 comprende una o más enzimas en una forma muy estable. Co-  
 10 mo el polvo no comprende forma alguna de sustrato, puede  
 emplearse como una enzima para cualquier fin deseado. El  
 polvo de enzima puede ser empleado, por ejemplo, entre o-  
 tras cosas, para completar la preparación del material de  
 ensayo de la presente invención.

15 Con el fin de completar la preparación del mate-  
 rial de ensayo o determinación, los demás componentes, ta-  
 les como los tampones, sustratos, coenzimas, y agentes  
 estabilizantes de carga, pueden ser preparados para su  
 mezclado con las enzimas estabilizadas. Uno de los fines  
 20 fundamentales de los materiales tamponadores es mantener  
 las condiciones adecuadas para que la reacción de determi-  
 nación transcurra a una velocidad óptima. Cuando el mate-  
 rial de ensayo es disuelto en agua, los tampones son, en-  
 tre otras cosas, efectivos para mantener el pH del reacti-  
 25 vo líquido. Además, cuando el reactivo líquido es a su  
 vez mezclado con una muestra que contiene la sustancia  
 desconocida, el pH de la mezcla de muestra resultante es  
 aún adecuado para que tenga lugar la reacción de determi-  
 nación.

30 El material tamponador particular que se emplea

371259

27 SEP



5 en cualquier material particular de ensayo depende de la  
reacción particular de determinación o evaluación que ha  
de ser efectuada y de los demás componentes existentes en  
el material de ensayo. Normalmente, sin embargo, son de  
la clase que comprende las sales de aniones inorgánicos po-  
livalentes y aminas orgánicas, juntamente con sus ácidos  
y sus sales. Como ejemplo, las sales de aniones inorgáni-  
cos polivalentes pueden comprender al menos fosfatos de  
sodio y de potasio y pirofosfatos de sodio y de potasio.  
10 Como ejemplo también, las aminas y ácidos orgánicos, y sus  
sales, pueden comprender al menos el tris(hidroximetil)ami-  
nometano y el imidazol (y sus sales, tales como el clorhi-  
drato, succinato, sulfato), los ácidos succínico, aspártico  
y glutámico (y sus sales, tales como de sodio, potasio y  
15 de litio), la glicilglicina y la glicina. Se prefieren  
los hidróxidos de metales alcalinos para proporciona el pH  
fuertemente básico deseado.

Los materiales tamponadores pueden ser preparados  
en forma de un polvo seco que es mezclado directamente con  
20 el polvo liofilizado que contiene la enzima y el estabili-  
zante. El polvo resultante contendrá las enzimas requeri-  
das para la reacción de determinación. Gracias a los es-  
tabilizantes y los tampones presentes en el polvo, las en-  
zimas serán muy estables. Este polvo resultante, igual  
25 que el polvo de enzima descrito en primer lugar, no será  
higroscópico, contrariamente a las mezclas correspondien-  
tes preparadas por liofilización de las disoluciones com-  
binadas de tampón y enzima.

30 Cuando el material de ensayo es disuelto para  
formar un reactivo líquido, y el reactivo es mezclado con

371259



la muestra, el sustrato reacciona con la sustancia desco-  
nocida. Sin embargo, para que la reacción transcurra de-  
bidamente, es necesario que la enzima catalice la reacción.  
La cantidad de sustrato y el grado de actividad de la enzi-  
ma contenidos en el reactivo están en exceso con respecto  
5 al requerido para hacer que reaccione por completo toda  
la sustancia desconocida. Como resultado, el único factor  
que limita la reacción de determinación, es la cantidad o  
grado de actividad de la sustancia desconocida.

10 La coenzima NAD forma parte de la reacción, y  
es convertida de una en otra forma. El grado en que esta  
coenzima es convertida está determinado por el grado en que  
progresa la reacción de determinación. La coenzima puede  
ser convertida fácilmente de una forma (tal como la oxida-  
15 da) en otra forma (tal como la reducida). Además, la co-  
enzima tiene una absorción de luz a cierta longitud de on-  
da particular, sólo cuando se encuentra en una de estas  
formas. Cuando se encuentra en la otra forma, es transpa-  
rente a la longitud de onda indicada, aunque la banda de  
20 absorción puede ser de cualquier longitud de onda deseada  
que sea conveniente emplear. No obstante, es deseable que  
se distinga netamente de las bandas intensas de absorción  
del resto de los componentes del material de ensayo y de  
las sustancias que hay en la muestra. Esto asegura que  
25 todas las sustancias existentes en el reactivo y en la  
muestra, excepto la coenzima, son transparentes o sustan-  
cialmente transparentes, aunque alguno de los varios com-  
ponentes puede absorber cantidades limitadas de luz en la región  
de la longitud de onda seleccionada, y no variarán durante  
30 el período de la determinación, con lo que la única variable

24.9.69

- 12 -

371259



será la coenzima es la forma absorbente. Así pues, midien-  
do la densidad óptica a la longitud de onda seleccionada,  
puede determinarse la proporción de coenzima convertida.  
Más específicamente, midiendo el grado de cambio de la den-  
sidad óptica a la longitud de onda seleccionada, puede me-  
dirse el grado o velocidad de la reacción de determinación  
Se ha comprobado que la NAD es particularmente adecuada  
para este fin. Cuando se encuentra en su forma reducida,  
muestra una absorción de luz ultravioleta, con un valor  
máximo a un longitud de onda de aproximadamente 340 mili-  
micras.

Las coenzimas de esta clase tienen un grado li-  
mitado de estabilidad en forma sólida. Pueden almacenarse  
en forma sólida sólo durante períodos cortos de tiempo.  
La estabilidad de la coenzima puede ser aumentada prepa-  
rando un polvo liofilizado de la coenzima y goma arábiga.  
Pueden conseguirse aumentos adicionales de la estabilidad  
de la coenzima mezclándola con manita. Por consiguiente,  
la coenzima puede ser molida hasta formar un polvo, y mez-  
clada directamente con el polvo liofilizado que contiene  
la enzima, estabilizante y el tampón.

Hasta ahora, los sustratos, las enzimas y coen-  
zimas, y los tampones, han sido disueltos en la disolución  
que contiene la enzima antes de su liofilización. Después  
puede ser liofilizada la disolución completa para obtener  
un residuo seco que contiene todos los componentes del  
ensayo o determinación. No obstante, se ha comprobado en  
la práctica, que el material de ensayo resultante es fre-  
cuentemente higroscópico. Como consecuencia, el residuo  
tiende a veces a absorber cantidades variables, impredecí-

27 SEP 1969



bles, de humedad. Como resultado, cuando es preparada de esta manera, es deseable que la mezcla resultante sea introducida en un recipiente que luego es cerrado herméticamente. Sin embargo, incluso estando herméticamente encerrada, la mezcla puede ser aún inestable y tiende a formar manchas coloreadas debidas a descomposiciones locales, y en un tiempo bastante corto se descompone por completo o pierde su actividad. Se ha comprobado también que la mezcla tiende a transformarse en terrones, lo que hace difícil manejarla y medir pequeñas unidades de cantidades idénticas, en volumen o en peso.

Uno de los principios de la invención es que preparando los varios componentes de la determinación, tales como los sustratos y coenzimas, en un estado seco o sólido y en forma estabilizada, antes de mezclarlos con la enzima estabilizada liofilizada, se proporciona un material de ensayo mucho más estable y de fácil manejo.

Además de los componentes anteriores, se ha comprobado también que es deseable añadir a la mezcla un agente estabilizante de carga. Este agente puede ser una sustancia polihidroxiada, tal como manita, sorbita, lactosa, poli(alcohol vinílico) o polímeros que tienen de 1 a 5 grupos hidroxílicos por unidad monomérica. El agente de carga no es activo en la reacción de ensayo o determinación. Por consiguiente, la cantidad del agente de carga añadido al material de ensayo no es crítica, y puede ser variada en un amplio intervalo. No obstante, el agente de carga lleva a cabo varias funciones útiles e inesperadas. En primer lugar, el agente de carga tiende a aumentar más la estabilidad del material de ensayo por varias razones.

371259

24.9.69

27 SEP



Estos agentes tienen capacidad para absorber y retener cantidades limitadas de humedad, con lo que el material de ensayo no es afectado prácticamente cuando es expuesto a cantidades razonables de humedad. Esto aumenta la estabilidad del material de ensayo y evita que pierda su actividad. Se ha comprobado que el agente de carga es efectivo para proteger el material de ensayo aumentando la compatibilidad entre sus componentes. También se ha comprobado que los agentes de carga de esta clase son efectivos también para aumentar la capacidad del material de ensayo para resistir temperaturas relativamente altas, tales como 50°C, durante períodos de tiempo mayores. Hasta ahora, las temperaturas en este intervalo causaban un rápido deterioro de las enzimas, coenzimas, y otros componentes.

En segundo lugar, se ha comprobado que el empleo del agente de carga en el material de ensayo hace que éste se disuelva más rápidamente en agua. Esto, no sólo reduce el tiempo necesario para preparar el reactivo líquido sino que también aumenta la conveniencia de la preparación reduciendo el grado de agitación o vibración.

En tercer lugar, como el agente de carga no participa en la reacción ni afecta a los componentes del material de ensayo, la cantidad del agente de carga añadida al material de ensayo puede ser variada en un amplio intervalo. Una vez que ha sido preparado un lote de material de ensayo, puede ser determinada su intensidad o grado de actividad. El agente de carga puede ser añadido después para normalizar el material de ensayo a un nivel predeterminado. Esto hace que el material de ensayo siempre tenga un grado determinado previamente de actividad por unidad, independientemente del lote en que es preparado. De los agentes indicados anteriormente, se prefiere la manita.

24.9.69

- 15 -

371259



Una vez que el material de ensayo tiene añadido el agente de carga, puede ser distribuido en unidades de un tamaño estándar predeterminado. El tamaño o cantidad es normalmente lo bastante grande para efectuar una sola determinación o un número entero de determinaciones. Cada una de estas unidades puede ser envasada después de un recipiente, tal como una cápsula, una ampolla de vidrio, etc.

Así pues, se observa que pueden proporcionarse varios envases sustancialmente idénticos, tales como tabletas o cápsulas envueltas en una hoja metalizada. Cada una de estas tabletas contiene la cantidad justa suficiente del material de ensayo para efectuar una sola determinación de una muestra. A fin de efectuar una determinación, es seleccionado un envase que contiene el material de ensayo para efectuar la determinación particular. El material de ensayo contenido en el envase es siempre medido previamente y tiene una actividad previamente determinada. Por consiguiente, puede ser disuelto directamente en una cantidad estándar de agua, para formar un reactivo líquido. Este reactivo líquido es mezclado después con la muestra para producir una reacción enzimática. El grado de esta reacción es función de la cantidad de sustancia original desconocida. Por lo tanto, la densidad óptica de la muestra a esa longitud de onda variará en función de la sustancia desconocida. Así pues, midiendo la densidad óptica del medio en tiempos diferentes, es posible calcular la cantidad de sustancia desconocida a detener en la muestra original.

La invención que se desea patentar en una prime-

371259



ra realización de un procedimiento de fabricación, se describe como basada en la idea de preparar un reactivo de ensayo o determinación, útil, entre otras cosas, como auxiliar en el diagnóstico clínico de estados patológicos para determinar la presencia, o la cantidad, de ácido láctico en una muestra biológica, mezclando con la misma un reactivo catalítico liofilizado y estabilizado en forma de partículas sustancialmente anhidras, que incluye la combinación del agente de separación, ácido glutámico o una sal del mismo de metal alcalino, las enzimas secas lactato deshidrogenasa y glutamato-piruvato transaminasa, al menos un estabilizante seco de la clase que comprende las gomas mucilaginosas, hidroxialcohilaminas, ácido etilendiamintetraacético y sus sales, una proteína soluble inerte y un anión sulfato, una coenzima seca que consta de nicotinamida adenina dinucleótico (NAD), un tampón seco de la clase que comprende las sales de fosfatos, ácidos orgánicos y aminas, y las sales de dichos ácidos y aminas, y al menos un agente seco estabilizante de carga de una clase que comprende sustancias polihidroxiladas y polímeros de dichas sustancias polihidroxiladas con de 1 a 5 grupos de hidroxilo por unidad monomérica, procedimiento que implica determinar la densidad óptica del reactivo sólido después de formar un reactivo líquido a partir del mismo, y determinarla de nuevo después de un período predeterminado de incubación una vez mezclado con la muestra.

La invención que se desea patentar en un primer aspecto como composición, se describe como basada en la idea de un reactivo sólido sustancialmente anhidro, útil, entre otras cosas, como auxiliar en el diagnóstico clínico

27 SEP.



de estados patológicos, para determinar la presencia, o la cantidad o el grado de actividad, de ácido láctico en una muestra biológica, mezclando con la misma un reactivo catalítico liofilizado y estabilizado, que está en forma de partículas y sustancialmente anhidra, que comprende la combinación de: el agente separador, ácido glutámico o una sal del mismo de metal alcalino, las enzimas secas lactato deshidrogenasa y glutamato-piruvato transaminasa, al menos un estabilizante seco de la clase que comprende las gomas mucilaginosas, hidroxialcohilaminas, ácido etilendiamintetraacético y sus sales, una proteína soluble inerte y un anión sulfato, una coenzima seca que consta de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), un tampón seco de la clase que comprende las sales de fosfatos, ácidos y aminas orgánicos, y las sales de dichos ácidos y aminas, al menos un agente estabilizante de carga seco de una clase que comprende sustancias polihidroxiladas con 1 a 5 grupos de hidroxilo por unidad monomérica.

Cada una de las sustancias anteriores está presente en una cantidad tal que asegura una velocidad de reacción catalizada por la sustancia desconocida que es determinada, para hacer que la reacción llegue a ser completa.

#### EJEMPLO

Este nuevo reactivo, una vez preparado de modo completo, consta de la mezcla seca de las sustancias siguientes:

371259

24.9.69

27 SEP



	Enzimas:	Lactato deshidrogenasa (LDH), glutamato-piruvato transamina- sa (GPT)
	Tampón:	Glicina, carbonato de potasio, hidroxido de potasio (KOH)
5	Estabilizante:	Tris-(hidroximetil)-aminometano y su sal de sulfato, sulfato de amonio, ácido etilendiamintetra- acético, goma arábica y albúmina.
	Agente colector o bloqueante:	Glutamato de potasio
10	Coenzima:	Nicotinamida adenina dinucleó- tido (NAD)
	Agente de carga:	Manita

15 Con el fin de preparar un gran número de unida-  
des de este material de ensayo se produce un lote de un ma-  
terial o reactivo de ensayo seco, que después puede ser  
dividido en pequeñas cantidades y envasado en recipientes  
tales como cápsulas. Cualesquiera que sean las cantidades  
especificadas, son adecuadas para preparar un lote que pro-  
duzca aproximadamente 10.000 cápsulas. No obstante, ha de  
20 entenderse que estos valores pueden ser variados si se de-  
sea producir lotes mayores o menores.

25 La primera operación del procedimiento es prepa-  
rar una disolución estabilizante de tris-EDTA. Esto puede  
efectuarse mezclando las sustancias químicas en aproxima-  
mente las cantidades indicadas:

tris(hidroximetil)aminometano	.500-1,000 g.
sulfato de amonio	250-500 g.
sal tetrasódica de ácido etilen- diamintetraacético	150-300 g.

371259



Para mezclar estas sustancias químicas, el tris (hidroximetil)aminometano es disuelto en un volumen de agua algo inferior a 1 litro, para formar una primera disolución. Si es necesario ayudar de alguna manera a esta disolución, la disolución puede ser calentada en un baño de agua. Una vez completamente disuelto el tris (trishidroximetil aminometano), la disolución se deja enfriar hasta aproximadamente 25°C, y se ajusta su pH a aproximadamente 7,5. Este ajuste puede ser efectuado añadiendo ácido sulfúrico en las cantidades necesarias para convertir parte del tris(hidroximetil)aminometano en su sal de sulfato. Una vez que el pH de la disolución ha sido llevado a un valor de 7,5, se añade agua suficiente para que el volumen total llegue a 1 litro.

Después, es preparada una segunda disolución disolviendo el sulfato de amonio en 850 a 900 ml. de agua. El pH de esta disolución es ajustado a 7,5 por adición de hidróxido de amonio. La primera y segunda disoluciones pueden ser mezcladas después entre sí, para formar una disolución resultante. La sal tetrasódica del ácido etilendiamintetraacético puede ser añadida después a la disolución resultante, y disuelto en la misma para formar una disolución tampón, que a veces será denominada más adelante tampón tris-EDTA.

Después es preparado un polvo seco y liofilizado que contiene las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y la GPT. No obstante, antes de que pueda ser preparado este polvo, es necesario determinar primero el grado de actividad en la LDH y la GPT que han de añadirse.

Para asegurarse de que las cápsulas producidas a

24.9.69

- 20 -

371259

27 SEP.



partir de lotes sucesivos son de actividad idéntica, la actividad de la LDH ha de normalizarse a un valor prede-terminado. Como ejemplo, en un lote de 10.000 tabletas, puede haber aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades internacionales de enzima para el lote entero, o sea aproximadamente 100 unidades por cada tableta acabada. La determinación puede llevarse a cabo empleando los siguientes compuestos químicos en aproximadamente las proporciones indicadas:

	tampón de fosfato, 0,1 M, pH 7,5	1,75 ml.
10	piruvato de sodio (3,3 mg/10 ml de tampón de fosfato : reactivo 1)	1,00 ml.
	disolución de NAD, 2,5 mg/ml. de disolución al 1% de $\text{CO}_3\text{HNa}$	0,15 ml.

Para comenzar la determinación, la enzima lactato deshidrogenasa es diluída a una parte por 10.000 mezclándola con el tampón de fosfato. Una pequeña cantidad de la enzima diluída, por ej, 0,1 ml., es mezclada con una cantidad adecuada de la disolución tamponadora que contiene el piruvato y DPNH. Después es medida la densidad óptica de la mezcla, a temperatura constante, tal como 32°C, y a intervalos adecuados, tales como de un minuto, durante un período prolongado de tiempo, como por ejemplo diez minutos. Determinando la velocidad media del cambio por minuto de la densidad óptica y multiplicándola por 10 (si se utiliza 0,1 ml.), pueden determinarse las unidades de enzima por mililitro de la enzima diluída. Después, dividiendo por el número de miligramos de enzima por mililitro, se puede calcular el número de unidades de enzima por miligramo. A partir de este dato, puede calcularse el número de miligramos de enzima requeridos para producir

371259



las unidades necesarias. De modo similar se hace el cálculo con la enzima GPT.

5 En un lote típico de fabricación de 10.000 tabletas, hay aproximadamente  $65 \times 10^3$  unidades internacionales de enzima de GPT para todo el lote, o sea aproximadamente 6,5 unidades por tableta acabada. La determinación preliminar puede hacerse empleando una determinación con mezcla reactiva para la SGPT. Se dispone en el comercio de tabletas reactivas "Eskalab" para la determinación de SGPT, vendidas por la Smith Kline Instrument Company. La composición de este reactivo de ensayo es expuesta en la solicitud, también en tramitación, de nº de serie 561.757, presentada el 30 de junio de 1966, y particularmente en las páginas 38 a 45 de la misma.

15 Para comenzar la determinación de la SGPT, la enzima es diluída a una parte por 1.000 con un tampón de fosfato (0,1 M, pH 7,5). El procedimiento seguido después es el descrito en el envase de la tableta reactiva de marca de fábrica "Eskalab", antes citada.

20 Después de ésto, es preparado el polvo seco y liofilizado que contiene la LDH y la GPT, mezclando los siguientes compuestos:

25	lactato-deshidrogenasa (la proporción exacta es determinada por el ensayo anterior)	4-5 g.
	glutamato-piruvato transaminasa	2-3 g.
	goma arábica, polvo blanco (Farmacopea de los EE.UU.)	2-6 g.
	Albúmina	50-500 mg.
	disolución de tris-EDTA	10-30 ml.
	sulfato de amonio	15-40 g.

24.9.69

371259

27 SEP. 1969



5 Estos productos químicos pueden ser mezclados como sigue. Primero se disuelve la goma arábica en una cantidad conveniente de agua destilada, por ejemplo, 80 a 160 mililitros. La albúmina es disuelta después en una segunda cantidad de agua (por ejemplo, 10 mililitros). Una vez completamente disuelta, se mezclan las dos disoluciones. A la disolución es añadida después la Tris-EDTA preparada al comienzo. La disolución es colocada ahora bajo un vacío durante un período de tiempo que asegura que es eliminado todo el aire ocluido en la disolución. Después es añadida a la disolución la cantidad de las enzimas. La disolución resultante es completamente mezclada después para asegurar una dispersión uniforme de las enzimas en toda la masa de la disolución. Después, la disolución es congelada y es aplicado un vacío para separar todo el agua. 10 La muestra liofilizada resultante se encuentra ahora en un estado sólido seco, en una cantidad en el intervalo general de 20 a 25 gramos. Esta mezcla puede ser mezclada después con cristales secos de sulfato de amonio. La mezcla 15 seca de sólidos puede pulverizada después hasta formar un polvo fino, por cualquier medio, por ejemplo colocándola en un molino de bolas durante varias horas. 20

Una vez que el polvo está completamente mezclado y pulverizado en grado suficiente, puede hacerse un ensayo 25 con la mezcla para determinar las unidades de actividad de las enzimas LDH y GPT en cada miligramo del polvo liofilizado. La operación siguiente es distribuir en tabletas el polvo liofilizado. Sin embargo, si se desea demostrar esta operación, el polvo liofilizado puede ser almacenado 30 durante períodos de tiempo prolongados en un lugar

24.9.69

- 23 - 371259

27 SEP



frío, tal como un refrigerador o congelador. Si se hace esto último, es deseable incluir un agente desecante cerca del polvo, para evitar la absorción de cualquier humedad.

5

Para preparar las tabletas, se mezclan los ingredientes siguientes. Normalmente, las cantidades se encuentran en aproximadamente los intervalos indicados:

- |    |   |   |
|----|---|---|
|    | 1. carbonato de sodio (hasta dar un pH de 8-10,5) | 300-900 g.                                      |
| 10 | 2. glicina  | 350-1050 g.                                     |
|    | 3. glutamato de potasio                           | 40 g. $\pm$ 10%                                 |
|    | 4. NAD  | 20-40 g.  |
|    | 5. lactato deshidrogenasa, liofilizada            | la cantidad determinada por el ensayo siguiente |
| 15 | 6. glutamato-piruvato transaminasa                | "   |

15

20

25

30

Los dos primeros componentes de la lista anterior son primero molidos conjuntamente para formar una mezcla seca. La mezcla es colocada después bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 50°C durante un número de horas suficiente para asegurar que es eliminada toda la humedad. Además, puede incluirse en la estufa un material desecante, tal como pentóxido de fósforo, para asegurar un secado completo. Después de la operación de secado anterior, la sal de glutamato y la NAD son añadidas a la mezcla formada por los dos primeros componentes. Por consiguiente, las cantidades exactas a emplear de estos componentes son determinadas por las cantidades óptimas necesarias para producir una reacción satisfactoria. Normalmente se encontrarán en el intervalo indicado en la tabla anterior.

24.9.69

371259

2788



5 La mezcla resultante de los cuatro componentes es pulverizada después hasta obtener un polvo fino, por ejemplo introduciéndola durante varias horas en un molino de bolas. Una vez transformada por completo en una mezcla homogénea, puede ser disuelta en agua una pequeña muestra, y determinarse el pH. Si es necesario, el pH ha de ajustarse de modo que se encuentre en el intervalo de 7,5 a 11. Si el pH es demasiado bajo, se añade más carbonato de sodio.

10 La cantidad de las enzimas LDH y GPT depende del pH empleado. Se ha comprobado que a un pH de 10,8 se requiere la mínima cantidad de enzimas; no obstante, puede emplearse el intervalo de 7,5 a 11.

15 Un método preferido ha sido preparar una mezcla de los componentes 1 a 4 anteriores, de tal modo que cuando se añade una diezmilésima parte de la mezcla a 3 ml. de una disolución de hidróxido de potasio al 1%, se obtiene un pH de 10,8. Esta disolución combinada (tampón-glutamato-NAD) es utilizada después para determinar la proporción de enzimas requerida, como se explica a continuación.

20 Una muestra de LDH y GPT combinadas liofilizadas es disuelta en agua (30 mg/ml.). En una cubeta se mezclan 3,0 ml. de disolución de tampón-glutamato-NAD, de pH 10,8, y 0,2 ml. de la disolución anterior de enzimas. La cubeta es colocada en un espectrofotómetro colocado a 340 milimicras. Se registra la absorbancia. A la cubeta se añade 25 0,1 ml. de una disolución 0,0010 M de lactato de litio (preparada cuidadosamente). Se observa el cambio en la  $A_{340}$ ; sería aproximadamente 0,18. Se observa también el 30 tiempo necesario para completar este cambio. Se ajusta la

371259



proporción de enzima de modo que el tiempo requerido sea el deseado, usualmente de cinco minutos.

Después se añade la cantidad calculada (para 10.000 determinaciones) de LDH y GPT liofilizadas a los cuatro componentes previamente mezclados, y la mezcla seca resultante es combinada perfectamente en toda su masa.

En este momento se dispone de un polvo que contiene las enzimas LDH y GPT, la coenzima NAD, y todos los componentes tamponadores, agente separador, y estabilizantes, para asegurar que el polvo se encuentra en un estado estable que tiene una larga duración en almacenamiento. Es extraída una muestra de este polvo, (con cuidado de no introducir humedad) y sometida a ensayo. Los ensayos están destinados a determinar la apropiada densidad óptica, la homogeneidad con respecto a la NAD, y la efectividad del polvo para constituir un sistema de determinación de ácido láctico. Por consiguiente, este polvo puede dividirse en varias pequeñas porciones que son justamente lo bastante grandes para contener las cantidades deseadas y apropiadas de tampón, enzimas, NAD, y glutamato para llevar a cabo una determinación de ácido láctico en 3 ml. Cada una de las porciones puede ser introducida después en un envase adecuado, tal como una cápsula, que proteja la mezcla de cualquier humedad.

Si se utiliza una cápsula farmacéutica de gelatina, en el interior del envase ha de colocarse un desecante, tal como una pella o gránulo de alúmina.

Normalmente, entre lotes sucesivos hay alguna variación en el tamaño de las porciones en que es dividida la mezcla, como resultado de variaciones producidas en

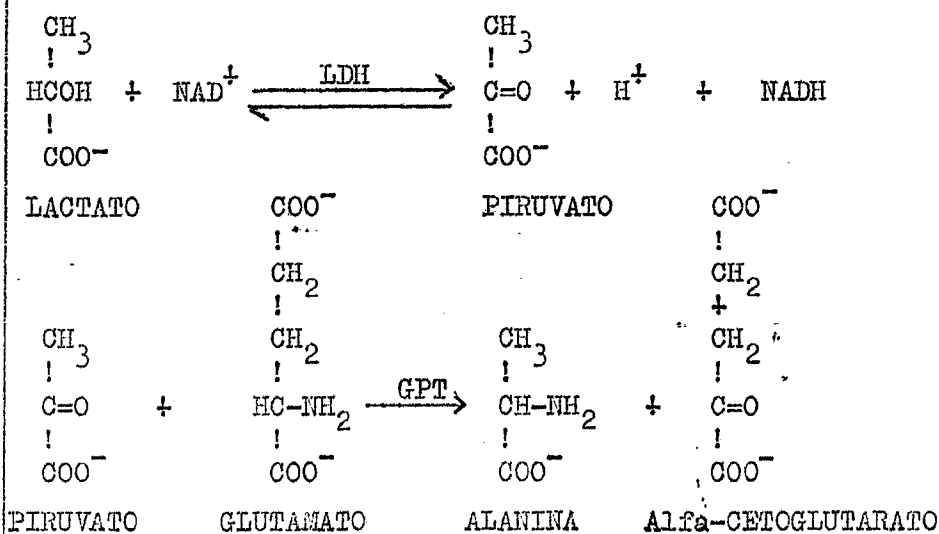
24.9.69

371259



la actividad de las enzimas. Con el fin de que todas las porciones sean de tamaño idéntico en todos los lotes, se elige un tamaño estándar de envase superior al tamaño más grande que se requiere. Después puede añadirse a la mezcla una cantidad adecuada de un agente de carga y estabilizante de una sustancia polihidroxilada, tal como el manitol, para llevar su volumen hasta un valor que asegure que todas las porciones tienen un volumen que llene justamente el envase.

Para efectuar una determinación de lactato en un suero empleando una tableta de este ejemplo, primero se toma una muestra del suero, de una cantidad tal como 0,1 mililitro. Después, se disuelve el contenido de una tableta de este tipo. La disolución resultante forma un reactivo líquido que es precisamente de la magnitud correcta para efectuar una sola determinación, y después es mezclada directamente con la muestra. Tan pronto como el reactivo y la muestra son mezclados, tienen lugar las siguientes reacciones:



371259

27 SEP.



5 Como el glutamato, las enzimas y la NAD son  
suministrados en la tableta en exceso con respecto a la  
cantidad requerida para las reacciones, el único factor  
limitativo es la cantidad de ácido láctico presente. Así  
pues, el piruvato formado es proporcional a la proporción  
de ácido láctico. Cuando el piruvato reacciona después  
con el glutamato, es convertido en alanina en proporción  
directa con el piruvato formado. Colocando la mezcla de  
10 ensayo en un espectrofotómetro adecuado y midiendo la den-  
sidad óptica a 340 milinicros, es medido el grado en que  
la NAD suministrada es reducida en la primera fase, sin  
la nueva formación competitiva de ácido láctico a partir  
de piruvato.

15 La presente solicitud que corresponde a la presen-  
tada en Estados Unidos de América, con fecha 6 de Septiem-  
bre de 1.968, bajo el número 758.120, se acoge a los be-  
neficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Pro-  
piedad Industrial.

20

#### REIVINDICACIONES

25

Los puntos de invención, propia y nueva, que se  
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-  
te de Invención en España, por VEINTE años, son los si-  
guientes:

30

1.- Un procedimiento de preparar un material de  
ensayo para la determinación del contenido desconocido de

24.-9.69

- 28 -

371259

4750



5 ácido láctico en una muestra, caracterizado por combinar una mezcla sólida, soluble en agua, sustancialmente anhidra y estable al almacenamiento, de: (a) las enzimas lactato deshidrogenasa y glutamato-piruvato transaminasa; (b) la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido; (c) el ácido glutámico, o una sal del mismo de metal alcalino, bloqueadores o colectores del piruvato; y (d) un tampón capaz de mantener el pH entre 7,5 y 11,0.

10 2.- Un procedimiento de preparar un material de ensayo para determinar el contenido de ácido láctico de una muestra, caracterizado por combinar una mezcla sólida soluble en agua, sustancialmente anhidra, y estable al almacenamiento, de: (a) las enzimas lactato deshidrogenasa y glutamato-piruvato transaminasa; (b) la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido; (c) el ácido glutámico o una sal del mismo de metal alcalino, colectores o bloqueadores del piruvato; (d) un tampón capaz de mantener el pH entre 7,5 y 11,0; (e) un estabilizante de las enzimas seleccionado del grupo que consta de gomas mucilaginosas, hidroxialcohilaminas, ácido etilendiamin tetraacético y sus sales, una fuente de anión sulfato, y sus mezclas; y (f) un agente de carga y estabilizante seleccionado del grupo que consta de manita, sorbita, lactosa y poli(alcohol vinílico); y en el que además (a) y (e) son una mezcla liofilizada.

25 3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque (d) es carbonato de potasio, hidróxido de potasio, o glicina.

30 4.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque (e) es goma arábiga, tris(hidroximetil)aminometano y su sulfato, sulfato de amonio, y ácido etil-



endiamintetraacético.

5 5.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque (d) es carbonato de potasio, hidróxido de potasio, o glicina, y (e) es goma arábica, tris(hidroximetil)aminometano y su sulfato, sulfato de amonio, y ácido etilendiamintetraacético.

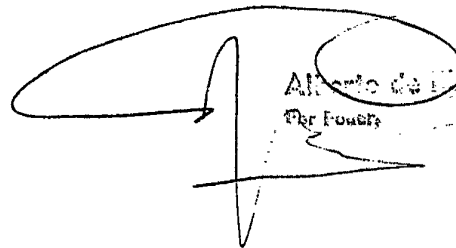
6.- Un procedimiento de preparar un material de ensayo para la determinación del contenido desconocido de ácido láctico en una muestra.

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

La presente Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

P.A.

  
Alberto de la Torre  
Por Encargo

371259

9.8.71  
MSG