

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 432**

51 Int. Cl.:

**G01N 31/22** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 21/78** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09737565 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2283352**

54 Título: **Ensayo de acetaminofeno**

30 Prioridad:

**28.04.2008 US 48406 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.03.2015**

73 Titular/es:

**SEKISUI DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)  
4 Hartwell Place  
Lexington, MA 02421 , US**

72 Inventor/es:

**BULGER, MICHAEL y  
HOLINSKY, JAN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 530 432 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

Ensayo de acetaminofeno

5 **Campo de la invención**

[0001] En general, la presente invención se refiere a un ensayo para determinar la concentración de *p*-aminofenol presente en una muestra. Más en particular, la presente invención se refiere a un ensayo enzimático para determinar la concentración de acetaminofeno presente en una muestra.

10

**Antecedentes de la invención**

[0002] La toxicidad farmacológica es una causa principal de insuficiencia hepática aguda. En la evaluación de la insuficiencia hepática, el laboratorio de análisis clínicos juega un papel vital en el diagnóstico de modo que pueda iniciar el tratamiento apropiado de manera oportuna.

15

[0003] El acetaminofeno (*N*-acetil-*p*-aminofenol) se ha prescrito desde hace tiempo como analgésico y antipirético. Se puede obtener fácilmente sin receta y es un componente activo de muchas formulaciones terapéuticas frecuentes, como remedios para el catarro y la gripe. El uso extendido de este fármaco lo coloca arriba en la lista de fármacos sospechosos hepatotóxicos en pacientes que presentan disfunción hepática.

20

[0004] Aunque que las dosis terapéuticas de acetaminofeno en raras ocasiones causan efectos adversos, se han notificado casos en los que el uso excesivo crónico de acetaminofeno producía hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. La ingestión de cantidades sobredosis agudas de acetaminofeno producen una depleción de las reservas de glutatión y la acumulación de metabolitos tóxicos en el hígado, lo que puede causar insuficiencia hepática severa o incluso mortal.

25

[0005] Cuando se ingiere acetaminofeno en cantidades excesivas, se acumula en el hígado *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina, un compuesto intermedio altamente reactivo. Este compuesto intermedio reacciona con tioles en el hígado, en concreto, con el glutatión. El glutatión se oxida a disulfuro de glutatión (GSSG). Los niveles excesivos de GSSG en el hígado causan necrosis. La toxicidad del acetaminofeno generalmente se muestra a concentraciones séricas por encima de aproximadamente 20 mg/dl (1324  $\mu$ moles/l).

30

[0006] El precursor del glutatión, la *N*-acetilcisteína (NAC), se administra a menudo como antídoto en casos de sobredosis de acetaminofeno. Aproximadamente el 70% de la NAC administrada se metaboliza en el hígado. Se considera que la NAC funciona como antídoto al menos por los siguientes motivos: es un precursor del glutatión, es un potente antioxidante y aumenta la eficacia de la GSSG reductasa en el hígado. Se considera que la administración de NAC minimiza o previene el daño causado por una sobredosis de acetaminofeno, al menos en parte, recargando las reservas de glutatión y evitando la acumulación de GSSG en el hígado.

35

40

[0007] A menudo se administra una alta concentración de NAC en una dosis de carga inicial seguida de niveles de mantenimiento de NAC durante el transcurso del tratamiento. La dosis de carga puede dar lugar a niveles séricos de NAC de 2000 mg/l o superiores, y los niveles de mantenimiento están a menudo entre aproximadamente 800 mg/l y 1000 mg/l. Es deseable controlar los niveles de acetaminofeno durante el transcurso del tratamiento con NAC para asegurarse de que se mantiene un nivel terapéutico apropiado evitando una exposición innecesaria o excesiva a NAC.

45

[0008] La incidencia de sobredosis accidentales, así como intencionadas, de acetaminofeno ha aumentado significativamente. El diagnóstico y tratamiento de las sobredosis de acetaminofeno requieren una detección precoz y una determinación precisa del fármaco en el organismo. La cantidad de acetaminofeno incorporada debe determinarse rápidamente y de forma precisa de modo que los médicos puedan administrar rápidamente una dosis terapéutica apropiada de NAC al paciente. Existe una alta demanda de análisis clínicos rápidos, fiables y sólidos para determinar la concentración de acetaminofeno en muestras biológicas.

50

[0009] Entre los procedimientos conocidos para determinar los niveles de acetaminofeno en muestras biológicas se incluyen, por ejemplo, diversas técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.

55

[0010] Se ha comprobado que la cromatografía líquida de gases y la cromatografía líquida de alta resolución son procedimientos fiables y precisos para determinar los niveles de acetaminofeno en las muestras biológicas, no

obstante, ambos son procedimientos lentos que requiere equipos caros y un alto nivel de experiencia técnica para su realización. Estos procedimientos no se adaptan especialmente a los laboratorios de análisis de urgencia donde se necesitan resultados rápidos.

- 5 **[0011]** Se ha utilizado ampliamente la espectrometría diferencial aunque este procedimiento requiere largas extracción con el solvente, por lo que no es apropiado para análisis clínicos. Procedimientos espectrofotométricos más rápidos no ofrecen, en general, la especificidad deseada.
- [0012]** Entre las técnicas colorimétricas se incluyen la colorimetría simple así como ensayos colorimétricos con enzimas. También hay disponibles diversos ensayos enzimáticos, pero estos tienden a ser significativamente más caros y, por tanto, menos adecuados, especialmente en el ámbito clínico.
- 10 **[0013]** Aunque los ensayos enzimáticos son más adecuados y económicos en comparación con los ensayos inmunológicos, generalmente son menos fiables porque tienden a mostrar interferencia con moléculas biológicas a menudo presentes en las muestras de los pacientes, como la bilirrubina y la hemoglobina. Niveles elevados de estas moléculas en las muestras de los pacientes pueden dar lugar a resultados falsos positivos (véase, por ejemplo, Bertholf y col., 2003), que potencialmente pueden llevar a diagnósticos erróneos y a la elección de un tratamiento o dosis inadecuados.
- 15 **[0014]** Los ensayos enzimáticos conocidos también están sometidos a interferencia en presencia de niveles terapéuticos de NAC. Por tanto, generalmente no pueden usarse ensayos enzimáticos para controlar los niveles de acetaminofeno durante el transcurso del tratamiento con NAC debido a la inexactitud de los niveles de acetaminofeno medidos. Esta es una desventaja significativa de los ensayos enzimáticos de acetaminofeno conocidos.
- 20 **[0015]** Los ensayos enzimáticos conocidos emplean tres componentes principales: una enzima aril acilamidasa, un compuesto cromogénico (o que forma color) y un agente oxidante con suficiente potencial oxidativo para catalizar la reacción de conjugación.
- 25 **[0016]** La aril acilamidasa escinde el enlace amido del acetaminofeno para producir *p*-aminofenol y acetato. A continuación, el *p*-aminofenol reacciona con el compuesto cromogénico en una reacción de conjugación oxidativa en presencia de un catalizador oxidante para formar un producto coloreado. Entre los catalizadores típicos se incluyen sales metálicas o complejos metálicos de especies que tienen oxígeno reactivo o grupos funcionales, como permanganato, peryodato, persulfato, sulfato o acetato. A continuación se utiliza el cambio de absorbancia, medido típicamente a la longitud de onda que captura la absorbancia del pico del producto colorado para determinar la concentración de acetaminofeno en la muestra. Esta puede determinarse comparando los valores de absorbancia obtenidos con un patrón o conjunto de patrones de concentración de acetaminofeno conocida y probados por el mismo procedimiento. La cantidad de moles de producto coloreado formado típicamente es proporcional a la cantidad de moles de acetaminofeno inicialmente presente en la muestra.
- 30 **[0017]** Los primeros ensayos enzimáticos de acetaminofeno requerían tiempos de incubación muy largos, a menos de más de 1 hora, para cada una de las reacciones de hidrólisis y de conjugación oxidativa, lo que hacía que fueran inadecuados para su uso en un ámbito de urgencia clínica.
- 35 **[0018]** Hammond y col. (1984) desarrollaron un ensayo enzimático rápido para determinar la concentración de acetaminofeno en suero usando una aril acilamidasa para hidrolizar el acetaminofeno a *p*-aminofenol. El *p*-aminofenol se hace reaccionar posteriormente con *o*-cresol en una reacción de conjugación oxidativa catalizada por sulfato de cobre, para formar un colorante indofenol. El cambio de absorbancia a la longitud de onda máxima del colorante (615 nm) se usa, a continuación, para determinar los niveles de acetaminofeno. Aunque este procedimiento proporciona una detección rápida del acetaminofeno, está sometido a interferencia significativa en presencia de niveles terapéuticos de NAC y no puede usarse con fiabilidad durante el tratamiento con NAC. Un procedimiento similar que utiliza *o*-cresol en presencia de un catalizador oxidante es propenso a mostrar interferencia con la bilirrubina (Bertholf y col., 2003), lo que lleva a resultados falsos positivos en pacientes hiperbilirrubinémicos.
- 40 **[0019]** Morris y col. (1990) describen un ensayo enzimático automatizado para medir el acetaminofeno en una muestra. Generalmente, los laboratorios clínicos prefieren ensayos automatizados. El procedimiento utiliza una aril acilamidasa para la hidrólisis del acetaminofeno a *p*-aminofenol, seguido de conjugación oxidativa con 8-hidroxiquinolina en presencia de iones manganeso para formar un producto de color azul. Los reactivos están
- 45
- 50
- 55

lío-filizados para conferir estabilidad durante la conservación y deben reconstituirse antes de su uso. Los ensayos que conllevan un paso de reconstitución son menos convenientes que los ensayos estables en líquido y son más propensos a errores.

5 **[0020]** Los ensayos de acetaminofeno conocidos que usan 8-hidroxiquinolina o un derivado de la misma como un cromóforo está sometidos a interferencia en presencia de niveles terapéuticos de NAC (es decir, > 800 mg/l). Los presentes investigadores probaron dos ensayos de acetaminofeno disponibles en el mercado (Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc., PEI, Canadá) que contenían ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico (8-HQ5SA) o hemisulfato de 8-hidroxiquinolina (8-HQHS) como cromóforo. Aunque se observaron medidas precisas de acetaminofeno en ausencia de NAC, se producía una disminución significativa (es decir, > aproximadamente 10 %) en la recuperación de acetaminofeno en presencia de niveles terapéuticos de NAC. Se descubrió que la presencia de NAC afectaba a la reacción de conjugación oxidativa en el ensayo en lugar de a la conversión enzimática de acetaminofeno a *p*-aminofenol. Existía una considerable diferencia de recuperación entre los ensayos de 8-HQ5SA y 8-HQHS, siendo el ensayo 8-HQ5SA significativamente más susceptible a la interferencia con NAC, lo que indica que incluso una ligera diferencia en la estructura química del cromóforo puede ser crucial para la reacción de conjugación cuando está presente NAC.

20 **[0021]** Chen y col. (2004) describen un ensayo de cuantificación de *p*-aminofenol en la orina para evaluar la exposición a anilina en el lugar de trabajo. Los niveles de *p*-aminofenol sirven con marcador biológico de la toxicidad por anilina ya que aproximadamente el 15 al 60% de la anilina absorbida se oxida a *p*-aminofenol *in vivo*. La orina debe acidificarse y tratarse previamente para que se libere el *p*-aminofenol libre de las formas conjugadas excretadas en la orina. El ensayo incluye una reacción de conjugación oxidativa usando 2,5-dimetilfenol (*p*-xilenol) como cromóforo para formar un producto coloreado. La reacción de conjugación es catalizada por el peryodato sódico, un fuerte oxidante, para formar un producto coloreado. Se especuló que la cuantificación de los niveles de *p*-aminofenol en orina puede ser útil para evaluar la sobredosis de acetaminofeno, aunque esto no se había estudiado ni demostrado.

30 **[0022]** Afshari y Lui (2001) describen un procedimiento no enzimático para la cuantificación de acetaminofeno en suero. El acetaminofeno no conjugado libre se separa en primer lugar de los agentes de interferencia endógenos mediante un paso de extracción seguido de hidrólisis a *p*-aminofenol usando calor (es decir, calentando durante 10 minutos) y ácido. Esta es una reacción de hidrólisis no selectiva en comparación con una reacción enzimática. La reacción de hidrólisis va seguida de la conjugación oxidativa del *p*-aminofenol con 2,5-dimetilfenol (*p*-xilenol) en presencia de peryodato sódico, un potente oxidante, para formar un producto coloreado. La necesidad de extraer el acetaminofeno de la muestra y de hervir las muestras hace que este no sea un procedimiento adecuado en un ámbito de urgencia clínica ni tampoco para automatización. Corbett, J.F. (Analytical Chemistry, vol. 47, n.º 2, febrero de 1975, páginas 308-313) refiere la aplicación de reacciones de conjugación oxidativas al ensayo de *p*-fenilenediaminas y fenoles.

40 **[0023]** Aunque los ensayos enzimáticos de acetaminofeno son convenientes y más asequibles que los ensayos inmunológicos, muchos laboratorios de análisis clínicos prefieren estos últimos ya que no se ven afectados por la presencia de NAC en la muestra. Es deseable medir de forma fiable los niveles de acetaminofeno durante el transcurso del tratamiento con NAC. Los ensayos inmunológicos también son menos susceptibles a la interferencia en presencia de moléculas biológicas, como la bilirrubina y la hemoglobina, a menudo presentes en las muestras de los pacientes. Puesto que los niveles de bilirrubina y hemoglobina en suero no son predecibles de un paciente a otro, un ensayo que sea propenso a interferencia con estas moléculas no proporcionará una prueba clínica sólida que sea fiable para todos los pacientes.

50 **[0024]** Por tanto, es deseable proporcionar un ensayo de acetaminofeno rápido que sea preciso y seguro en presencia o ausencia de NAC, y que sea más barato que los ensayos enzimáticos convencionales. También es deseable proporcionar dicho ensayo que también es menos susceptible a interferencia con moléculas biológicas presente en las muestras de los pacientes en comparación con los ensayos conocidos.

### **Breve descripción de los dibujos**

55 **[0025]** Ahora se describirán realizaciones de la invención, sólo a modo de ejemplo, en referencia a las figuras que la acompañan, en las que:

En la figura 1 se muestran los resultados de un ensayo de acetaminofeno previo en la técnica realizado en presencia o ausencia de niveles terapéuticos de NAC, con ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico (8-HQ5SA) como cromóforo,

donde los resultados demuestran que el 8-HQ5SA muestra interferencia significativa en presencia de niveles terapéuticos de NAC;

En la figura 2 se muestran los resultados de un ensayo de acetaminofeno realizado como anteriormente en la figura 5 1 siendo la única diferencia que 8-HQ5SA se sustituye por *p*-xilenol como cromóforo, donde los resultados demuestran que *p*-xilenol no se ve relativamente afectado por la presencia de niveles terapéuticos de NAC.

### **Resumen de la invención**

10 [0026] La invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas. En general, la presente invención se refiere a un ensayo fiable para la determinación cuantitativa de *p*-aminofenol en una muestra. Más en particular, la presente invención se refiere a un ensayo enzimático para la determinación cuantitativa de acetaminofeno en una muestra. El ensayo tiene una ventaja sobre la técnica previa porque proporciona resultados precisos y fiables en presencia o ausencia de NAC y puede, por tanto, usarse para medir los niveles de acetaminofeno durante el 15 tratamiento con NAC. En determinadas realizaciones, el ensayo tiene la ventaja adicional de una mejora en el rendimiento y reducción de la interferencia con moléculas biológicas en comparación con ensayos conocidos.

[0027] Se ha descubierto sorprendentemente que la elección de un compuesto de xilenol como cromóforo en una reacción de conjugación oxidativa con *p*-aminofenol tiene como resultado la mejora de la precisión y la 20 reducción de la interferencia en presencia de NAC en comparación con otros cromóforos conocidos.

[0028] En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona un procedimiento para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra acuosa. El procedimiento comprende los pasos de hidrolizar el acetaminofeno a *p*-aminofenol; conjugar de forma oxidativa el *p*-aminofenol con un cromóforo de xilenol en 25 presencia de un catalizador adecuado para formar un producto coloreado y determinar la cantidad del producto coloreado formado. La cantidad del producto coloreado formado es proporcional a la cantidad de acetaminofeno inicialmente presente en la muestra acuosa. El procedimiento es adecuado para su uso en presencia o ausencia de niveles terapéuticos de *N*-acetilcisteína (NAC) en la muestra acuosa.

30 [0029] En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un ensayo para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra acuosa, comprendiendo el ensayo los pasos de: poner en contacto la muestra acuosa con un primer reactivo (R1) que comprende una enzima aril acilamidasa y un diluyente adecuado para formar una solución de hidrólisis y, opcionalmente, diluir la solución de hidrólisis; incubar la solución de hidrólisis para permitir una reacción de hidrólisis en la que el acetaminofeno se convierte en *p*-aminofenol; poner en contacto 35 la solución de hidrólisis con un segundo reactivo (R2) que contiene un cromóforo de xilenol y un diluyente adecuado para formar una solución de conjugación oxidativa; incubar la solución de conjugación oxidativa para permitir una reacción de conjugación oxidativa donde el cromóforo de xilenol se conjuga con el *p*-aminofenol en presencia de un catalizador adecuado para formar un producto coloreado; y determinar la cantidad de producto coloreado formado, siendo la cantidad de producto coloreado proporcional a la cantidad de acetaminofeno inicialmente presente en la 40 muestra acuosa, donde el ensayo es adecuado para su uso en presencia o ausencia de niveles terapéuticos de *N*-acetilcisteína (NAC) en la muestra acuosa.

[0030] En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra acuosa, comprendiendo el procedimiento los pasos de: poner en 45 contacto la muestra con una aril acilamidasa, lo que tiene como resultado la conversión del acetaminofeno de la muestra en *p*-aminofenol; conjugar de forma oxidativa el *p*-aminofenol con un cromóforo de xilenol en presencia de un catalizador para formar un colorante y determinar la concentración del colorante, donde la cantidad de acetaminofeno en la muestra original es proporcional a la cantidad de colorante formado.

50 [0031] En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un kit para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra de sangre, comprendiendo el kit una aril acilamidasa, un xilenol y un catalizador.

[0032] En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un kit para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra acuosa en presencia o ausencia de NAC, comprendiendo el kit: un primer recipiente 55 que contiene un primer reactivo (R1) que comprende una aril acilamidasa para hidrolizar el acetaminofeno a *p*-aminofenol; y un segundo recipiente que contiene un segundo reactivo (R2) que comprende un cromóforo de xilenol para la conjugación oxidativa al *p*-aminofenol, donde R1 y R2 además comprende un catalizador adecuado para catalizar la conjugación del cromóforo de xilenol al *p*-aminofenol.

**Descripción detallada de la invención**

5 **[0033]** En general, la presente invención se refiere a un ensayo fiable para la determinación cuantitativa de *p*-aminofenol en la muestra. Más en particular, la presente invención se refiere a un ensayo enzimático para la determinación cuantitativa de acetaminofeno en una muestra. El ensayo tiene la ventaja sobre la técnica previa de que proporciona resultados precisos y fiables en presencia o ausencia de NAC. En determinadas realizaciones, el ensayo tiene la ventaja adicional de reducir la interferencia con moléculas biológicas en comparación con ensayos conocidos.

10 **[0034]** Las muestras del ensayo son preferiblemente muestras acuosas, lo que significa que tienen un componente base acuoso. Entre los ejemplos de muestras acuosas que pueden probarse en el ensayo se incluyen, sin limitaciones, agua, sangre completa, plasma, suero, linfa, bilis, orina, líquido espinal, esputo, saliva, sudor, secreciones intestinales y similares. También es posible comprobar preparaciones líquidas de tejidos humanos o  
15 animales como músculo esquelético, corazón, riñón, pulmón, cerebro, médula ósea, piel y similar. Entre los ejemplos de preparaciones líquidas se incluyen los homogeneizados y sus sobrenadantes.

**[0035]** En una realización, la muestra acuosa de ensayo es plasma, suero u orina. En otra realización, la muestra acuosa es plasma o suero. En una realización, la muestra acuosa es suero.

20 **[0036]** Aunque se entiende que el ensayo de la actual memoria descriptiva puede realizarse sin el paso inicial de hidrólisis, es decir, si el *p*-aminofenol se mide directamente en una muestra, más típicamente, el ensayo se usará para medir los niveles de acetaminofeno en una muestra y, por tanto, requerirá la hidrólisis del acetaminofeno a *p*-aminofenol antes de la conjugación oxidativa del *p*-aminofenol con el cromóforo seleccionado. Según la presente  
25 invención, el cromóforo seleccionado es un cromóforo de xilenol. Aunque es posible una reacción de hidrólisis no enzimática, la reacción preferida es una conversión enzimática de acetaminofeno en *p*-aminofenol.

**[0037]** El ensayo de la presente invención se realiza típicamente en dos partes. La primera parte supone la hidrólisis enzimática de acetaminofeno en *p*-aminofenol. La segunda parte supone la conjugación oxidativa de *p*-aminofenol en un cromóforo de xilenol en presencia de un catalizador apropiado para formar un producto coloreado. En algunos casos, el catalizador preferido se selecciona a partir de agentes oxidantes débiles. A continuación, la concentración de acetaminofeno en la muestra puede determinarse, por ejemplo, midiendo el cambio en la absorbancia a una determinada longitud de onda y comparando el valor obtenido con un patrón o conjunto de patrones que tienen una concentración de acetaminofeno conocida.

35 **[0038]** En una realización, el ensayo es un ensayo en dos partes que se realiza del siguiente modo:

**[0039]** En la primera parte, una alícuota de la muestra se pone en contacto con un primer reactivo (R1) que contiene la enzima para formar una solución de hidrólisis. Este primer reactivo puede denominarse como el reactivo  
40 enzimático. La solución de hidrólisis que contiene la muestra en R1 se mezcla y, opcionalmente, se diluye. En una realización, el paso opcional de dilución supone una dilución 1:1 de R1 con un diluyente adecuado, como agua desionizada. La solución se mezcla y la reacción de hidrólisis se continúa hasta su finalización a una temperatura apropiada que permita la hidrólisis del acetaminofeno de la muestra a *p*-aminofenol. Se obtiene un valor de absorbancia a una determinada longitud de onda.

45 **[0040]** En la segunda parte, tras finalizar la hidrólisis, se añade un segundo reactivo (R2) que contiene el cromóforo de xilenol a la solución de hidrólisis y la mezcla resultante se mezcla brevemente. El segundo reactivo (R2) puede denominarse como el reactivo cromóforo. La conjugación oxidativa del cromóforo de xilenol con *p*-aminofenol requiere la presencia de un catalizador adecuado. En una realización, el catalizador para la reacción de  
50 conjugación oxidativa es un componente de R1 de modo que el del catalizador y el cromóforo no se asocien hasta que se mezclan R1 y R2. Alternativamente, el catalizador puede ser un componente de R2, o puede añadirse a la mezcla de R1 y R2 para que dirija el paso de conjugación oxidativa. La reacción de conjugación oxidativa continúa hasta su finalización a una temperatura apropiada. Tras su finalización, se mide la absorbancia a una determinada longitud de onda y se calcula el cambio en la absorbancia entre la primera y la segunda parte.

55 **[0041]** Para determinar la cantidad de acetaminofeno presente inicialmente en la muestra, se compara el cambio en la absorbancia con respecto a un patrón, o a un conjunto de patrones, preparado mediante el mismo procedimiento y usando concentraciones conocidas de acetaminofeno. Se tendrán en cuenta los factores de dilución. Estos cálculos son rutinarios para los expertos en la materia.

**[0042]** Este ensayo en dos partes es adecuado para su automatización ya que no son necesarios pasos de extracción o separación y sólo se utilizan dos reactivos. Los pasos de dilución y mezclado incorporados también pueden realizarse de forma automática. Los equipos automáticos para realizar estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el ensayo puede realizarse de forma manual.

**[0043]** La enzima preferida para la reacción de hidrólisis es una enzima aril acilamidasa. Las enzimas aril acilamidasa catalizan la hidrólisis de anilidas a anilinas, y se identifican con el número E.C.3.5.1.13 de la IUB (Unión Internacional de Bioquímica, por sus siglas en inglés). El número de registro CAS para esta clase de enzimas es el 9025-18-7. Las enzimas aril acilamidasa se producen y aíslan normalmente a partir de microorganismos, como bacterias. Se describen ejemplos no limitantes de enzimas aril acilamidasa y procedimientos para su producción a partir de microorganismos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 4.430.433 de Hammond y col.

**[0044]** Puede usarse cualquier aril acilamidasa adecuada según la presente invención siempre que sea capaz de catalizar de forma eficaz la hidrólisis de acetaminofeno a *p*-aminofenol en condiciones apropiadas de reacción. Un experto en la materia puede optimizar las condiciones de reacción a la vista de la enzima en particular seleccionada sin apartarse de la presente invención.

**[0045]** La aril acilamidasa puede estar presente en cualquier cantidad adecuada. La aril acilamidasa se presente preferiblemente en una concentración suficiente de modo que sustancialmente todo el acetaminofeno presente en una muestra se convertirá en *p*-aminofenol. En una realización, R1 comprende aril acilamidasa a una concentración de aproximadamente 10 U/l a aproximadamente 5000 U/l, o de aproximadamente 600 U/l a aproximadamente 1200 U/l o de aproximadamente 800 U/l a aproximadamente 1000 U/l. En una realización, R1 comprende aril acilamidasa a una concentración de aproximadamente 932,7 U/l.

**[0046]** El solvente o diluyente de R1 puede ser cualquier solvente o diluyente acuoso adecuado que no afecte negativamente al ensayo. En una realización, el solvente o diluyente es agua, preferiblemente agua destilada, agua desionizada o agua de ósmosis inversa. En una realización, el diluyente es agua desionizada. El solvente o diluyente puede comprender diversos aditivos y componentes.

**[0047]** Además de la aril acilamidasa, R1 puede comprender adicionalmente uno o más de entre un catalizador, un cofactor, un solubilizador de proteínas, un estabilizador de proteínas, un estabilizador de enzimas, un quelante de metales, un tampón, un agente tensioactivo, un agente para ajustar el pH, un conservante, un diluyente, un excipiente o similares.

**[0048]** En una realización, R1 comprende el catalizador para la reacción de conjugación oxidativa. Cualquier catalizador adecuado puede utilizarse según la memoria descriptiva, en cualquier concentración adecuada, si es capaz de catalizar suficientemente la reacción de conjugación oxidativa. Entre los ejemplos de catalizadores se incluyen, pero sin limitaciones, permanganatos, peryodatos, persulfatos, acetatos y otras sales metálicas. En un ejemplo, el catalizador es una sal metálica seleccionada entre FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KIO<sub>4</sub> o un derivado de los mismos. En un ejemplo preferido, el catalizador es un oxidante débil. En una realización, el catalizador oxidante débil es cloruro de manganeso (II), MnCl<sub>2</sub>. En una realización, el catalizador oxidante débil es cloruro de manganeso (II) tetrahidratado, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.

**[0049]** En determinadas realizaciones, el catalizador está presente a una concentración de aproximadamente 0,0005 g/l a aproximadamente 1,000 g/l, o de aproximadamente 0,005 g/l a aproximadamente 1,000 g/l, o de aproximadamente 0,010 g/l a aproximadamente 0,100 g/l, o de aproximadamente 0,025 g/l a aproximadamente 0,075 g/l, o de aproximadamente 0,040 g/l a aproximadamente 0,060 g/l. En una realización, R1 comprende MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O como catalizador a una concentración de aproximadamente 0,0525 g/l. El MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O puede ser útil en otras funciones más allá de sus propiedades catalíticas, por ejemplo, se considera que MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O también puede actuar como estabilizante de enzimas aumentando de este modo la semivida del reactivo enzimático (R1).

**[0050]** En una realización R1 comprende al menos un estabilizante de proteínas. El estabilizante de proteínas ayudará a la estabilización de la enzima presente en el reactivo, mejorando así la semivida del reactivo. Puede utilizarse cualquier estabilizante de proteínas adecuado o una combinación de los mismos según la invención.

**[0051]** Un estabilizante de proteínas preferido es PVP-40, que puede también servir como solubilizantes de proteínas en el reactivo. Los presentes inventores han encontrado que PVP-40 puede reducir o eliminar los errores de medición del ensayo causados por la presencia de proteínas en el reactivo y puede evitar la precipitación de las

proteínas en el reactivo, mejorando de este modo la semivida del reactivo y el rendimiento global del ensayo. En una realización, R1 comprende PVP-40 a una concentración de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l, o de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En una realización, R1 comprende PVP-40 a una concentración de aproximadamente 2 g/l.

5

**[0052]** En una realización, R1 comprende al menos un estabilizante de proteínas seleccionado entre PVP-40, fracción V de la BSA, trehalosa, *p*-hidroxibenzoato de sodio, ácido *p*-hidroxibenzoico o una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un estabilizante de enzimas comprende una combinación de PVP-40, fracción V de la BSA, trehalosa y *p*-hidroxibenzoato de sodio o ácido *p*-hidroxibenzoico. La fracción V de la BSA puede estar presente a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l, o de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 2,5 g/l.

10

**[0053]** En una realización, R1 comprende fracción V de la BSA a una concentración de aproximadamente 1 g/l. La trehalosa puede estar presente a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l, o de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 2,5 g/l. En una realización, R1 comprende trehalosa a una concentración de aproximadamente 4,04 g/l. El ácido *p*-hidroxibenzoico o el ácido *p*-hidroxibenzoico pueden estar presentes a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l, o de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 5 g/l, o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 2,5 g/l. En una realización, R1 comprende *p*-hidroxibenzoato de sodio a una concentración de aproximadamente 1 g/l. En una realización, R1 comprende ácido *p*-hidroxibenzoato a una concentración de aproximadamente 1 g/l.

15

20

**[0054]** En una realización, R1 comprende aproximadamente 2 g/l de PVP-40; aproximadamente 1 g/l de fracción V de BSA; aproximadamente 4,04 g/l de trehalosa y aproximadamente 1 g/l de ácido *p*-hidroxibenzoico sódico.

25

**[0055]** R1 puede comprender opcionalmente un tampón. Puede utilizarse cualquier tampón adecuado según la invención. Entre los tampones adecuados pueden incluirse, pero sin limitaciones, fosfato, pirofosfato, fosfato potásico, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropano sulfónico), CAPS/Metaborato, CAPS/Carbonato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido 2[[tris(hidroximetil)metil]amino]-1-etanosulfónico (TES), TRIS/Carbonato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPES), ácido 2-hidroxi-3-[N-[tris(hidroximetil)metil]amino]-propanosulfónico (TAPSO) y combinaciones de los mismos.

30

35

**[0056]** El tampón puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1 a 10 g/l, o de aproximadamente 5 a 8 g/l. En una realización, R1 comprende tampón CAPS. En una realización, R1 comprende tampón CAPS a una concentración de aproximadamente 6,4 g/l.

**[0057]** R1 puede comprender opcionalmente un conservante. Puede utilizarse cualquier conservante adecuado según la invención. Entre los conservantes adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, sulfato de gentamicina, azida sódica y benzoato sódico. En una realización, R1 comprende sulfato de gentamicina a una concentración de aproximadamente 0,001 g/l a aproximadamente 0,1 g/l, o de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,05 g/l. En una realización, R1 comprende aproximadamente 0,01 g/l de sulfato de gentamicina. En una realización, R1 comprende azida sódica a una concentración de aproximadamente 0,001 g/l a aproximadamente 0,1 g/l, o de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,05 g/l. En una realización, R1 comprende aproximadamente 0,05 g/l de azida sódica. En una realización, R1 comprende aproximadamente 0,01 g/l de sulfato de gentamicina y aproximadamente 0,05 g/l de azida sódica.

40

45

**[0058]** R1 puede comprender opcionalmente un quelante de metales. Puede utilizarse cualquier quelante de metales adecuado según la invención. Entre los quelantes de metales se incluyen, pero sin limitaciones, el EDTA. En una realización, R1 comprende EDTA a una concentración de aproximadamente 0,001 g/l a aproximadamente 0,1 g/l, o de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,05 g/l. En una realización, R1 comprende EDTA a una concentración de aproximadamente 0,025 g/l.

50

55

**[0059]** R1 puede comprender opcionalmente un agente tensioactivo. Puede utilizarse cualquier agente tensioactivo adecuado según la invención. Entre los ejemplos de agentes tensioactivos se incluyen, pero sin limitaciones, Brij™-35, Triton™ X-100, Olin-10G™, TX™-102, TX-405™, Zonyl FSN™, TX-100™ y TX-165™.

**[0060]** La reacción de hidrólisis tiene lugar, preferiblemente, a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,9



a aproximadamente 12,0, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,0, o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,4, preferiblemente de aproximadamente 8 a 9. En una realización, el pH es de aproximadamente 8,6.

5 **[0061]** El pH de R1 puede ajustarse mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse NaOH o cualquier otra base adecuada para aumentar el pH. Para disminuir el pH puede usarse HCl o cualquier otro ácido adecuado. En una realización, el pH de R1 se ajusta usando NaOH. En una realización, R1 comprende NaOH 2N en una cantidad de aproximadamente 500 µl/l a aproximadamente 1000 µl/l. En una realización, R1 comprende aproximadamente 833 µl/l de NaOH 2N.

10

**[0062]** A continuación, en la tabla 1 se proporciona un ejemplo de formulación de R1. Según este ejemplo de realización, R1 puede prepararse mediante la adición de cada componente, con la excepción de la enzima y la azida sódica, a menos del 100% del volumen total de un diluyente adecuado, preferiblemente agua destilada, agua desionizada o agua de ósmosis inversa. A continuación, el pH se ajusta al intervalo deseado con NaOH, seguido por la adición de azida sódica. La enzima se añade al final. Después, la formulación se ajusta al 100% del volumen con el diluyente.

**[0063]** En una realización de un ensayo automatizado de la presente invención, se añaden 10 µl de muestra (o control o patrón) a 100 µl de R1 en una cubeta. A continuación, R1 se somete a una dilución 1:1 incorporada con 100 µl de agua, preferiblemente agua desionizada, agua destilada o agua de ósmosis inversa y la solución se mezcla brevemente. La reacción de hidrólisis tiene lugar en la cubeta. Los volúmenes pueden ajustarse dependiendo del tamaño de la cubeta necesaria para un equipo automático en particular (p. ej, analizador químico). En una realización, el analizador químico es un analizador químico Hitachi 717<sup>®</sup> (Roche Diagnostics).

25 **[0064]** La reacción de hidrólisis puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 60°C, o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C, o de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C. En una realización, la reacción de hidrólisis tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 37°C.

30 **[0065]** Se deja que la reacción de hidrólisis proceda durante un tiempo suficiente para que se produzca la hidrólisis de sustancialmente todo el acetaminofeno presente en la muestra (o patrón), típicamente de aproximadamente entre 2 y 20 minutos o aproximadamente entre 3 y 10 minutos. En una realización, la reacción de hidrólisis se continua durante aproximadamente 5 minutos. La longitud de la reacción puede optimizarse a la temperatura seleccionada ya que, en general, tiempos de reacción más largos requieren temperaturas más bajas.

35

**[0066]** Tras completar la reacción de hidrólisis y que se ha convertido sustancialmente todo el acetaminofeno de la muestra (o el patrón) en *p*-aminofenol, se lleva a cabo el paso de conjugación oxidativa.

40 **[0067]** En una realización de un ensayo automático de la presente invención, el paso de conjugación oxidativa se inicia añadiendo el segundo reactivo (R2) que contiene el cromóforo directamente a la cubeta que contiene la solución de hidrólisis. Según la realización descrita anteriormente, se añaden 200 µl de R2 a la solución de hidrólisis y se mezcla brevemente para obtener un volumen final de reacción de conjugación oxidante de 410 µl (10 µl de muestra + 100 µl de R1 + 100 µl de agua + 200 µl de R2) en la cubeta.

45 **[0068]** Según la presente invención, el cromóforo preferido es un cromóforo de xilenol. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la elección de un cromóforo de xilenol en este ensayo reducía significativamente la interferencia en presencia de NAC. Este sorprendente resultado proporciona una ventaja sobre ensayos previos en la técnica porque puede recomendarse el uso del presente ensayo durante el tratamiento con NAC. Los presentes inventores han mostrado medidas de acetaminofeno fiables en presencia de niveles  
50 terapéuticos de NAC de hasta al menos 2000 mg/l, resultado no previamente demostrado en ningún ensayo enzimático para acetaminofeno de la técnica previa.

**[0069]** En un experimento, los presentes inventores también encontraron sorprendentemente que la sustitución de un cromóforo 8-HQ5SA por 2,5-dimetilfenol en un ensayo de acetaminofeno comercial (disponible en  
55 Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc., PEI, Canadá) daba lugar a una disminución significativa de la interferencia por bilirrubina en el ensayo, demostrándose posteriormente que la elección del cromóforo puede afectar significativamente a los niveles de interferencia en el ensayo.

**[0070]** Puede utilizarse cualquier cromóforo de xilenol adecuado según la presente invención, por ejemplo,

2,5-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,4-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol o 2,3-dimetilfenol. Los cromóforos de xilenol preferidos dan lugar a interferencia mínima en el ensayo en presencia de niveles terapéuticos de NAC. En los experimentos, 2,5-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol o 2,3-dimetilfenol no mostraron interferencia significativa con 1471 mg/l de NAC en un ensayo de interferencia. En una realización, el cromóforo de xilenol es 2,5-dimetilfenol (*p*-xilenol).

**[0071]** El cromóforo de xilenol puede estar presente durante la reacción de conjugación oxidativa a cualquier concentración adecuada. No obstante, para calcular con precisión la concentración de acetaminofeno presente en la muestra inicial, el cromóforo debería estar idealmente a una concentración molar que coincida, o exceda, la concentración molar máxima de *p*-aminofenol en la solución de hidrólisis, lo que es proporcional a la cantidad de acetaminofeno en la muestra inicial.

**[0072]** En una realización, R2 comprende el cromóforo de xilenol a una concentración de aproximadamente 0,075 g/l a aproximadamente 115 g/l, o de aproximadamente 2,5 g/l a aproximadamente 20 g/l o de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 10 g/l. En una realización, el cromóforo de xilenol es 2,5-dimetilfenol y está presente en R2 a una concentración superior a 7,5 g/l.

**[0073]** Para que la reacción de conjugación oxidativa tenga lugar en un marco temporal adecuado, debe incluirse un catalizador apropiado. El catalizador puede ser un componente de R1 o R2, o puede añadirse a la mezcla de R1 y R2. Pueden usarse diversos catalizadores según la presente memoria descriptiva, como permanganatos, peryodatos, persulfatos y diversas sales metálicas. En un ejemplo, el catalizador es una sal metálica como FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> o KIO<sub>4</sub>. En una realización, el catalizador comprende MnCl<sub>2</sub> anhidro o hidratado. Sorprendentemente, se encontró que el MnCl<sub>2</sub>, un oxidante débil, era especialmente eficaz como catalizador en el paso de conjugación oxidativa con *p*-xilenol en comparación con otras sales metálicas probadas.

**[0074]** Típicamente, para el paso de conjugación oxidativa en un ensayo de acetaminofeno, se selecciona un catalizador con fuerte potencial oxidativo para asegurarse de que se proporciona suficiente energía para realizar la reacción de conjugación hasta su finalización. En general, los catalizadores utilizados son sales metálicas de especies que contienen oxígeno o grupos funcionales reactivos, como peryodato sódico, sulfato de cobre y acetato de manganeso. Por ejemplo, en ensayos conocidos de acetaminofeno se ha utilizado hidroxiquinolina o sus derivados catalizados por acetato de manganeso (es decir, Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc., PEI, Canadá); *o*-cresol catalizador por peryodato (GDS Diagnostics) o sulfato de cobre (Hammond y col., 1984); *p*-xilenol catalizado por peryodato sódico (Afshari y Lui, 2001). Es sabido que estos ensayos de acetaminofeno muestran interferencia. Por ejemplo, la interferencia en presencia de niveles elevados de bilirrubina en muestras biológicas daban lugar a resultados erróneos en estas muestras.

**[0075]** Los presentes inventores postularon que el uso de un catalizador oxidante fuerte podría ser un factor que contribuyera a la interferencia con bilirrubina que se observan con ensayos convencionales de acetaminofeno. Por ejemplo, determinados fabricantes de reactivos han utilizado peryodato para medir la bilirrubina mediante su destrucción selectiva para formar biliverdina. Se observa un cambio de absorbancia significativo cuando la bilirrubina se oxida a biliverdina o a productos de oxidación más elevada, lo que podría contribuir a la interferencia observada en los ensayos convencionales. Por tanto, los presentes inventores se proponen determinar si a) un oxidante débil podría dirigir con éxito una reacción de conjugación oxidativa entre un cromóforo de xilenol, como el 2,5-dimetilfenol y el *p*-aminofenol y b) el uso de un oxidante débil podría tener un efecto positivo sobre la interferencia de la bilirrubina en el ensayo.

**[0076]** Ahora sorprendentemente se ha demostrado que la elección de un oxidante débil, como MnCl<sub>2</sub> como ejemplo de catalizador que tiene potencial oxidativo bajo en comparación con el peryodato sódico u otros oxidantes fuertes que contienen especies de oxígeno reactivo, proporciona energía suficiente para catalizar la unión de *p*-aminofenol con 2,5-dimetilfenol en la reacción. Además, se demostró con éxito que la elección de un oxidante débil como catalizador reduce significativamente la interferencia por bilirrubina en el ensayo, lo cual es un resultado altamente deseable desde una perspectiva clínica. También se descubrió sorprendentemente que se necesitaba una concentración menor de MnCl<sub>2</sub> para conducir la reacción en comparación con otros catalizadores probados y se producía en el ensayo un desarrollo de color más intenso. El uso de menos catalizador en el reactivo reduce la posibilidad de que el catalizador reaccione con otros reactivos o con compuestos biológicos o químicos presentes en las muestras de los pacientes mejorando así el ensayo.

**[0077]** Por tanto, la elección de un oxidante débil como catalizador puede reducir el potencial del cromóforo de xilenol para oxidarse de forma espontánea y su reactividad con otros componentes presentes en el reactivo del

ensayo con el tiempo, mejorando de este modo la estabilidad del reactivo y alargando la semivida de los reactivos estables en líquido. Un experto en la materia será capaz de distinguir un oxidante fuerte de un oxidante débil y será capaz de seleccionar un oxidante débil adecuado para su uso como catalizador según los ejemplos de la memoria descriptiva.

5

**[0078]** Se ha postulado que la adición de un antioxidante al reactivo cromóforo podría mejorar más la estabilidad del color del reactivo con el tiempo. Sorprendentemente, se ha demostrado que la adición de glutatión reducido, un componente que normalmente no se encuentra en ensayos cromogénicos, previene de forma eficaz la aparición del color en el reactivo cromóforo con el tiempo, probablemente debido en parte a la prevención de la autooxidación del xilenol, mejorando así la estabilidad del reactivo. El glutatión también funciona como molécula captadora y, por tanto, puede eliminar los radicales del reactivo que potencialmente podrían interferir con la reacción de conjugación oxidativa.

10

**[0079]** Se realizaron estudios con hidroxilamina, ácido 3,3'-tiodipropiónico, tiourea o glutatión reducido. Se controló en los reactivos el cambio de color con el tiempo tanto cualitativa como cuantitativamente. La adición de glutatión reducido al reactivo era lo más eficaz para prevenir el desarrollo de color con el tiempo.

15

**[0080]** Por tanto, R2 puede opcionalmente contener un antioxidante. Puede utilizarse cualquier antioxidante adecuado según la presente invención. En una realización, R2 comprende un antioxidante a una concentración de aproximadamente 0,005 g/l a aproximadamente 5,00 g/l, o de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 5 g/l o de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 1 g/l. En una realización, el antioxidante es glutatión. Se prefiere particularmente el glutatión reducido. En una realización, R2 comprende glutatión reducido a una concentración de aproximadamente 0,5 g/l.

20

**[0081]** R2 puede contener opcionalmente uno o más de entre un tampón, un agente tensioactivo o una combinación de ambos. Puede utilizarse cualquier tampón o agente tensioactivo adecuado según la presente invención, por ejemplo, aquellos mencionados anteriormente con respecto a la solución de hidrólisis. La presencia de un agente tensioactivo en el reactivo puede inhibir la interferencia lipémica en el ensayo especialmente a niveles bajos de acetaminofeno (es decir, <200  $\mu$ moles/l).

25

**[0082]** En una realización, R2 comprende TRIS a una concentración de aproximadamente 10 a 50 g/l o de aproximadamente 15 a 30 g/l, o de aproximadamente 20 a 30 g/l. En una realización, R2 comprende aproximadamente 24,2 g/l de TRIS. En una realización, R2 comprende carbonato sódico a una concentración de aproximadamente 5 a 20 g/l, o de aproximadamente 10 a 15 g/l. En una realización, R2 comprende aproximadamente 10,6 g/l de carbonato sódico. En una realización, R2 comprende aproximadamente 24,2 g/l de TRIS y aproximadamente 10,6 g/l de carbonato sódico.

30

**[0083]** En algunas realizaciones, la reacción de conjugación se lleva a cabo a aproximadamente 37°C, con un pH entre aproximadamente 9 y 12, o entre aproximadamente 9,5 y 11,5 o, preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 11. En una realización, el pH es mayor de aproximadamente 10. En una realización, el pH es de aproximadamente 10,8.

35

**[0084]** El pH del reactivo puede ajustarse mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En una realización, se añaden lentejas de NaOH a R2 a una concentración de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l, o de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 3 g/l. En una realización, R2 comprende aproximadamente 2,5 g/l de lentejas de NaOH.

40

**[0085]** A continuación, en la tabla 2 se muestra un ejemplo de formulación de R2. Durante la preparación de R2 según este ejemplo de realización, se recomienda que se añadan el glutatión y el 2,5-dimetilfenol al final y en este orden.

45

**[0086]** Puede comprobarse el pH del reactivo del ensayo tras su preparación y puede ajustarse adicionalmente si es necesario.

**[0087]** La reacción de conjugación oxidativa puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 60°C, o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C, o de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C. En una realización preferida, la reacción de conjugación oxidativa tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 37°C.

50

55

**[0088]** Se deja que la reacción de conjugación oxidativa proceda durante un tiempo suficiente para que se produzca la conjugación del cromóforo de xilenol con sustancialmente todo el *p*-acetaminofeno presente en la mezcla de reacción, típicamente de aproximadamente entre 2 y 20 minutos o aproximadamente entre 3 y 10 minutos. En una realización, la reacción de conjugación oxidativa se continua durante aproximadamente 5 minutos.

5 La longitud de la reacción puede optimizarse a la temperatura seleccionada ya que, en general, tiempos de reacción más largos requieren temperaturas más bajas.

**[0089]** La conjugación oxidativa del cromóforo de xilenol con *p*-aminofenol tiene como resultado la formación de un producto de color azul (es decir, un colorante), que puede detectarse midiendo el cambio de absorbancia de la mezcla de ensayo a una longitud de onda apropiada. La absorbancia al final de la reacción de hidrólisis se resta de la absorbancia al final de la reacción de conjugación oxidativa. La cantidad estequiométrica de acetaminofeno presente en la muestra original es sustancialmente equivalente a la cantidad estequiométrica de colorante formado.

10

**[0090]** La absorbancia del colorante resultante puede medirse a lo largo de un intervalo de longitudes de onda. La absorbancia máxima del colorante se produce a aproximadamente de 610 a 615 nm. Típicamente, la longitud de onda seleccionada para medir en un ensayo colorimétrico es la longitud de onda a la cual se observa el pico de absorbancia. Si se utiliza un analizador bicromático, se toma una medida blanco bicromático a una longitud de onda alternativa, como de aproximadamente 700 nm a aproximadamente 850 nm, que se resta de la medida principal para minimizar el ruido de fondo del ensayo. También pueden usarse otros procedimientos conocidos para minimizar el ruido del fondo del ensayo.

15  
20

**[0091]** Los presentes inventores encuentran sorprendentemente que la medición de la absorbancia a una longitud de onda fuera del pico (es decir, en el hombro de la curva de absorbancia en lugar de en el pico) disminuye significativamente la interferencia con las moléculas biológicas bilirrubina y hemoglobina en el ensayo. Se ha encontrado que la medición de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 640 nm a aproximadamente 680 nm, o de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 670 nm, preferiblemente de aproximadamente 660 nm, mejoraba significativamente la precisión de la medida del acetaminofeno en presencia de bilirrubina o hemoglobina. La interferencia de bilirrubina y hemoglobina son desventajas frecuentes asociadas con los ensayos de acetaminofeno conocidos. Por tanto, para minimizar la interferencia en el ensayo, la absorbancia puede medirse a aproximadamente 660 nm.

25  
30

**[0092]** En una realización, la absorbancia se mide entre aproximadamente 610 y 665 nm.

**[0093]** Un experto en la materia apreciará que mientras los componentes y sus proporciones relativas en las soluciones de reactivos pueden variar sin alejarse de la presente invención, debe evitarse la presencia de turbidez, precipitados y otros factores contaminantes, tanto en las soluciones individuales como combinadas. Cuando el ensayo es un ensayo estable en líquido, deberá evaluarse cuidadosamente cualquier alteración que pudiera afectar negativamente a la estabilidad de los reactivos o de sus componentes, como la estabilidad de la enzima o el cromóforo.

35  
40

**[0094]** En un ejemplo de realización, se lleva a cabo un ensayo de acetaminofeno en dos partes según la presente invención como se resume brevemente a continuación.

**[0095]** La primera parte consta de la adición de un reactivo enzimático (R1) a una muestra de suero o plasma de un paciente en una determinada relación entre la muestra y el reactivo en una cubeta. En el equipo Hitachi 717, por ejemplo, el volumen de la muestra es de 10  $\mu$ l y el volumen de R1 es de 100  $\mu$ l, con una dilución *in situ* de 100  $\mu$ l de R1 con agua desionizada para formar una solución de hidrólisis. La solución se incuba a 37°C durante un tiempo establecida, como 5 minutos, en el analizador automático. Durante este tiempo, la enzima aril acilamidasa presente en el reactivo escinde el enlace amida de la molécula de acetaminofeno en la muestra dando lugar a *p*-aminofenol y acetato. Las lecturas de absorbancia se controlan a una longitud de onda establecida y a determinados intervalos de tiempo antes de la introducción de un reactivo cromóforo.

45  
50

**[0096]** En la segunda parte, el reactivo cromóforo (R2) se introduce a un intervalo de tiempo fijado y un determinado volumen en la solución de hidrólisis (muestra + R1, diluido). En el equipo Hitachi 717, por ejemplo, se introducen 200  $\mu$ l de R2 y la reacción se monitoriza a intervalos de tiempo fijados hasta completar el tiempo de duración de la prueba. El cromóforo de xilenol en R2, preferiblemente 2,5-dimetilfenol, se conjuga oxidativamente a un pH alcalino, en presencia de catalizador, con el *p*-aminofenol producido en la primera parte. En una realización preferida, el paso de conjugación oxidativa se lleva a cabo en presencia de cationes de manganeso. La reacción produce un complejo coloreado que tiene un pico de absorción máxima a aproximadamente 610 nm.

55

**[0097]** El analizador anota la diferencia entre la absorbancia previa a la adición de R2 y la absorbancia al final de la reacción, corregida según el ruido de fondo. La diferencia de densidad óptica en la cantidad de absorbancia producida en la muestra. El cambio en la absorbancia puede compararse con respecto a una curva patrón para calcular la concentración de acetaminofeno en la muestra original.

**[0098]** En una realización preferida, la absorbancia se mide a 660 nm para minimizar la interferencia con determinadas moléculas biológicas en el ensayo.

10 **[0099]** Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, se considera que la concentración de acetaminofeno es directamente proporcional a la intensidad de la absorbancia según el principio conocido como Ley de Beer-Lambert,  $A = \epsilon cl$ , donde:

**A** = absorbancia (a una longitud de onda determinada);

15

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar (constante para cada compuesto químico);

*l* = longitud del paso óptico (p. ej. 1 cm) y

20 **c** = concentración del soluto.

**[0100]** Por tanto, la concentración del soluto (en este caso el acetaminofeno) es directamente proporcional a la absorbancia ya que el coeficiente de extinción molar y la longitud del paso es constante.

25 **[0101]** En una realización, las concentraciones en la mezcla de reacción final son:

1) 227,5 U/l de aril acilamidasa

2) 0,0128 g/l de MnCl<sub>2</sub>

30

3) 3,66 g/l de 2,5-dimetilfenol

4) 0,244 g/l de glutatión

35 **[0102]** El ensayo de la presente invención puede fabricarse y venderse como un kit de piezas. Los reactivos del kit pueden ser reactivos en polvo o liofilizados que necesiten reconstitución. Los procedimientos para obtener estos reactivos en polvo o liofilizados son conocidos en la técnica. Preferiblemente, los reactivos son reactivos estables en líquido. Es conveniente utilizar reactivos estables en líquido y son menos propensos a inducir a errores que puedan introducirse durante la reconstitución.

40

**[0103]** En un ejemplo, el kit comprende: un recipiente que contiene un reactivo enzimático (R1), un recipiente con un reactivo cromóforo (R2) y, opcionalmente, indicaciones para llevar a cabo el ensayo. El kit puede contener además un patrón de acetaminofeno e indicaciones para preparar un conjunto de patrones lineales.

#### 45 **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1**

**[0104]** Ejemplo de reactivos enzimáticos y cromóforos.

50

**Tabla 1.** Ejemplo de composición con reactivo enzimático (R1) con agua desionizada como diluyente.

Componente	Cantidad/l	Cantidad/100 $\mu$ l	Conc. en volumen final de 410 $\mu$ l (10 $\mu$ l de muestra + 100 $\mu$ l de R1 + 100 $\mu$ l de H <sub>2</sub> O + 200 $\mu$ l de R2)	Objetivo principal (puede servir también para otras funciones)
<b>CAPS</b>	6,460 g	646 $\mu$ g	158 $\mu$ g	Tampón
<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	0,0525 g	5,25 $\mu$ g	1,3 $\mu$ g	Catalizador
<b>Fracción V de BSA</b>	1,000 g	100 $\mu$ g	24,4 $\mu$ g	Estabilizador de enzimas

Trehalosa	4,040 g	404 µg	98,9 µg	Estabilizador de enzimas
Sulfato de gentamicina	0,010 g	1,0 µg	2,44 µg	Conservante
p-hidroxibenzoato sódico	1,000 g	100 µg	24,4 µg	Estabilizador de enzimas
EDTA	0,025 g	2,5 µg	0,61 µg	Quelante de metales
PVP-40	2,000 g	200 µg	48,8 µg	Estabilizador de proteínas
NaOH 2N	833 µl	0,083 µl	0,02 µl	Ajuste de pH
Azida sódica	0,050 g	5,0 µg	1,2 µg	Conservante
Aril acilamidasa	932,7 U	0,093 U	0,023 U	Enzima

Tabla 2. Ejemplo de composición de reactivo cromóforo (R2) con agua desionizada como diluyente.

Componente	Cantidad/l	Cantidad/200 µl	Conc. en volumen final de 410 µl (10 µl de muestra + 100 µl de R1 + 100 µl de H <sub>2</sub> O + 200 µl de R2)	Objetivo principal (puede servir también para otras funciones)
TRIPS	24,200 g	4,840 mg	2,360 mg	Tampón
Carbonato sódico	10,608 g	2,121 mg	1,061 mg	Tampón
Lentejas de NaOH	2,500 g	500 µg	244 µg	Tampón
Glutión	0,500 g	100 µg	48,8 µg	Antioxidantes
2,5-dimetilfenol	7,500 g	1,5 mg	732 µg	Cromóforo

- 5 [0105] Los reactivos pueden prepararse en un diluyente adecuado, como agua desionizada.

### Ejemplo 2

Realización del ensayo en ausencia o presencia de NAC

10

[0106] Se preparó un conjunto de patrones que tenían una concentración conocida de acetaminofeno en agua desionizada (i.e. 250 µmoles/l, 500 µmoles/l, 1000 µmoles/l, 1500 µmoles/l, 2000 µmoles/l y 2500 µmoles/l). Se añadió una alícuota de 10 µl de cada patrón a 100 µl de R1 en una cubeta del analizador Hitachi 717® (Roche Diagnostics) seguido de una dilución *in situ* con 100 µl de agua desionizada. Cada mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. Se obtuvo un valor de absorbancia inicial para cada una. A cada cubeta se le añadió una alícuota de 200 µl de R2. Se dejó que la reacción de conjugación oxidativa se desarrollara durante 5 minutos. Se obtuvo un valor de absorbancia final. La concentración de acetaminofeno se calculó en función de la diferencia de absorción a 660 nm entre la absorbancia final y la inicial, corregida con el ruido de fondo restando la absorción a 800 nm. Los resultados de diversas concentraciones conocidas se muestran a continuación en la tabla 3.

20

Tabla 3. Concentración de acetaminofeno medida en ausencia de NAC usando p-xilenol como cromóforo.

[Acetaminofeno] en la muestra (µmoles/l)	[Acetaminofeno] medida (µmoles/l)	Diferencia %
250	248	-0,8
500	496	-0,8
1000	995	-0,5
1500	1498	-0,1
2000	1987	-0,7
2500	2479	-0,8

- [0107] El ensayo mostraba una medida precisa de la concentración de acetaminofeno a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones de acetaminofeno.

[0108] Para evaluar el rendimiento en presencia de NAC, se obtuvo una solución madre disolviendo 75 mg de NAC en 1000 µl de agua desionizada. Esto da lugar a una solución madre de 75 g/l a 75000 mg/l de NAC

concentrada.

**[0109]** Se añadió una alícuota de 2,5 ml de una concentración conocida de acetaminofeno en agua a un tubo de ensayo y esta se complementó con 50 µl de la solución madre de NAC para preparar un conjunto de patrones complementados con una concentración ajustada de acetaminofeno (es decir, 245 µmoles/l, 490 µmoles/l, 980 µmoles/l, 1470 µmoles/l, 1960 µmoles/l y 2450 µmoles/l). Cada patrón de acetaminofeno complementado tenía una concentración de NAC de 1471 mg/l, que es un valor que podría encontrarse en el suero del paciente durante el tratamiento con NAC. Las muestras se analizaron antes de una hora de la complementación ya que NAC se degrada con el tiempo.

10

**[0110]** El ensayo se llevó a cabo como se describe anteriormente. Se añadió una alícuota de 10 µl de patrón complementado a 100 µl de R1 en una cubeta del analizador Hitachi 717® seguido de una dilución *in situ*. Cada mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. Se obtuvo un valor de absorbancia inicial. Se añadió una alícuota de 200 µl de R2 en las respectivas cubetas. Se dejó que la reacción de conjugación oxidativa se desarrollara durante 5 minutos. En función de la diferencia de absorción a 660 nm, corregida según el fondo, se calcularon las concentraciones de acetaminofeno. El procedimiento de comparación se realizó en un aparato Advia® 1650 de Siemens para comparar un ensayo conocido usando un derivado 8-HQ como cromóforo. Los resultados de diversas concentraciones conocidas de acetaminofeno se muestran a continuación en la tabla 4.

20 **Tabla 4.** Medición de la concentración de acetaminofeno en presencia de NAC, usando 8-HQ5SA o *p*-xilenol como cromóforo.

[Acetaminofeno] en muestras complementadas (µmoles/l)	[Acetaminofeno] medida		% de diferencia con respecto al valor teórico	
	Derivado 8-HQ	<i>p</i> -xilenol	Derivado 8-HQ	<i>p</i> -xilenol
245	104	257	-57,55	4,90
490	219	505	-55,31	3,06
980	478	1009	-51,22	2,96
1470	718	1506	-51,16	2,45
1960	1019	1993	-48,01	1,68
2450	1302	2481	-46,86	1,27

**[0111]** El ensayo con *p*-xilenol como cromóforo era resistente a la interferencia en presencia de NAC en comparación con un ensayo usando un derivado 8-HQ como cromóforo. El punto de corte para la interferencia en un ensayo clínico generalmente es de una diferencia del 10%, preferiblemente menos del 5%.

### Ejemplo 3

30 Comparación de cromóforos de xilenol

**[0112]** La comparación de los cromóforos de xilenol se realizó sustituyendo el cromóforo en la formulación R2. Los parámetros eran todos los mismos. Se obtuvo una solución madre del tampón R2 y glutatión y, a continuación, se dividió en seis lotes. Se diluyeron 7,5 g/l de cada isómero respectivo en cada lote respectivo, originando así seis reactivos cromóforos «diferentes» con un isómero diferente en cada. R1 se mantuvo constante por lo que la única variable en el análisis era el cromóforo en R2. El reactivo enzimático (R1) tenía un pH de 8,6 a 25°C, mientras que los seis reactivos isoméricos de xilenol tenían cada uno un pH de 11,5 a 25°C. Los resultados de los diversos isómeros conocidos se muestran a continuación en la tabla 5.

40 **[0113]** Los resultados demostraron que 2,5-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol y 2,3-dimetilfenol producían resultados de linealidad aceptables en presencia de NAC. El mejor rendimiento se observó con 2,5-dimetilfenol y 2,6-dimetilfenol.

45 **Tabla 5.** Concentración de acetaminofeno medida usando diferentes cromóforos de xilenol en presencia o ausencia de NAC.

[Acetaminofeno] (µmoles/l)	Dimetilfenol					
<b>Sin NAC</b>	<b>2,5</b>	<b>3,4</b>	<b>2,6</b>	<b>2,4</b>	<b>3,5</b>	<b>2,3</b>

250	252	89	251	224	234	254
500	502	273	502	488	476	502
1000	1000	982	999	998	998	1000
1500	1499	2180	1505	1519	1561	1487
2000	1991	3577	1998	2034	2138	1954
2500	2483	5014	2483	2533	2753	2426
[Acetaminofeno] ( $\mu$ moles/l)						
<b>Conjunto complementado con NAC (1471 mg/l)</b>						
245	255	34	248	56	138	247
490	505	78	491	141	292	488
980	999	188	985	314	606	961
1470	1481	337	1478	556	945	1413
1960	1947	518	1959	828	1318	1861
2450	2401	738	2440	1108	1706	2304

**Ejemplo 4**

Evaluación de 2,5-dimetilfenol en presencia de Intralipid®

5

**[0114]** Se llevó a cabo una evaluación de 2,4-dimetilfenol usando suero complementado con Intralipid® que contenía una concentración conocida de acetaminofeno. Se mostró que, a un nivel terapéutico de acetaminofeno (<200  $\mu$ moles/l), el cromóforo 2,5-dimetilfenol se recuperaba dentro del límite aceptable de  $\pm$  10% con 200 mg/dl de Intralipid®. La prueba se realizó en el equipo Advia® 1650 de Siemens.

10

**[0115]** En primer lugar, se recogieron 10 ml de suero en un tubo grande de ensayo y se mezclaron. A continuación, el suero se complementó con 2,1 mg de acetaminofeno de grado de reactivo y se mezcló hasta su disolución. De la mezcla complementada, se pipeteó una alícuota de 4,75 ml que se colocó en un tubo de ensayo grande marcado como mezcla control. Se pipeteó una segunda alícuota de 4,75 ml que se colocó en un segundo tubo de ensayo grande como mezcla control. En la mezcla control, se añadieron 250  $\mu$ l de la mezcla y se mezcló exhaustivamente. En la mezcla de ensayo, se añadieron 250  $\mu$ l de solución Intralipid® al 20% y se mezcló exhaustivamente. Se obtuvo un conjunto de interferencia mezclando el control y las mezclas de ensayo a diversos niveles, creando de este modo diferentes concentraciones de Intralipid® pero manteniendo la concentración de acetaminofeno. El 2,5-dimetilfenol mostró resultados aceptables para al menos 200 mg/dl de Intralipid®.

20

**Ejemplo 5**

Rendimiento de diferentes cromóforos en presencia de NAC

25

**[0116]** Los ensayos de acetaminofeno conocidos que usan 8-hidroxiquinolina o un derivado de la misma como un cromóforo se sometieron a interferencia en presencia de niveles terapéuticos de NAC (es decir, > 800 mg/l). Los presentes investigadores probaron dos ensayos de acetaminofeno disponibles en el mercado (Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc., PEI, Canadá) que contenían ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico (8-HQ5SA) o hemisulfato de 8-hidroxiquinolina (8-HQHS) como cromóforo. Aunque todos proporcionaban medidas precisas de acetaminofeno en ausencia de NAC, todos mostraron una disminución significativa (es decir, > 10 %) en la recuperación de acetaminofeno en presencia de niveles terapéuticos de NAC. Se descubrió que la presencia de NAC afectaba a la reacción de conjugación oxidativa en el ensayo en lugar de la conversión enzimática de acetaminofeno en *p*-aminofenol. Existía una considerable diferencia de recuperación entre el ensayo con 8-HQ5SA y el ensayo con 8-HQHS, siendo el ensayo con 8-HQ5SA más susceptible a la interferencia con NAC, lo que sugiere que incluso una ligera diferencia en la estructura química del cromóforo puede ser crucial para la reacción de conjugación cuando se presenta NAC.

30

35

**[0117]** Se realizó una comparación de *p*-xilenol con ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico (8HQ5SA) sustituyendo el 8HQ5SA de un kit comercial (Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc. PEI, Canadá) por *p*-xilenol. Todos los



demás parámetros de los reactivos y los ensayos fueron los mismos. Se llevó a cabo un ensayo manual usando un patrón de acetaminofeno de 1000 µmoles/l. El control se complementó con agua y la muestra de prueba se complementó con 1000 mg/l de NAC. La absorbancia se midió a través de un espectro de longitudes de onda.

5 **[0118]** En la figura 1 se muestran los resultados del ensayo realizado con 8HQ5SA como cromóforo y en la figura 2 se muestran los resultados del *p*-xilenol. Los resultados indican que el ensayo de *p*-xilenol no se veía relativamente afectado por la presencia de NAC; lo que demuestra un ensayo sólido, mientras que el ensayo con 8HQ5SA se veía significativamente afectado por la presencia de NAC.

## 10 Ejemplo 6

Las modificaciones de los parámetros reduce la interferencia de hemoglobina y bilirrubina

15 **[0119]** La interferencia de hemoglobina es una desventaja de los ensayos de acetaminofeno conocidos. Se llevó a cabo un barrido con Ultrospec™ 3300 de una muestra de acetaminofeno a 100 µmoles/l complementada con 1000 mg/dl de hemoglobina y se produjo una observación interesante. El cambio de OD entre una muestra de acetaminofeno de 100 µmoles/l y la muestra de hemoglobina de 100 µmoles/l + 1000 mg/dl era mucho mayor a 600 nm que a 660 nm, valor que estaba en el hombro del pico de absorbancia proporcionando aún un buen cambio de DO entre las longitudes de ondas primaria y secundaria. Por tanto, se realizó un ensayo adicional usando 660 nm como longitud de onda primaria y manteniendo 800 nm como la longitud de onda secundaria.

20 **[0120]** Los resultados demostraron que el cambio de la longitud de onda primaria de 600 a 660 nm reducía significativamente la interferencia en presencia tanto de hemoglobina como de bilirrubina en el ensayo. El análisis se realizó en ambos equipos Hitachi 717 y el Advia® 1650 de Siemens. El suero se complementó con acetaminofeno a una concentración fijada y, a continuación, con el material de interferencia a concentraciones variables. El ensayo modificado mostró niveles aceptables de interferencia (es decir, < 10%) en presencia de NAC, bilirrubina y hemoglobina.

## Ejemplo 7

30 Efecto del cromóforo sobre la interferencia de bilirrubina

35 **[0121]** Se realizó un estudio de interferencia de bilirrubina en el que todos los reactivos utilizados en el ensayo de acetaminofeno eran idénticos, a excepción del cromóforo. Las muestras ensayadas contenían aproximadamente 100 µmoles/l o 330 µmoles/l de acetaminofeno. Los cromóforos analizados fueron 8-HQS5SA y *p*-xilenol. Las reacciones se analizaron en un equipo Advia® 1650 de Siemens.

**Tabla. 6.** Interferencia de la bilirrubina a aproximadamente 100 µmoles/l de acetanimofeno

Derivado 8-HQ			<i>p</i> -xilenol		
Conc. de bilirrubina (mg/dl)	Conc. medida de acetaminofeno (µmoles/l)	Diferencia con respecto al valor control (µmoles/l)	Conc. medida de acetaminofeno (µmoles/l)	Diferencia con respecto al valor control (µmoles/l)	
0	102 (control)	<b>(conjunto)</b>	105 (control)	<b>(conjunto)</b>	
4	117	<b>15</b>	97	<b>-8</b>	
8	131	<b>29</b>	98	<b>-7</b>	
16	158	<b>56</b>	102	<b>-3</b>	
24	186	<b>84</b>	103	<b>-2</b>	
32	212	<b>110</b>	104	<b>-1</b>	
40	237	<b>135</b>	104	<b>-1</b>	

**Tabla. 7.** Interferencia de la bilirrubina a aproximadamente 330 µmoles/l de acetaminofeno

Derivado 8-HQ			<i>p</i> -xilenol		
Conc. bilirrubina (mg/dl)	Conc. medida de acetaminofeno (µmoles/l)	Diferencia con respecto al valor control (µmoles/l)	Conc. medida de acetaminofeno (µmoles/l)	Diferencia con respecto al valor control (µmoles/l)	
0	316 (control)	<b>(conjunto)</b>	324 (control)	<b>(conjunto)</b>	
4	330	<b>14</b>	318	<b>-6</b>	

8	341	25	320	-4
16	368	52	322	-2
24	392	76	324	0
32	415	99	324	0
40	438	122	326	2

**[0122]** Los resultados demuestran que la elección del cromóforo puede afectar significativamente a la interferencia de la bilirrubina sobre el ensayo. El ensayo en el que se utilizó *p*-xilenol era significativamente más resistente a la interferencia de bilirrubina.

5

**[0123]** Se pretende que las realizaciones de la invención descrita anteriormente sean solo un ejemplo. Las alteraciones, modificaciones y variaciones pueden ser realizadas en las reacciones en particular por expertos en la materia sin alejarse del objetivo de la invención, por lo que se define exclusivamente por la en las reivindicaciones adjuntas.

10

#### **Referencias bibliográficas:**

##### **[0124]**

15 Afshari, J.T. y Liu, T-Z. Rapid spectrophotometric method for the quantitation of acetaminophen in serum. *Analítica Chimica Acta* 2001; 443: 165-169.

Bertholf, R.L.; Johannsen, L.M.; Bazooband, A. y Mansouri, V. False-positive acetaminophen results in a hyperbilirubinemic patient. *Clinical Chemistry* 2003; 49(4): 695-698.

20

Chen, C-F; Tseng, Y-T; Tseng, H-K y Liu T-Z. Automated spectrophotometric assay for urine *p*-aminophenol by an oxidative coupling reaction. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2004; 324(3): 336-340.

Hammond, P.M.; Scawen, M.D.; Atkinson, T.; Campbell, R.S. y Price, C.P. Development of an enzyme-based assay for acetaminophen. *Analytical Biochemistry* 1984; 143: 152-157.

25

Morris, H.C.; Overton, P.D.; Ramsey, J.R.; Campbell, R.S.; Hammond, P.M.; Atkinson, T. y Price, C.P. Development and validation of an automated enzyme assay for paracetamol (acetaminophen). *Clinica Chimica Acta* 1990; 187: 95-104.

30

Weeks, J.L. y Rabini, J. The Pulse Radiolysis of Deaerated Aqueous Carbonate Solutions. I. Transient Optical Spectrum and Mechanism II. *pK for OH Radicals. The Journal of Physical Chemistry* 1966; vol. 70(7): 2100-2106.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra, comprendiendo el procedimiento los pasos de:
  - 5 hidrolizar el acetaminofeno para formar *p*-aminofenol;
  - conjugar de forma oxidativa el *p*-aminofenol a un cromóforo de xilenol usando un segundo reactivo (R2) que comprende el cromóforo xilenol en presencia de un catalizador adecuado para formar un producto coloreado y
  - 10 determinar la cantidad del producto coloreado formado, siendo la cantidad del producto coloreado proporcional a la cantidad de acetaminofeno inicialmente presente en la muestra,
  - en el que el paso de hidrólisis del acetaminofeno a *p*-aminofenol comprende poner en contacto el acetaminofeno con
  - 15 un primer reactivo (R1) que comprende una aril acilamidasa, y
  - en el que el catalizador es  $MnCl_2$ .anhidro o hidratado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cromóforo de xilenol se selecciona a partir del
- 20 grupo compuesto por 2,5-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol y 2,3-dimetilfenol.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el cromóforo de xilenol es 2,5-dimetilfenol.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra es una muestra acuosa, preferiblemente suero o plasma.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R1 comprende aril acilamidasa a una concentración de aproximadamente 10 U/l a aproximadamente 5000 U/l.
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el catalizador está presente en R1 a una concentración de aproximadamente 0,0005 g/l a aproximadamente 1,000 g/l.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R2 comprende 2,5-
- 35 dimetilfenol a una concentración de aproximadamente 0,075 g/l a aproximadamente 115 g/l y/o en el que el catalizador es  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  y está presente en R1 en una concentración de aproximadamente 2,5 g/l a aproximadamente 20 g/l.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R2 además
- 40 comprende glutatión reducido a una concentración de aproximadamente 0,005 g/l a aproximadamente 5,000 g/l.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R1 además comprende uno o más de entre un solubilizador de proteínas, un estabilizador de proteínas, un estabilizador de
- 45 enzimas, un quelante de metales, un tampón, un agente tensioactivo, un agente para ajustar el pH, un conservante o un excipiente.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el estabilizador de enzimas se selecciona a partir del
- grupo compuesto por PVP-40, fracción V de la BSA, trehalosa, *p*-hidroxibenzoato sódico, ácido *p*-hidroxibenzoico y combinaciones de los mismos.
- 50 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el R2 además comprende uno o más de entre un tampón, un agente tensioactivo, un agente para ajustar el pH, un conservante, un antioxidante o un excipiente.
- 55 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R1 además comprende un diluyente y el diluyente es agua desionizada, y la solución de hidrólisis se diluye aproximadamente 1:1 con el diluyente antes de la reacción de hidrólisis
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R1 comprende

## ES 2 530 432 T3

aproximadamente 932,7 U/l de aril acilamidasa y aproximadamente 0,0525 g/l de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; y en el que R2 comprende aproximadamente 7,5 g/l de 2,5-dimetilfenol y aproximadamente 0,500 g/l de glutatión reducido.

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada una de las reacciones de hidrólisis y conjugación oxidativa se produce a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente 3 a 10 minutos, y en el que la reacción de hidrólisis se produce a un pH de aproximadamente 8,6 y la reacción de conjugación oxidativa se produce a un pH de aproximadamente 10,8.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de acetaminofeno se determina obteniendo la diferencia en la absorbancia al final de la reacción de hidrólisis y al final de la reacción de conjugación oxidativa; y comparando la diferencia frente a un patrón o conjunto de patrones, en el que la absorbancia se mide a una longitud de onda de aproximadamente 610 nm y 665 nm.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la absorbancia se mide a una longitud de onda de aproximadamente 660 nm.
17. Un kit para determinar la concentración de acetaminofeno en una muestra, comprendiendo el kit:
- un primer recipiente que contiene un primer reactivo (R1); y
- un segundo recipiente que contiene un segundo reactivo (R2), en el que R1 es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6, 9, 10, 13 o 14; y R2 es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7, 8, 11 o 13.
18. Un kit según la reivindicación 17 que además comprende instrucciones para realizar un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 14 a 16.

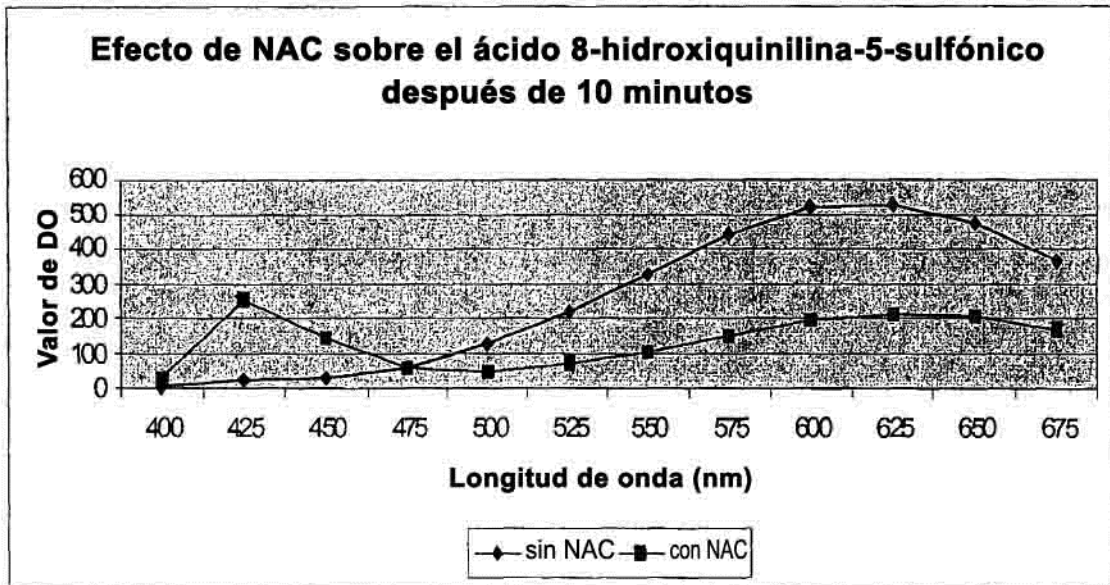


FIG. 1

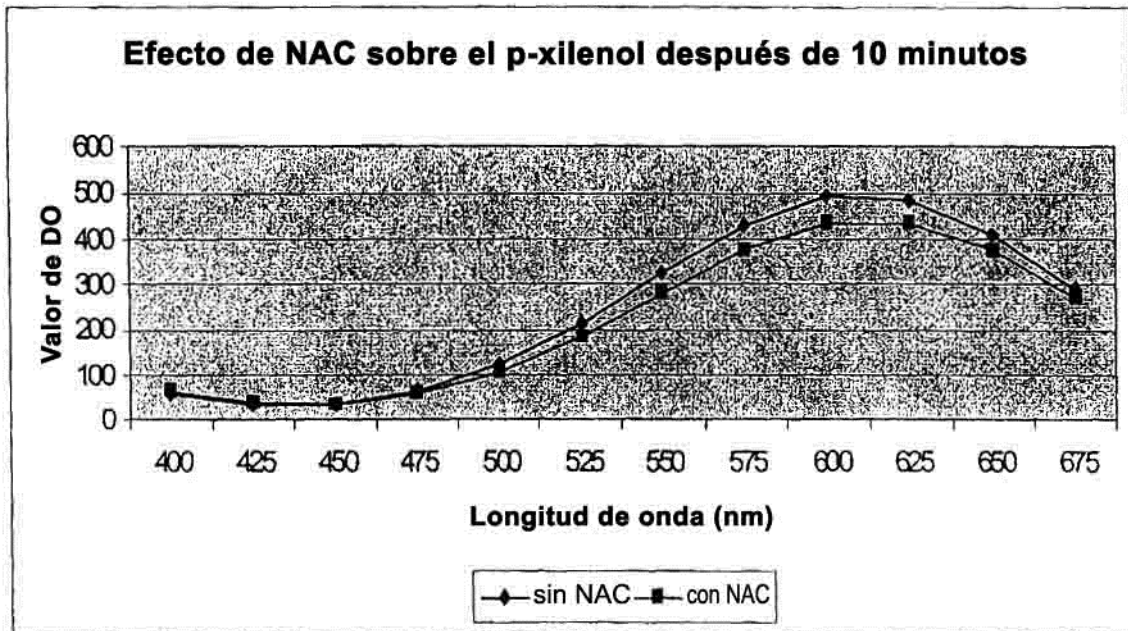


FIG. 2