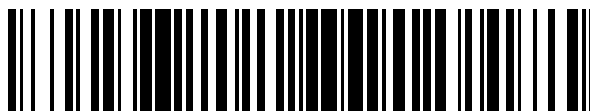


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 991**

51 Int. Cl.:

G01N 33/84 (2006.01)

C07C 229/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2011** **E 11717976 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015** **EP 2553469**

54 Título: **Procedimiento para la medida de iones de calcio**

30 Prioridad:

30.03.2010 EP 10003408

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

06.04.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

JOSEL, HANS-PETER;
KYTZIA, HANS-JOACHIM y
MUECKE, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 532 991 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

Procedimiento para la medida de iones de calcio

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un reactivo para la determinación de calcio y a un procedimiento de determinación usando ese reactivo. Más en particular, se refiere a un reactivo para la determinación de calcio que comprende un quelante de tipo BAPTA mono-nitro sustituido (BAPTA = ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N',N'-tetraacético). Un procedimiento de determinación que permite una determinación precisa de calcio en una muestra, tal como una muestra de sangre (por ejemplo, sangre completa, plasma o suero) o cualquier otra muestra líquida acuosa (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, linfa, saliva u orina) y, por tanto, es especialmente útil para diagnósticos clínicos, como se describe.

15 Los niveles de calcio en sangre o suero, respectivamente, son de un valor de diagnóstico significativo y pueden tener implicaciones en el tratamiento importantes.

El intervalo de referencia para los iones de calcio es muy estrecho, de 2,20 a 2,55 mmol/l, y ligeras desviaciones por encima y por debajo de estos niveles son diagnósticos de varios trastornos fisiológicos. Las dos enfermedades más comunes asociadas con la hipercalcemia (calcio en suero elevado) son el hiperparatiroidismo y la neoplasia maligna, en especial cuando la neoplasia maligna ha metastatizado al esqueleto y ha provocado la resorción ósea (es decir, destrucción local del hueso acompañada de la liberación de calcio desde el sitio de la lesión metastásica). La disminución en los niveles de calcio en suero (hipocalcemia) está asociada comúnmente con el hipoparatiroidismo. Aproximadamente un 1 % de los recién nacidos tienen una hipocalcemia significativa (calcio en suero <1,75 mmol/l) con síntomas tales como irritabilidad, espasmos y convulsiones, lo que requiere una intervención médica inmediata.

El magnesio, como el calcio, es uno de los elementos principales que se encuentran en el cuerpo. Las alteraciones en el nivel de magnesio también dan lugar a síntomas clínicos, de los que algunos son muy parecidos a los que se encuentran con niveles alterados de calcio. Dados los síntomas clínicos prácticamente idénticos del bajo nivel de calcio en suero y del bajo nivel de magnesio en suero, es imperativo definir qué elemento es el que provoca los síntomas clínicos. A menudo, ambas medidas de calcio y magnesio en suero son necesarias para determinar qué elemento está, o según sea el caso, si ambos elementos están, fuera del intervalo normal y es imperativo que el magnesio no interfiera con la cuantificación de calcio.

El procedimiento de referencia para medir calcio y magnesio, respectivamente, es la absorción atómica. Para medidas rutinarias, la absorción atómica es un poco inconveniente, requiere instrumentos caros y un operario algo experto que realice los ensayos con el fin de lograr una precisión y reproducibilidad suficientes.

La actividad catalítica de determinadas enzimas depende fuertemente de la presencia de iones de calcio, haciendo posible de este modo cuantificar el calcio por medio de una medida de la actividad enzimática dependiente de calcio. Los procedimientos para la medida de iones de calcio en base a procedimientos enzimáticos se han descrito, por ejemplo, en el documento US 6.068.971.

Con frecuencia, los procedimientos actuales usados en la rutina de los laboratorios clínicos para medir el calcio se basan en procedimientos que emplean agentes productores de color, quelantes, como orto-cresolftaleína-complexona (o-CPC), arsenazo III, fosfonazo o clorofosfonazo. Aunque al menos uno de estos procedimientos se usa a menudo en la rutina clínica de un laboratorio, cada uno tiene desventajas.

La sensibilidad de los procedimientos con o-CPC es muy dependiente del pH. Para una sensibilidad máxima, la reacción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 10,7. A estos valores de pH alcalinos, sin embargo, el reactivo absorbe fácilmente el dióxido de carbono ambiental. La absorción de dióxido de carbono que se combina con agua para formar ácido carbónico reduce gradualmente el pH del reactivo y finalmente hace que el reactivo sea no funcional para las medidas de calcio. El cambio gradual en el pH también requiere ciclos de calibrado más frecuentes con el fin de asegurar una medida correcta. Además, o-CPC es más bien no selectivo y se une al magnesio y a otros metales, como gadolinio. Para eliminar la interferencia con magnesio en los niveles que se encuentran normalmente en suero, se añade 8-hidroxiquinolina para quelar el magnesio.

Los procedimientos para la detección de calcio basados en arsenazo III no sufren los problemas de pH alto e interferencia con magnesio (dependiendo del pH de la medida) inherentes en los procedimientos con o-CPC. El arsenazo III se une al calcio bajo condiciones débilmente ácidas, por ejemplo pH 5 a 6, y si la medida de calcio se realiza a un pH menor de 7, la unión de magnesio es despreciable. Aunque el arsenazo III elimina muchas de las desventajas de los procedimientos con o-CPC, sufre de sensibilidad más bien baja y de preocupaciones ambientales. Cada mol de arsenazo III contiene 2 moles de arsénico, y la eliminación de los reactivos con arsenazo III es un asunto crítico en muchos países debido a los problemas de contaminación del suministro de agua con arsénico.

El documento JP-A-04-120464 divulga que el calcio y el magnesio se pueden cuantificar al mismo tiempo usando cloro-fosfonazo-III como un agente quelante y productor de color. En el caso de clorofosfonazo-III, el intervalo de pH más adecuado para su cambio de color es débilmente ácido y el clorofosfonazo-III es un reactivo que no contiene arsénico. Por lo tanto, el clorofosfonazo-III es ventajoso con respecto a los problemas provocados por un alto pH y la toxicidad. Sin embargo, la cuantificación simultánea de magnesio y calcio usando clorofosfonazo-III plantea un problema. Normalmente, este quelante se añade a una muestra para unirse tanto al magnesio como al calcio provocando de este modo la coloración. A continuación, se añade EGTA para liberar únicamente el calcio unido, provocando esta liberación un cambio en el color. Después, se cuantifica el calcio en base al cambio en el color. El clorofosfonazo-III tiende además a dar valores del blanco altos, este hecho limita el intervalo de concentración en el que es posible la determinación de los iones de calcio.

Se han descrito y usado agentes quelantes de calcio de tipo BAPTA como sistemas de tampón para controlar, por ejemplo, la concentración de iones de calcio intracelulares. Pethig, R. y col., (Cell Calcium 10 (1989) 491-498) han determinado las constantes de disociación de siete tampones de calcio de tipo BAPTA diferentes. Proponen el uso de dibromo-BAPTA en los trabajos fisiológicos con calcio.

Como se analiza anteriormente, en la rutina clínica son conocidos varios procedimientos de ensayo para la medida de los iones de calcio. Están disponibles varios reactivos para la determinación de calcio basados en el uso de un agente quelante y productor de color, dejando espacio cada uno para una mejora adicional.

Por tanto, hay necesidades no cubiertas de los reactivos y de los procedimientos para medir cuantitativamente el calcio en muestras analíticas. El procedimiento ideal se debe basar en un quelante que a) sea estable bajo condiciones de almacenamiento y a bordo de un analizador, b) no contenga elementos tóxicos, como por ejemplo arsénico, c) tenga una absorbancia del blanco del reactivo relativamente baja, d) no se una a los iones de magnesio ni a otros iones de metales, como gadolinio, e) permita determinaciones rápidas y un rendimiento de muestra alto, y f) dé lugar a una medida precisa de los iones de calcio sobre un intervalo de medida amplio.

Sorprendentemente, se ha descubierto que los mono-nitro-derivados de quelantes de tipo BAPTA presentan propiedades bastante ventajosas que los hacen muy apropiados para la medida de los iones de calcio.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un reactivo que es muy útil en la medida de los iones de calcio y entre otros aspectos positivos, tiene una estabilidad en almacenamiento excelente, no presenta el problema de polución ambiental por arsénico, no muestra interferencias por magnesio o gadolinio y permite una determinación del calcio rápida y precisa sobre un amplio intervalo de concentraciones.

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la concentración de los iones de calcio en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de mezclar la muestra con una solución que comprende un quelante de tipo mono-nitro-BAPTA uniendo de este modo los iones de calcio al quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, liberar los iones de calcio del quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, en el que dicha liberación provoca un cambio en la absorbancia del quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, medir el cambio en la absorbancia y usar el cambio en la absorbancia medida para determinar la concentración de los iones de calcio. También se divulga una composición de reactivo estable para la medida de calcio que contiene un quelante de tipo mono-nitro-BAPTA y que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5.

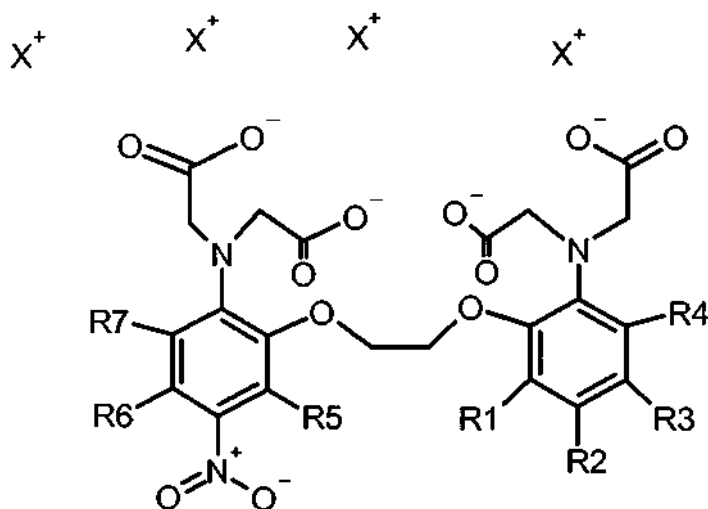
Además, la presente invención hace referencia a un kit que comprende una composición de reactivo para la medida de calcio que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5 y que contiene un quelante de tipo mono-nitro-BAPTA.

Descripción detallada de la invención

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la concentración de los iones de calcio en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de mezclar la muestra con una solución que comprende un quelante de tipo mono-nitro-BAPTA uniendo de este modo los iones de calcio al quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, liberar los iones de calcio del quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, en el que dicha liberación provoca un cambio en la absorbancia del quelante de tipo mono-nitro-BAPTA, medir el cambio en la absorbancia y usar el cambio en la absorbancia medida para determinar la concentración de los iones de calcio.

Se divulga un procedimiento para determinar la concentración de los iones de calcio en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) mezclar la muestra con una solución que comprende un compuesto de fórmula I

Fórmula I



en la que R1 se selecciona de hidrógeno, halógeno, carboxi, alquilo y formilo, R2 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo, alcoxi, morfolino, CN, carboxi y formilo, R3 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, N-alquilsulfato, carboxi, alcoxi, fenilo, CN, CF₃, y terc-butilo, R4 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno o alquilo, R5 y R7 son independientemente hidrógeno o alquilo, R6 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alcoxi y halógeno, o en la que R3 y R4 forman un puente aromático y X⁺, es un contraión cargado positivamente, uniendo de este modo los iones de calcio al compuesto, b) liberar los iones de calcio del compuesto, en el que dicha liberación provoca un cambio en la absorbancia del compuesto, c) medir el cambio en la absorbancia, y d) usar el cambio en la absorbancia medida en (c) para determinar la concentración de los iones de calcio.

El halógeno mencionado como sustituyente candidato R1, R2, R3, R4 y/o R6 se selecciona preferentemente de Cl⁻, Br⁻ y F⁻.

En un modo de realización preferente, el sustituyente R1 y/o R2, y/o R3 es carboxi.

Alquilo como se menciona para R1, R2, R4, R5, R6, y/o R7 es preferentemente alquilo C1 a C3.

Alcoxi como se menciona para R2, R3, y/o R6 es preferentemente metoxi o etoxi.

El puente aromático entre R3 y R4 es preferentemente parte de un sistema de anillo de benceno

El contraión X⁺ se selecciona preferentemente del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, Li⁺ y Cs⁺. Además, X⁺ preferente es K⁺ o Na⁺.

Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" quiere decir un marcador o más de un marcador. El término "al menos" se usa para indicar que pueden estar presentes opcionalmente uno o más de otros objetos.

La expresión "uno o más" indica de 1 a 50, preferentemente de 1 a 20, también es preferente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15. Un compuesto de acuerdo con la fórmula I se puede unir a los iones de calcio. Tras la unión o tras la liberación de calcio tiene lugar un cambio en sus características espectrales. Este cambio en las características espectrales se puede medir fácilmente y está directamente correlacionado con la concentración de los iones de calcio presentes en una muestra.

Se ha descubierto que es ventajoso unir en primer lugar todos los iones de calcio presentes en una muestra que se va a analizar al compuesto de fórmula I. De este modo se obtiene un valor de referencia estable. Dicho valor de referencia estable es especialmente valioso para medir concentraciones bajas de los iones de calcio. Tras la liberación de los iones de calcio del compuesto de acuerdo con la fórmula I, se induce un cambio medible en sus características espectrales que se puede usar para determinar exactamente la concentración de los iones de calcio presentes en una muestra.

El compuesto de fórmula I puede unir eficazmente los iones de calcio sobre un intervalo de pH amplio. Se puede observar una unión a calcio eficaz de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 11,0. En un modo de realización, se practica el procedimiento de acuerdo con la presente invención bajo condiciones en las que el pH en la mezcla de ensayo que comprende el compuesto de acuerdo con la fórmula I y la muestra está entre pH 5,0 y pH 11,0. La mezcla de reacción contiene al menos una alícuota de una muestra y un compuesto de acuerdo con la fórmula I. En otros modos de realización preferentes, el pH en la mezcla de reacción será de pH 5,0 o superior, de pH 5,5 o superior, de pH 6,0 o superior, de pH 6,5 o a pH 11 o inferior, además pH 10 o inferior, pH 9,0 o inferior, pH 8,0 o inferior.

La concentración final para un compuesto de acuerdo con la fórmula I se ajusta para que sea lo suficientemente alta para una medida fiable de los iones de calcio en una muestra. Debido a la alta sensibilidad lograda al medir los iones de calcio usando un compuesto de fórmula I, una muestra clínica como suero o plasma se puede diluir, por ejemplo, aproximadamente 100 veces y todavía se mediría con fiabilidad. Como es obvio para el experto en la técnica, la concentración final de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en una mezcla de ensayo tiene que coincidir con la concentración final de los iones de calcio en dicha mezcla de ensayo. En un modo de realización preferente, se practicará el procedimiento divulgado usando un compuesto de acuerdo con la fórmula I en una concentración final que es al menos 1,5 veces el límite superior esperado para la concentración final de los iones de calcio.

Como se menciona, una muestra que tiene 5 mmol/l de iones de calcio se debe medir con fiabilidad, este es el límite superior esperado. En el caso de que dicha muestra se diluya a 1:100, la concentración final de los iones de calcio en la mezcla de ensayo será de 0,05 mmol/l. La concentración final del compuesto de acuerdo con la fórmula I debe ser al menos 1,5 veces esta concentración, es decir 0,075 mmol/l. También preferente, la concentración final de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en una mezcla de ensayo será de al menos 2 veces, 2,5 veces, 3 veces y como máximo 20 veces, 15 veces o 10 veces la concentración de iones de calcio calculada para una muestra que tiene el límite superior esperado de 5 mmol/l. Preferentemente, la concentración final de un compuesto de acuerdo con la fórmula I en una mezcla de ensayo será de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces y como máximo 20 veces, 15 veces o 10 veces la concentración molar obtenida multiplicando 5 mmol/l con el factor de dilución para la muestra.

Se ha descubierto que la estabilidad prolongada en solución de un compuesto de acuerdo con la fórmula I se preserva mejor a un pH de 8,5 o superior. Es preferente el uso de un reactivo que comprenda un compuesto de acuerdo con la fórmula I que no necesite estar recién preparado ni comprobado con frecuencia para determinar su funcionalidad, por lo tanto, en un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la reivindicación de la presente invención se practica con una solución que comprende el compuesto de fórmula I que tiene un pH en el intervalo de pH 8,5 a pH 11,5.

En modos de realización preferentes alternativos, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza con una solución que comprende el compuesto de fórmula I que tiene un pH en el intervalo de pH 8,5 a pH 11,0 o de pH 9,0 a pH 10,5.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que R1 es hidrógeno o bien halógeno.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que R2 es hidrógeno, halógeno, carboxi, morfolino o alquilo.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que R3 es hidrógeno, halógeno, carboxi o alcoxi.

En un modo de realización, un compuesto de acuerdo con la fórmula I para su uso en un procedimiento como se divulga en la presente invención se debe unir preferentemente a los iones de calcio con una constante de unión de $\log k$ igual a 9,0 o inferior. Por otra parte, la constante de unión de para los iones de calcio descrita como $\log k$ debe ser de al menos 4,0 o mayor. Preferentemente, la constante de unión para los iones de calcio dada en $\log k$ debe ser de entre 4,5 y 8,5, también preferente, el $\log k$ será de entre 5,0 y 8,0.

El $\log k$ se mide de acuerdo con el procedimiento descrito en Harrison, S.M. y Bers, D.M., *Biochimica et Biophysica Acta* 925 (1987) 133 - 143. En resumen, el compuesto de unión a calcio se tampona a pH 7,0 en tampón Hepes 25 mM. La temperatura se mantiene constante a 20 °C. Se incuban varias concentraciones de iones de calcio con una cantidad constante de compuesto de unión a calcio. Se determinan las fracciones de iones de calcio libres y unidos y la constante de afinidad calculada con la ayuda de la representación de Scatchard.

Tal como apreciará el experto en la técnica, son posibles varias combinaciones de sustituyentes. Los sustituyentes se pueden elegir y usar para influenciar o modular la constante de unión de un compuesto de acuerdo con la fórmula I. Los grupos que retiran electrones darán lugar a una reducción en la constante de unión mientras que los grupos que donan electrones, en general, darán como resultado una unión más fuerte de los iones de calcio.

Preferentemente, los sustituyentes para el compuesto de fórmula I se seleccionan para dar como resultado una constante de unión, dada como log k, de 7,0 o menor, también preferente de un log k de entre 4,0 y 7,0, de entre 4,5 y 6,5 o de entre 5,0 a 6,0.

- 5 También puede ser posible combinar dos o más compuestos de acuerdo con la fórmula I con el fin de realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización preferente, se usa un único compuesto de acuerdo con la fórmula I.

- 10 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en la valoración por retroceso, es decir, en primer lugar los iones de calcio se unen al compuesto de fórmula I y a continuación se liberan. La liberación de los iones de calcio del compuesto de acuerdo con la fórmula I se logra más fácilmente por el uso de un quelante que se une a los iones de calcio de forma más fuerte que el compuesto de acuerdo con la fórmula I. En un modo de realización preferente, el quelante usado para la liberación de los iones de calcio en la etapa b) del procedimiento divulgado en el presente documento anteriormente tiene una constante de unión que es 10 veces mayor en comparación con el compuesto de fórmula I usado en el procedimiento de detección de calcio.

- 15 Cuando sea posible, por ejemplo, combinar un compuesto de unión a calcio de acuerdo con la fórmula I con un log k de 5,0 con un quelante que tiene un log k de 6,0, es preferente el uso de un quelante que tenga al menos un log k de 7,0 o mayor. Como es obvio para el experto en la técnica, el reactivo usado para liberar los iones de calcio de un compuesto de acuerdo con la fórmula I se elige mejor para que tenga características espectrales que no interfieran con los de interés, por ejemplo con el espectro de absorción o emisión de un compuesto de acuerdo con la fórmula I.

- 20 Preferentemente, el reactivo/quelante usado para la liberación de calcio de los compuestos de acuerdo con la fórmula I en un procedimiento como se divulga en el presente documento se selecciona de derivados de ácido di-, tri-, tetra-acético, derivados de ácidos poli-fosfónicos o ácido fosfórico, 4,4'-difluoro-BAPTA, 5,5'-dibromo-BAPTA, 5,5'-difluoro-BAPTA, 5-metil-5'-formilo-BAPTA, 5,5'-dimetil-BAPTA, ácido (1,2-ciclohexilendinitrilo)tetraacético (CETA), ácido cítrico, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido iminodiacético (IDA), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (HIDA), ácido N-(2-hidroxietil)etilendiamina-N,N',N'-triácético (= HEDTA; CAS 150-39-0, log k = 8,14), CyDTA (= CAS 125572-95-4, log k = 12,50), TTHA (= CAS 869-52-3, log k = 10,06), Me-EDTA (= ácido 1,2-propanpndiamina-N,N,N',N'-tetraacético, log k = 10,4), BAPTA (= CAS 73630-08-7, log K 6,97), DTPA (= ácido dietilentriaminopentaacético; N.º CAS: 67-43-6, log k = 10,8), EGTA (= ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N,N-tetraacético; N.º CAS: 67-42-5, log k = 10,9), DTPMP, (= ácido dietilentriaminpenta(metilenfosfónico); N.º CAS: 15827-60-8, log k = 10,7) y EDPMP (= ácido etilendiamintetra(metilenfosfónico); N.º CAS: 1429-50-1, log k = 10,2).

- 35 También preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica de modo que la liberación de los iones de calcio se desencadena por EDTA, DTPA, EGTA, DTPMP y/o EDPMP.

- 40 La elección del quelante usado para liberar los iones de calcio de un compuesto de acuerdo con la fórmula I no es crítica, siempre que los iones de calcio unidos al compuesto de fórmula I se liberen después de la adición de dicho quelante. Preferentemente, la concentración del quelante en la mezcla de reacción final será al menos equimolar pero no mayor de 100 veces la concentración del compuesto de acuerdo con la fórmula I en esta mezcla. Para una mayor seguridad, por ejemplo, para compensar los errores menores al pipetear, se puede usar un excedente de quelante. En un modo de realización, cuando se realiza el procedimiento como se divulga en el presente documento, la concentración del quelante en la mezcla de reacción final es mayor que la concentración final para el compuesto de fórmula I, por ejemplo de entre 1,5 veces y 50 veces o también preferente, de entre 2 veces y 10 veces.

- 45 Un reactivo usado en química clínica rutinaria para la medida de los iones de calcio debe ser estable en condiciones de transporte y almacenamiento prolongado. Se ha descubierto que un compuesto de acuerdo con la fórmula I no es tan estable a pH ácido o neutro como bajo condiciones de tampón alcalino. Las composiciones de reactivo que comprenden un compuesto de acuerdo con la fórmula I deben tener al menos un pH de 8,5 o el pH debe ser mayor. En un modo de realización preferente, la presente invención divulga un reactivo para la medida de los iones de calcio que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5, y que contiene un compuesto de fórmula I como se define en la reivindicación 1.

- 50 En modos de realización preferentes alternativos, el reactivo de acuerdo con la presente invención tiene un pH en el intervalo de pH 8,5 a pH 11,0 o de pH 9,0 a pH 10,5.

- 55 Los sistemas de tampón que son apropiados para tamponar una solución a un pH de 8,5 y/o mayor son bien conocidos por el experto en la técnica. Preferentemente, dicho sistema de tampón se seleccionará de AMPD (= 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), CHES (= ácido 2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico), AMPSO (= ácido 3-[dimetil(hidroximetil)-metilamino]-2-hidroxipropanosulfónico), CAPSO (= ácido (3-ciclohexilamino)-2-hidroxipropanosulfónico), CAPS (= ácido (3-ciclohexilamino)-2-propanosulfónico), un sistema de tampón de glicina, o un sistema de tampón de carbonato. También preferente, el reactivo para la medida de los iones de calcio de acuerdo con la presente invención comprenderá un sistema de tampón, seleccionado de CAPS o CAPSO.

65

Como se menciona además anteriormente, la concentración de calcio en la circulación está estrechamente regulada y las concentraciones fisiológicas normalmente son de entre 2,20 a 2,55 mmol/l. Los niveles elevados de los iones de calcio en la circulación rara vez suben por encima de 4 mmol/l. Por este motivo, normalmente los reactivos adaptados para medir los iones de calcio en la circulación se fabrican para cubrir un intervalo de medida de hasta 5 mmol/l. El reactivo para la medida de calcio debe coincidir con las concentraciones fisiológicamente relevantes. En la orina, sin embargo, las concentraciones de calcio pueden variar en gran parte. Esto requiere que un ensayo para la medida de calcio también deba cubrir un intervalo de medida grande.

En un modo de realización preferente, el reactivo para la medida de calcio comprende un compuesto de fórmula I en una concentración que varía de 0,10 mmol/l a 50 mmol/l.

Tal como apreciará el experto en la técnica, la concentración final de un compuesto de fórmula I en la mezcla de ensayo, que comprende la muestra que se va a medir, debe coincidir con la concentración de los iones de calcio en la muestra. En un modo de realización, la concentración del compuesto de acuerdo con la fórmula I estará en el intervalo de 0,10 mmol/l a 2 mmol/l. En modos de realización alternativos, la concentración del compuesto de acuerdo con la fórmula I estará en el intervalo de 0,1, 0,125, 0,15, o 0,2 a 2,0, 1,5 o 1 mmol/l. Este reactivo se puede mezclar con la muestra que se va a medir usada sin dilución adicional.

En otro modo de realización, se proporciona un reactivo más concentrado para la medida de calcio, basado en el compuesto de fórmula I. Dicho reactivo más concentrado se puede diluir apropiadamente para la medida de una muestra. La forma concentrada de un reactivo de acuerdo con la presente invención comprenderá un compuesto de acuerdo con la fórmula I en un intervalo de 0,5 a 50 mmol/l. En modos de realización alternativos, la concentración del compuesto de acuerdo con la fórmula I en un reactivo más concentrado para la detección de los iones de calcio estará en el intervalo de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 mmol/l a 50, 40, 30, 20, 15 o 10 mmol/l.

En otro modo de realización preferente, el reactivo para la medida de calcio como se divulga en la presente invención comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que R1 es hidrógeno o bien halógeno.

En otro modo de realización preferente, el reactivo para la medida de calcio como se divulga en la presente invención comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que R2 es hidrógeno, halógeno, carboxi, morfolino o alquilo.

En otro modo de realización preferente, el reactivo para la medida de calcio como se divulga en la presente invención comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I, en la que el R3 de la fórmula I es hidrógeno, halógeno, carboxi o alcoxi.

Se ha descubierto que es ventajoso añadir además un detergente a un reactivo para la medida de los iones de calcio, esto se puede deber a la reducción de la interferencia en la unión inespecífica, a la reducción de la espuma y las burbujas de aire u otras influencias positivas. En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un reactivo para la medida de los iones de calcio que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5, que contiene un compuesto de fórmula I como se define en la reivindicación 1 y un detergente.

Como se usa en el presente documento, el término "detergente" quiere decir un detergente iónico o un detergente no iónico. Los ejemplos de detergentes incluyen, pero no se limitan a: dodecilsulfato de sodio (SDS), sales de ácidos grasos, la familia Triton®, octil-glucósido, 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), dodecilmaltósido de sodio (DM), óxido de laurildietilamina (LDAO), NP-40 y la familia Tween®, aminas primarias, acetatos y clorhidratos de aminas, sales de amonio cuaternario, bromuro de trimetiletilamonio, amidas de diaminas sustituidas, dietanolaminopropilamina o dietilaminopropilamida, amidas de dietilentriamina ciclada, sulfonatos de alquilarilo, sulfonatos de petróleo, glicéridos sulfonados, colamidas, sulfobetainas, alquilglucósidos, saponinas, éteres alquílicos de polietilenglicol.

En un modo de realización, el detergente es un detergente no iónico. Los ejemplos no limitantes de detergentes no iónicos son Imbentin V413/91, Thesit, Triton® X-100, Triton® X-114, Brij® 35, Brij® 58, Tween® 20, Tween® 80, Nonidet® P-40, octil-β-glucósido y MEGA 8-octanoil-N-metilglucamida. En un modo de realización, el detergente no iónico se selecciona de Brij® 35, Triton® X-100, Tween® 20 y Nonidet® P-40.

Como se menciona además anteriormente, la concentración de los iones de calcio es un parámetro importante en el diagnóstico rutinario clínico. Preferentemente, los reactivos para la medida de calcio se ensamblan en forma de un kit que comprende al menos un reactivo que contiene un indicador de calcio, como los compuestos usados actualmente o un compuesto de acuerdo con la fórmula I como se describe en la presente invención. En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un kit de prueba para la medida de calcio, conteniendo el kit de prueba un reactivo que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5.

En muchos casos será ventajoso incluir al menos dos reactivos en un kit adaptado para medir los iones de calcio, un primer reactivo que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH

11,50 y un segundo reactivo que comprende un quelante. En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un kit que contiene un primer reactivo que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula I y que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,50 y un segundo reactivo que comprende un quelante para los iones de calcio. Opcionalmente, el kit también puede comprender instrucciones de uso y/o uno o más reactivos adicionales.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 La síntesis de NM-BAPTA se representa esquemáticamente en la figura 1.

Figura 2 Medida de los iones de calcio de acuerdo con el procedimiento dado en el ejemplo 2, última columna, en el analizador Modular P de Roche Diagnostics, Alemania. En la parte superior (A) el valor teórico y el valor medido realmente se representan uno frente a otro. En la parte inferior (B) se da el % de recuperación, es decir, se da el valor medido realmente como el porcentaje del valor (teórico) esperado.

Figura 3 Medida de los iones de calcio de acuerdo con el procedimiento dado en el ejemplo 2, columna central, en el analizador cobas c501 de Roche Diagnostics, Alemania. En la parte superior (A) el valor teórico y el valor medido realmente se representan uno frente a otro. En la parte inferior (B) se da el % de recuperación, es decir, se da el valor medido realmente como el porcentaje del valor (teórico) esperado.

Figura 4 Medida de los iones de calcio de acuerdo con el procedimiento dado en el ejemplo 2, última columna, en el analizador Modular P de Roche Diagnostics, Alemania. La concentración de NM-BAPTA se ha reducido hasta un 90 % de la concentración estándar. En la parte superior (A) el valor teórico y el valor medido realmente se representan uno frente a otro. En la parte inferior (B) se da el % de recuperación, es decir, se da el valor medido realmente como el porcentaje del valor (teórico) esperado.

Figura 5 Medida de los iones de calcio de acuerdo con el procedimiento dado en el ejemplo 2, última columna, en el analizador Modular P de Roche Diagnostics, Alemania. La concentración de NM-BAPTA se ha reducido hasta un 80 % de la concentración estándar. En la parte superior (A) el valor teórico y el valor medido realmente se representan uno frente a otro. En la parte inferior (B) se da el % de recuperación, es decir, se da el valor medido realmente como el porcentaje del valor (teórico) esperado.

Figura 6 La síntesis de NF-BAPTA se representa esquemáticamente en la figura 6.

Figura 7 Se dan los espectros de absorbancia para NM-BAPTA y NF-BAPTA, respectivamente, tanto en presencia como en ausencia de los iones de calcio, respectivamente. La explicación para los cuatro espectros se da debajo de la figura.

Ejemplo 1

Síntesis de NM-BAPTA

La síntesis de NM-BAPTA se representa esquemáticamente en la figura 1.

a) 1-(2-cloro-etoxi)-2-nitro-benceno

Se disolvieron 2-nitro-fenol (168,7 g) y éster 2-cloroetilico del ácido toluen-4-sulfónico (100 g) en 500 ml de DMF y se agitó durante 1 h a 110-120 °C después de añadir con cuidado 199 g de carbonato de potasio. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de hielo picado y agua (8 l) que se agitó enérgicamente. Se separó por filtración el residuo, se lavó varias veces con agua y se secó. Rendimiento: 100-120 g

b) 4-Metil-1-nitro-2-(2-(2-nitro-fenoxi)-etoxi)-benceno

Se disolvieron 1-(2-cloro-etoxi)-2-nitro-benceno (116 g) y 5-metil-2-nitro-fenol (88 g) en 500 ml de DMF y se agitó durante 4 h a 90-110 °C después de añadir con cuidado 160 g de carbonato de potasio. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de hielo picado y agua (8 l) que se agitó enérgicamente. Se separó por filtración el residuo, se lavó varias veces con agua y se secó. Se suspendió el producto en bruto en metanol y se volvió a separar por filtración el residuo de color amarillo pálido, se lavó con metanol y se secó. Rendimiento: 150-165 g.

c) 2-(2-(2-Amino-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenilamina

Se suspendieron 100 g de 4-metil-1-nitro-2-(2-(2-nitro-fenoxi)-etoxi)-benceno y 10 g de paladio sobre carbón vegetal en 3,5 l de dioxano y se hidrogenó a temperatura ambiente bajo una presión de hidrógeno de 5,5 bar (0,5 MPa).

Después de descargar rápidamente tres veces nitrógeno, se separó por filtración el catalizador bajo una atmósfera de nitrógeno y se evaporó la solución restante y se secó el producto a vacío. Rendimiento: 80 g

d) Éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenil)-metoxicarbonil-metilamino)-acético

Se disolvió 2-(2-(2-amino-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenilamina (80 g) en 2,5 l de DMF y se añadieron 285 ml de éster metílico del ácido bromo-acético, 429 g de carbonato de potasio, y 36,8 g de yoduro de sodio. Se calentó la mezcla de reacción hasta 80 °C durante 2 h. Después de la evaporación del éster metílico del ácido bromo-acético restante, se retiró del producto con hexano. El producto en bruto se purificó adicionalmente por cristalización en metanol. Rendimiento: 93 g

e) Éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-5-nitro-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético

Se disolvieron 50 g de éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético en 600 ml de ácido acético glacial. Bajo agitación enérgica, se añadieron 91,5 ml de ácido nítrico 1 molar en ácido acético glacial y en una segunda etapa, se añadieron 28 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se incrementó la temperatura hasta 30 °C. Se vertió directamente la mezcla de reacción en una mezcla 10 l de hielo/agua. Se separó por filtración el residuo, se lavó varias veces con agua y se secó a vacío. Se purificó adicionalmente el producto en bruto por cromatografía en columna en gel de sílice, en primer lugar con hexano /éster etílico del ácido acético (1:1) como eluyente y una segunda vez con tolueno/acetronitrilo (1:1) como eluyente. Se cristalizó finalmente el producto a partir de propan-2-ol. Rendimiento: 20 g

f) NM-BAPTA; sal de potasio del ácido ((2-(2-(2-(bis-carboximetil-amino)-5-nitro-fenoxil)-etoxi)-4-metil-fenil)-carboximetil-amino)-acético

Se disolvieron 9,5 g de éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-5-nitro-fenoxi)-etoxi)-4-metil-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético en una mezcla de agua/metanol (230 ml cada uno) y se añadieron 160 ml de solución de hidróxido de potasio 1 molar. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 1 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente y añadir 250 ml de agua, se ajustó el pH de la solución a pH 3 y se evaporó el metanol. Se aisló el producto por extracción de disolvente con éster etílico de ácido. Después de la evaporación, se secó el producto a vacío.

Se disolvió el ácido ((2-(2-(2-(bis-carboximetil-amino)-5-nitro-fenoxil)-etoxi)-4-metil-fenil)-carboximetil-amino)-acético en metanol y se añadió el hidróxido de potasio equimolar en metanol. Después de la evaporación y el secado, se pudo aislar la sal de potasio aislada. Rendimiento: 9 g

Ejemplo

Procedimiento general para la medida de iones de calcio con NM-BAPTA

La medida de los iones de calcio con compuesto de tipo mono-nitro-BAPTA de acuerdo con la fórmula I se realiza en un procedimiento de valoración por retroceso.

Se mezcla una alícuota de la muestra de interés con una solución que comprende el compuesto de tipo mono-nitro-BAPTA y se incuba. En los analizadores automáticos de Roche Diagnostics, Alemania, este reactivo se denomina R1. Se realiza la incubación hasta que se obtiene una señal de valor de referencia estable. Normalmente, se obtiene una señal de valor de referencia estable en menos de 10 min, principalmente dentro de 2 a 5 min.

A continuación, se analiza la mezcla de muestra y R1 (opcionalmente diluida, por ejemplo con agua destilada), es decir, se miden los valores de absorbancia a la(s) longitud(es) de onda más apropiada(s) o se mide un espectro.

A continuación, se liberan los iones de calcio unidos a un compuesto de acuerdo con la fórmula I por la adición de un agente de liberación, por ejemplo EDTA. Este segundo reactivo se denomina R2 en los analizadores automáticos de Roche Diagnostics, Alemania. Cuando se requiera, se puede diluir adicionalmente la mezcla con agua destilada.

A continuación, se analiza la mezcla final de muestra, R1 y R2 (opcionalmente diluida, por ejemplo con agua destilada), es decir, se miden los valores de absorbancia a la(s) longitud(es) de onda más apropiada(s) o se mide un espectro.

El cambio en la absorbancia está directamente correlacionado con la concentración de los iones de calcio en la muestra de interés y se calcula la concentración de los iones de calcio de acuerdo con procedimientos estándar.

En la tabla I se da una visión general de las aplicaciones recomendadas para la medida de los iones de calcio en cinco analizadores automatizado diferentes de Roche Diagnostics, Alemania. Las aplicaciones recomendadas para el analizador Modular P y el Modular D son idénticas.

5

Tabla 1:

Volúmenes de pipeteo recomendados (en µl) para la medida de los iones de calcio				
	HiCo R1 Integra	HiCo R1 cobas	LoCo R1 Roche/Hitachi 902	LoCo R1 Modular D / Modular P
R1 (reactivo 1)	20	20	250	180
D (agua destilada)	100	130	---	---
S (muestra)	3	3	4	3
D (agua destilada)	30	---	---	---
R2 (reactivo 2)	20	20	28	20
D (agua destilada)	50	50	---	---
volumen total de final	mezcla 223	223	282	203
HiCo R1 = reactivo R1 con alta concentración; LoCo R1 = reactivo R1 con baja concentración; Integra, cobas, Roche/Hitachi 902, Modular D y Modular P son sistemas de analizadores distribuidos por Roche Diagnostics, Alemania.				

Tabla 2:

Composiciones de HiCo R1, LoCo R1 y R2, respectivamente						
	tampón	pH	Brij-35	NaCl	NM-BAPTA	NaN ₃
HiCo-R1	557 mmol/l CAPSO	10,0	0,123 %	---	1,68 mmol/l	0,09 %
LoCo-R1	57 mmol/l CAPSO	10,0	0,012 %	0,9 %	0,20 mmol/l	0,09 %
R2	7,5 mmol/l K ₃ -EDTA	7,3	0,012 %	0,9 %	---	0,09 %

10

Ejemplo 3

Linealidad de la medida de calcio usando NM-BAPTA

15 El procedimiento para la medida de los iones de calcio divulgado en la presente invención es técnicamente excelente, por ejemplo, muestra una precisión muy alta. Esto se hace evidente, por ejemplo, si se comparan los valores teóricos esperados y los medidos realmente.

20 Las diferentes concentraciones de los iones de calcio (→ valores teóricos) se comparan con los valores reales medidos en el nuevo procedimiento.

25 Sólo dos ejemplos representativos, con valores medidos en dos analizadores diferentes, Modular P y cobas c501 (ambos distribuidos por Roche Diagnostics), respectivamente, se dan como las figuras 2 y 3. Estas dos figuras demuestran la calidad/precisión técnica excepcional de las medidas. Como es obvio de las figuras 2 y 3, todos los valores medidos realmente están dentro de un 95 a un 105 % del correspondiente valor teórico esperado, lo que se traduce en una medida más exacta de los iones de calcio en todo el intervalo de concentraciones investigado.

Ejemplo 4

30 Determinación de la concentración mínima de NM-BAPTA

La concentración de los iones de calcio en la circulación rara vez excede de 4 mmol/l. Un reactivo que puede medir hasta 5 mmol/l de calcio de modo fiable debe ser el más apropiado para determinar los iones de calcio en la circulación.

35

Se han medido varias concentraciones de los iones de calcio (valores esperados en las figuras 4 y 5) en el instrumento Modular P con la aplicación descrita en la última columna de la tabla 1. Sin embargo, sólo se ha usado un 90 % o un 80 %, respectivamente, de la concentración regular de NM-BAPTA. Como se puede observar de las figuras 4 y 5, respectivamente, incluso si sólo está presente un 80 % de NM-BAPTA en la mezcla de detección en comparación con el procedimiento estándar dado en el ejemplo 2, todavía se recuperan iones de calcio hasta 5 mmol/l a entre un 95 a un

40

105 %. Como es obvio de la figura 5, los valores por encima de 5 mM tienden a recuperarse con valores demasiado bajos si la concentración de NM-BAPTA se reduce a un 80 %. Esto quiere decir que para la medida de las concentraciones altas de calcio presentes en algunas muestras patológicas (en el caso de que dicha muestra esté diluida a aproximadamente 1:70 como en el ejemplo anterior), la concentración final de NM-BAPTA debe ser de aproximadamente 0,2 mmol/l con el fin de asegurar una medida correcta de los iones de calcio en esas muestras.

Ejemplo 5

Estabilidad dependiente del pH de NM-BAPTA

Un reactivo para la medida de calcio debe ser lo más estable como sea posible tanto bajo condiciones de transporte como a bordo de un analizador.

Con el fin de investigar su estabilidad, NM-BAPTA se ha almacenado a diferentes valores de pH. Se ha aplicado un modelo extremo a corto plazo y se ha almacenado el reactivo que contiene NM-BAPTA a 35 °C. Se ha usado el reactivo "en condiciones extremas" en la medida de los iones de calcio bajo condiciones de otro modo idénticas usando alícuotas de las mismas muestras. Los valores medidos después de someter el reactivo a condiciones extremas se han comparado con los valores medidos con un reactivo sin condiciones extremas el día cero, es decir, el día en el que se inició la condición extrema de temperatura sobre el reactivo.

Los sistemas de tampón usados fueron 100 mmol/l de HEPES a pH 7,4, 50 mmol/l de Tris a pH 8,0, 50 mmol/l de NaHCO₃ a pH 10,0, 50 mmol/l de glicina a pH 9,8, y 40 mmol/l de CAPSO a pH 10, respectivamente. Los datos correspondientes se resumen en las tablas 3 a 7.

Tabla 3:

Estabilidad de NM-BAPTA en 100 mmol/l de HEPES pH 7,4 a 35 °C						
		día 0	día 0 Mediana	semana 1	semana 1 Mediana	Recuperación del día 0
0,9 % NaCl	calibrador	0,11		0,07		
		0,10	0,10	0,17	0,15	
objetivo	0,0	0,08		0,15		
Calibrador	calibrador	2,55		1,91		
		2,51	2,54	1,94	1,94	76,4 %
objetivo	2,5	2,54		1,95		
PNU	control	2,20		1,82		
lote	176136	2,07	2,08	1,64	1,69	81,3 %
objetivo	2,05	2,08		1,69		
PPU	control	3,08		2,29		
lote	174531	3,09	3,09	2,27	2,29	74,1 %
objetivo	3,32	3,12		2,29		
Suero humano 1	muestra	2,23		1,74		
		2,24	2,24	1,76	1,76	78,6 %
		2,25		1,76		
Suero humano 2	muestra	2,14		1,66		
		2,14	2,14	1,60	1,64	76,6 %
		2,12		1,64		
Plasma humano 1	muestra	1,82		1,47		
		1,82	1,82	1,42	1,42	78,0 %
		1,82		1,40		
Plasma humano 2	muestra	1,79		1,42		
		1,80	1,80	1,40	1,40	77,8 %
		1,84		1,40		

Como es obvio de la tabla 3, el reactivo que contiene NM-BAPTA no es estable a pH 7,4. La recuperación de los iones de calcio está sólo en el intervalo de un 80 % o inferior.

Tabla 4:

5

Estabilidad de NM-BAPTA en 50 mmol/l de TRIS pH 8,0 a 35 °C						
Como es obvio de la tabla 4, el reactivo que contiene NM-BAPTA tiene una estabilidad límite, pero aún aceptable, a pH 8,0. La recuperación de los iones de calcio está principalmente en el intervalo de un 80 % a un 90 %.						
		día 0	día 0 Mediana	semana 1	semana 1 Mediana	Recuperación del día 0
0,9 % NaCl	calibrador	0,02		0,11		
		0,00	0,00	0,15	0,15	
objetivo	0,0	0,00		0,16		
Calibrador	calibrador	2,49		2,10		
		2,48	2,49	2,13	2,12	85,1 %
objetivo	2,5	2,49		2,12		
PNU	control	2,04		1,80		
lote	176136	2,02	2,02	1,77	1,80	89,1 %
objetivo	2,05	2,01		1,80		
PPU	control	3,12		2,47		
lote	174531	3,09	3,09	2,46	2,47	79,9 %
objetivo	3,32	3,07		2,47		
Suero humano 1	muestra	2,21		1,97		
		2,20	2,21	1,93	1,97	89,1 %
		2,22		1,97		
Suero humano 2	muestra	2,07		1,79		
		2,08	2,08	1,81	1,81	87,0 %
		2,08		1,84		
Plasma humano 1	muestra	1,80		1,55		
		1,80	1,80	1,55	1,55	86,1 %
		1,77		1,55		
Plasma humano 2	muestra	1,77		1,54		
		1,77	1,77	1,54	1,54	87,0 %
		1,78		1,54		

Tabla 5:

Estabilidad de NM-BAPTA en 50 mmol/l de NaHCO ₃ pH 10,0 a 35 °C						
		Día 0	día 0 Mediana	semana 1	semana 1 Mediana	Recuperación del día 0
0,9 % NaCl	calibrador	0,04		0,13		
		0,01	0,01	0,13	0,13	
objetivo	0,0	0,01		0,11		
Calibrador	calibrador	2,48		2,53		
		2,48	2,48	2,57	2,57	103,6 %
objetivo	2,5	2,46		2,59		
PNU	control	2,04		2,04		
lote	176136	1,98	1,98	2,04	2,04	103,0 %
objetivo	2,05	1,98		2,03		
PPU	control	3,10		3,16		
lote	174531	3,08	3,08	3,20	3,17	102,9 %
objetivo	3,32	3,07		3,17		
Suero humano 1	muestra	2,18		2,21		
		2,21	2,18	2,26	2,24	102,8 %
		2,18		2,24		
Suero humano 2	muestra	2,02		2,10		
		2,05	2,05	2,11	2,11	102,9 %
		2,05		2,19		
Plasma humano 1	muestra	1,75		1,88		
		1,76	1,76	1,80	1,81	102,8 %
		1,76		1,81		
Plasma humano 2	muestra	1,73		1,78		
		1,74	1,74	1,81	1,80	103,4 %
		1,75		1,80		

Tabla 6:

Estabilidad de NM-BAPTA en 50 mmol/l de glicina pH 9,8 a 35 °C						
		Día 0	día 0 Mediana	semana 1	semana 1 Mediana	Recuperación del día 0
0,9 % NaCl	calibrador	-0,03		-0,03		
		-0,05	-0,05	-0,05	-0,03	
objetivo	0,0	-0,05		-0,03		
CACO ₃	calibrador	2,48		2,49		
		2,52	2,48	2,45	2,46	99,2 %
objetivo	2,5	2,47		2,46		
PNU	control	2,07		2,05		
lote	176136	2,07	2,07	2,08	2,05	99,0 %
objetivo	2,05	2,01		2,02		
PPU	control	3,11		3,07		
lote	174531	3,09	3,09	3,12	3,12	101,0 %
objetivo	3,32	3,04		3,12		
Suero humano 1	muestra	2,26		2,22		
		2,29	2,26	2,23	2,23	98,7 %
		2,26		2,23		
Suero humano 2	muestra	2,34		2,24		
		2,32	2,34	2,25	2,25	96,2 %
		2,34		2,28		
Plasma humano 1	muestra	1,91		1,75		
		1,88	1,89	1,73	1,73	91,5 %
		1,89		1,73		
Plasma humano 2	muestra	1,92		1,69		
		1,76	1,76	1,72	1,71	97,2 %
		1,75		1,71		

Tabla 7:

Estabilidad de NM-BAPTA en 40 mmol/l de CAPSO, pH 10,0 a 35 °C						
		día 0	día 0 Mediana	día 7	día 7 Mediana	Recuperación del día 0
0,9 % NaCl	calibrador	-0,02		-0,08		
		-0,01	-0,02	-0,11	-0,09	
objetivo	0,0	-0,04		-0,09		
Calibrador	calibrador	2,50		2,47		
		2,58	2,57	2,47	2,47	95,9 %
Sollwert	2,5	2,57		2,42		
PNU	control	2,21		2,14		
lote	179596	2,17	2,19	2,12	2,12	96,6 %
objetivo	2,12	2,19		2,08		
PPU	control	3,39		3,28		
lote	176287	3,35	3,35	3,30	3,29	98,2 %
objetivo	3,26	3,31		3,29		
Suero humano 1	Sonda	2,09		1,99		
		2,12	2,09	2,07	2,02	96,7 %
		2,06		2,02		
Suero humano 2	Sonda	2,20		2,16		
		2,20	2,20	2,11	2,16	98,4 %
		2,21		2,20		
Plasma humano 1	Sonda	2,04		2,07		
		2,06	2,06	2,03	2,03	98,4 %
		2,08		1,97		
Plasma humano 2	Sonda	2,12		2,06		
		2,05	2,11	2,06	2,06	97,8 %
		2,11		2,09		

Como es obvio de las tablas 5 a 7, el reactivo divulgado en la presente solicitud tiene una estabilidad excelente a un pH de alrededor de 10. La recuperación de los iones de calcio después de someter dicho reactivo a condiciones extremas de 35 °C durante una semana es excelente y en general está en el intervalo deseado de entre un 90 % a un 110 %, principalmente incluso entre un 95 % y un 105 %. Esta alta estabilidad se puede lograr independientemente del sistema de tampón usado.

10 Ejemplo 6

No se produce interferencia por magnesio en las medidas de calcio usando NM-BAPTA

Una muestra que comprende iones de calcio en una concentración fisiológica de 2,53 mmol/l se ha enriquecido con de 0 a 15 mmol/l de iones de magnesio. Se midieron las muestras enriquecidas en un analizador Roche/Hitachi 917 en una aplicación como se da en el ejemplo 2 para Modular P. Las medianas de los resultados de determinaciones triples se dan en la tabla 8 a continuación.

5

Tabla 8:

No se produce efecto sobre las medidas de los iones de calcio por los iones de magnesio		
Magnesio (mmol/l)	Calcio medido (mmol/l)	Recuperación (%)
0,0	2,53	100,0
1,5	2,52	99,6
3,0	2,52	99,6
4,5	2,55	100,8
6,0	2,55	100,8
7,5	2,55	100,8
9,0	2,55	100,8
10,5	2,55	100,8
12,0	2,54	100,4
13,5	2,54	100,4
15,0	2,54	100,4

Como es obvio de los valores de recuperación dados en la tabla 8, en el experimento anterior los iones de magnesio no interfieren con la medida de los iones de calcio.

10

Ejemplo 7

No se produce interferencia por gadolinio en las medidas de calcio usando NM-BAPTA

15

Una muestra que comprende iones de calcio en una concentración fisiológica de aproximadamente 2,35 mmol/l así como una muestra con nivel elevado de iones de calcio de aproximadamente 3,40 mmol/l se han enriquecido con diferentes niveles de Omniscan® (C1: 14 µl ad 986 µl, C2: 2,8 µl ad 997 µl). Omniscan® es un agente de contraste usado con frecuencia que comprende gadolinio. Se han medido las muestras enriquecidas en un analizador Hitachi 917 en una aplicación como se da en el ejemplo 2 para Modular P. Las medianas de los resultados de determinación triple se dan en la tabla 9 a continuación.

20

Tabla 9:

No se produce efecto sobre las medidas de los iones de calcio por los iones de gadolinio			
	Calcio medido (mmol/l)	Mediana (mmol/l)	Recuperación de valor sin gadolinio (%)
C1_NORMAL	2,35	2,37	101,3
más gadolinio	2,37		
	2,37		
C1_REF_NORMAL	2,32	2,34	
(sin gadolinio)	2,34		
	2,34		
C2_NORMAL	2,33	2,37	100,4
más gadolinio	2,37		
	2,37		
C2 REF NORMAL	2,36	2,36	
(sin gadolinio)	2,35		
	2,37		
C1_HIGH	3,42	3,40	100,3
más gadolinio	3,40		
	3,40		
C1_REF_HIGH	3,39	3,39	
(sin gadolinio)	3,39		
	3,33		
C2_HIGH	3,43	3,43	100,6
más gadolinio	3,44		
	3,40		
C2_REF_HIGH	3,41	3,41	
(sin gadolinio)	3,40		
	3,41		

5 Como es obvio de los valores de recuperación dados en la tabla 9, en el experimento anterior los iones de gadolinio no interfieren con la medida de los iones de calcio, debido a que todos los valores medidos coinciden en el intervalo de recuperación de un 95 a un 105 %.

Ejemplo 8

10 Síntesis de NF-BAPTA

La síntesis de NF-BAPTA se representa esquemáticamente en la figura 6.

a) 1-(2-Cloro-etoxi)-2-nitro-benceno

15 Véase el ejemplo 1.

b) 4-Fluoro-1-nitro-2-(2-(2-nitro-fenoxi)-etoxi)-benceno

20 Se disolvieron 1-(2-cloro-etoxi)-2-nitro-benceno (10 g) y 5-fluoro-2-nitro-fenol (7,86 g) en 50 ml de DMF y se agitó durante 19 h a 90-110 °C después de añadir con cuidado 13,82 g de carbonato de potasio. Se vertió la mezcla de

reacción en una mezcla de hielo picado y agua (500 ml) que se agitó enérgicamente. Se separó por filtración el residuo, se lavó varias veces con agua y se secó. Se suspendió el producto en bruto en metanol y se volvió a separar por filtración el residuo de color amarillo pálido, se lavó con metanol y se secó. Rendimiento: 9,5 g.

5 c) 2-(2-(2-Amino-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenilamina

Se suspendieron 9,48 g de 4-fluoro-1-nitro-2-(2-(2-nitro-fenoxi)-etoxi)-benceno y 1,5 g de paladio sobre carbón vegetal en 500 ml de dioxano y 60 ml de ácido acético glacial y se hidrogenó a temperatura ambiente. Después de descargar rápidamente tres veces nitrógeno, se separó por filtración el catalizador bajo una atmósfera de nitrógeno y se evaporó la solución restante y se secó el producto a vacío. Rendimiento: 7,52 g

d) Éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético

15 Se disolvió 2-(2-(2-amino-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenilamina (7,52 g) en 250 ml de DMF y se añadieron 38,4 ml de éster metílico del ácido bromo-acético, 56 g de carbonato de potasio, y 2,13 g de yoduro de sodio. Se calentó la mezcla de reacción hasta 80 °C durante 21 h. Después de la evaporación del éster metílico del ácido bromo-acético restante, se retiró del producto con hexano. El producto en bruto se purificó adicionalmente por cristalización en metanol. Rendimiento: 4,14 g

20 e) Éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-5-nitro-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético

25 Se disolvieron 2,5 g de éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético en 30 ml de ácido acético glacial. Bajo agitación enérgica, se añadieron 4,54 ml de ácido nítrico 1 molar en ácido acético glacial y en una segunda etapa, se añadieron 11,35 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se incrementó la temperatura hasta 30 °C. Se vertió directamente la mezcla de reacción en una mezcla 250 ml de hielo/agua. Se separó por filtración el residuo, se lavó varias veces con agua y se secó a vacío. Se purificó adicionalmente el producto en bruto por cromatografía en columna en gel de sílice, en primer lugar con hexano /éster etílico del ácido acético (1:1) como eluyente y una segunda vez con tolueno/acetonitrilo (1:1) como eluyente. Rendimiento: 0,82 g

30 f) NM-BAPTA; sal de potasio del ácido ((2-(2-(2-(bis-carboximetil-amino)-5-nitro-fenoxil)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-carboximetil-amino)-acético

35 Se disolvieron 0,82 g de éster metílico del ácido ((2-(2-(2-(bis-metoxicarbonilmetil-amino)-5-nitro-fenoxi)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-metoxicarbonilmetil-amino)-acético en una mezcla de agua/metanol (20 ml cada uno) y se añadieron 13,77 ml de solución de hidróxido de potasio 1 molar. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 1 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente y añadir 250 ml de agua, se ajustó el pH de la solución a pH 3 y se evaporó el metanol. Se aisló el producto por extracción de disolvente con éster etílico de ácido. Después de la evaporación, se secó el producto a vacío.

40 Se disolvió el ácido ((2-(2-(2-(bis-carboximetil-amino)-5-nitro-fenoxil)-etoxi)-4-fluoro-fenil)-carboximetil-amino)-acético en metanol y se añadió el hidróxido de potasio equimolar en metanol. Después de la evaporación y el secado, se pudo aislar la sal de potasio aislada. Rendimiento: 0,75 g

Ejemplo 9

Unión de los iones de calcio a NF-BAPTA.

50 Se analizaron las características de absorbancia de NF-BAPTA en presencia y ausencia de iones de calcio usando un fotómetro Uvikon 930. Se tomaron espectros de absorbancia con 0,15 mmol/l de NM-BAPTA o NF-BAPTA, respectivamente, en 50 mmol/l de CAPSO (a pH 7), 0,9 % de NaCl y 0,01 % de Brij-35 en ausencia o bien en presencia de 0,09 mmol/l de Ca^{2+} , respectivamente.

55 Como se muestra en la figura 7, los espectros de absorbancia para NM-BAPTA o NF-BAPTA, respectivamente, son muy parecidos, lo que indica que ambos de estos compuestos, es decir, los compuestos de acuerdo con la fórmula I en general, se pueden usar en la medida de los iones de calcio.

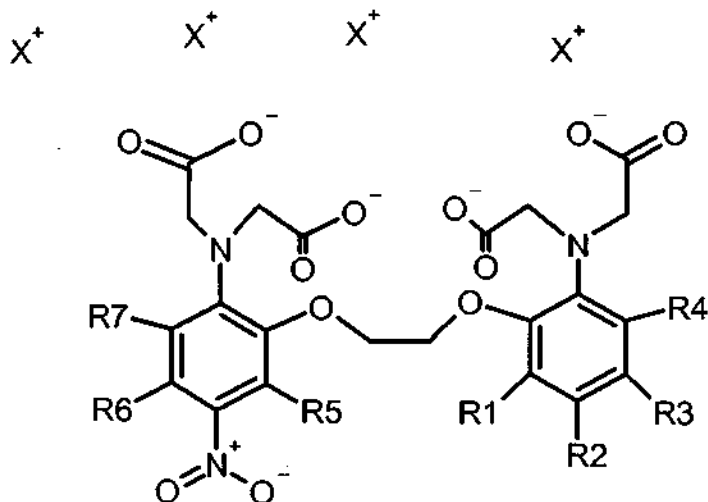
60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la concentración de los iones de calcio en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a) mezclar la muestra con una solución que comprende un compuesto de fórmula I

Fórmula I



en la que R1 se selecciona de hidrógeno, halógeno, carboxi, alquilo y formilo, R2 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo, alcoxi, morfolino, CN, carboxi y formilo, R3 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, N-alquilsulfato, carboxi, alcoxi, fenilo, CN, CF3, y terc-butilo, R4 se selecciona independientemente hidrógeno, halógeno o alquilo, R5 y R7 son independientemente hidrógeno o alquilo, R6 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alcoxi y halógeno, o en la que R3 y R4 forman un puente aromático y X+ es un contraión cargado positivamente,

uniendo de este modo los iones de calcio al compuesto

b) liberar los iones de calcio del compuesto, en el que dicha liberación provoca un cambio en la absorbancia del compuesto

c) medir el cambio en la absorbancia

d) usar el cambio en la absorbancia medida en (c) para determinar la concentración de los iones de calcio.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución que comprende el compuesto de fórmula I tiene un pH en el intervalo de pH 8,5 a pH 11,5.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la solución que comprende el compuesto de fórmula I tiene un pH en el intervalo de pH 9,0 a pH 10,5.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R1 de la fórmula I es hidrógeno o bien halógeno.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R2 de la fórmula I es hidrógeno, halógeno o alquilo.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R3 de la fórmula I es hidrógeno, halógeno, carboxi o alcoxi.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la liberación de los iones de calcio en la etapa (b) de la reivindicación 1 está desencadenada por un agente quelante de calcio que tiene a 20 °C una constante de unión para los iones de calcio de log k igual a 7,0 o superior.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la liberación de los iones de calcio en la etapa (b) de la reivindicación 1 está desencadenada por EDTA, DTPA, EGTA, DTPMP y/o EDPMP.

9. Un reactivo para la medida de calcio que tiene un pH que varía de pH 8,5 a pH 11,5, que contiene un compuesto de fórmula I como se define en la reivindicación 1.
- 5 10. El reactivo de la reivindicación 9, que comprende el compuesto de fórmula I en una concentración que varía de 0,10 mM a 50 mM.
- 10 11. El reactivo de la reivindicación 9, que comprende un sistema de tampón, en el que el sistema de tampón se selecciona de AMPD (= 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), CHES (= ácido 2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico), AMPSO (= ácido 3-[dimetil(hidroximetil)-metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), CAPSO (= ácido (3-ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico), CAPS (= ácido (3-ciclohexilamino)-2-propanosulfónico), un sistema de tampón de glicina, o un sistema de tampón de carbonato.
- 15 12. El reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que R1 de la fórmula I es hidrógeno o bien halógeno.
13. El reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que R2 de la fórmula I es hidrógeno, halógeno o alquilo.
- 20 14. El reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que R3 de la fórmula I es hidrógeno, halógeno, carboxi o alcoxi.
15. Un kit de prueba para la medida de calcio, comprendiendo el kit de prueba el reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

25

Fig. 1

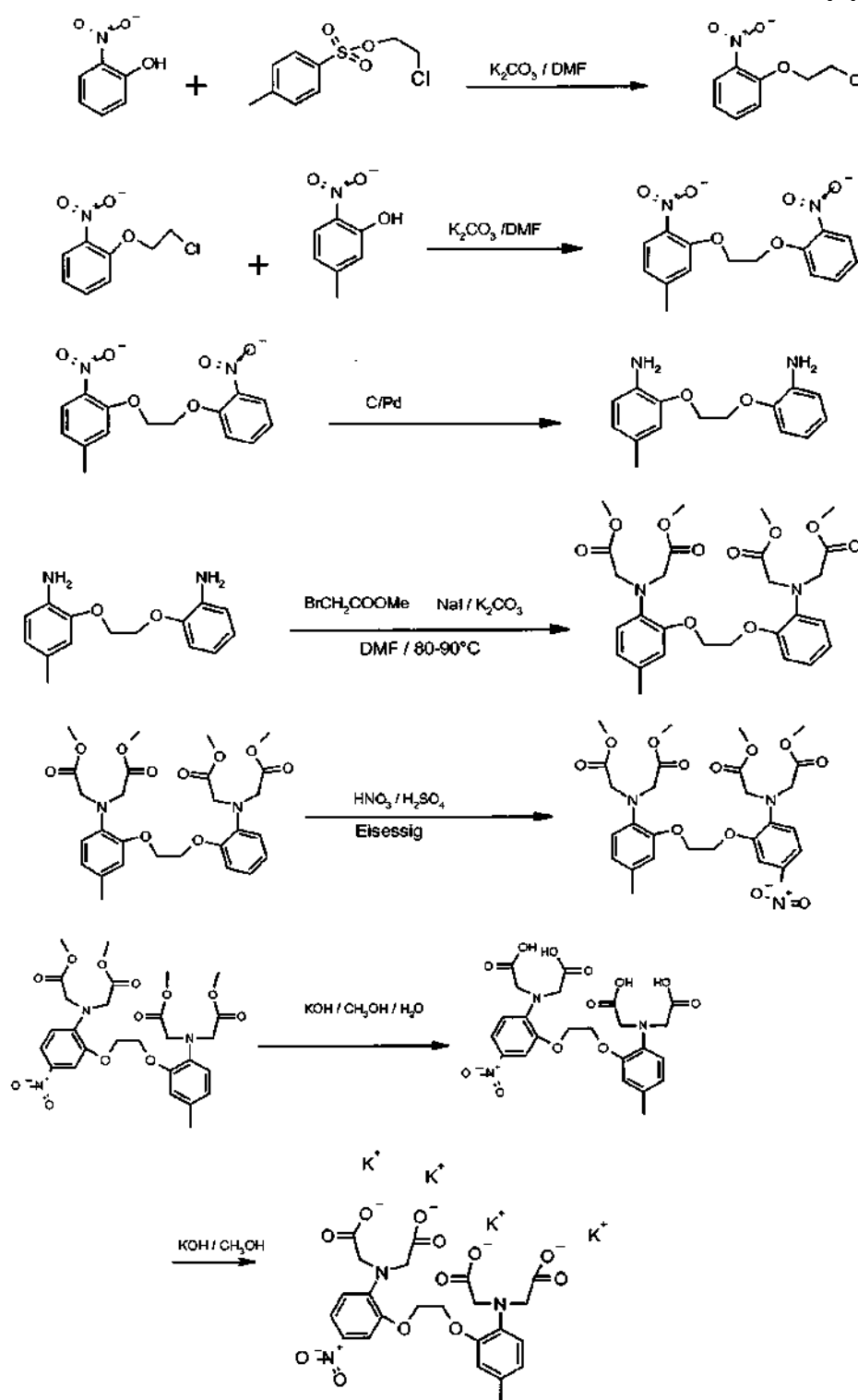


Fig. 2

Modular P

A; B

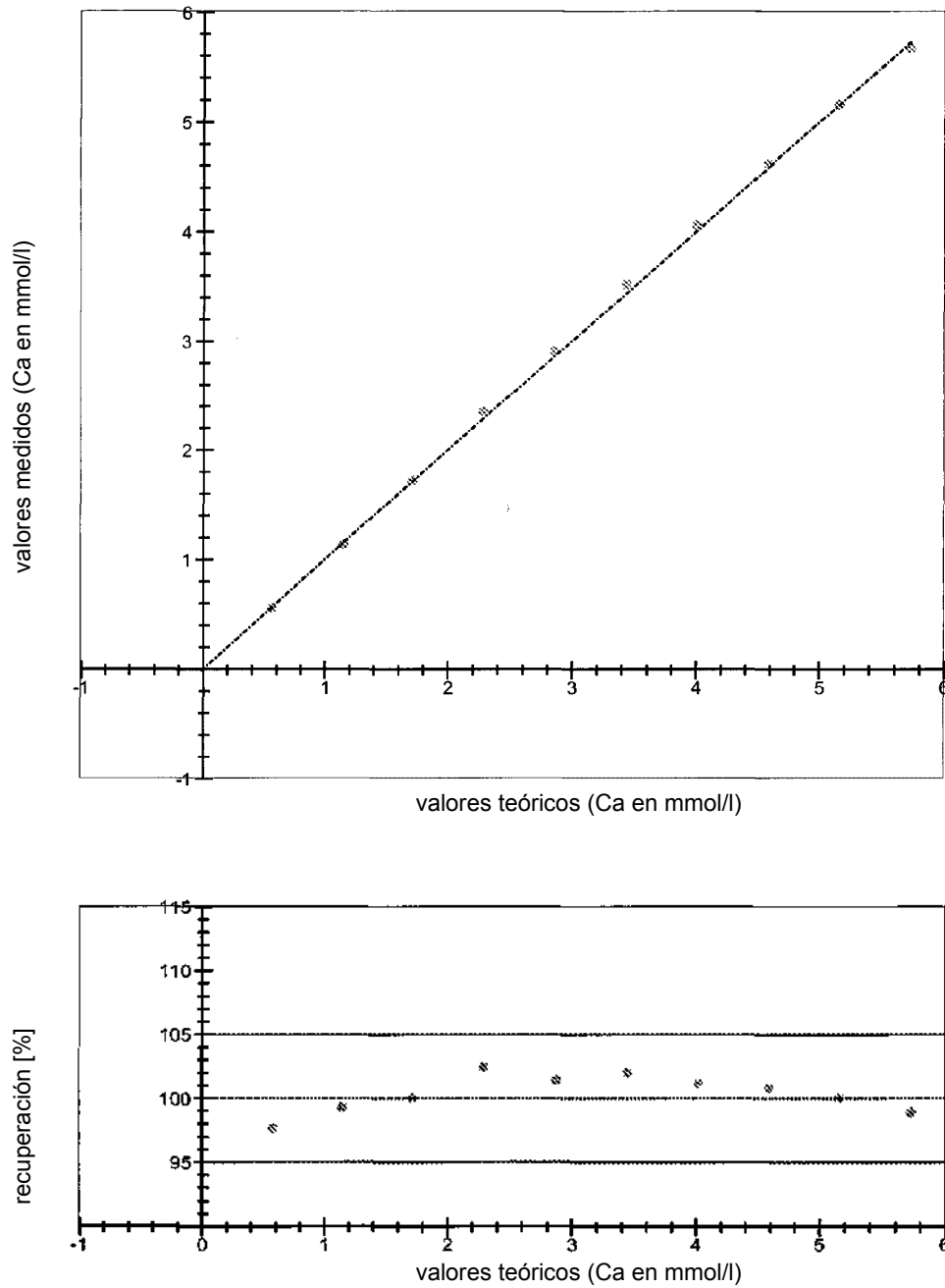


Fig. 3

cobas c501

A; B

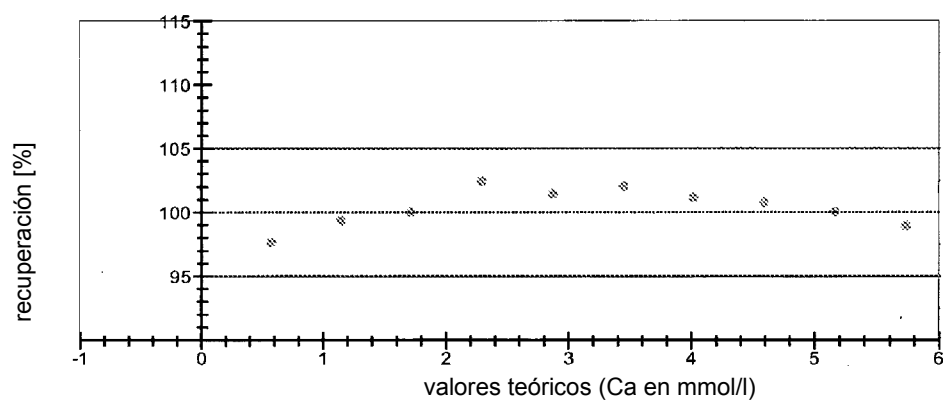
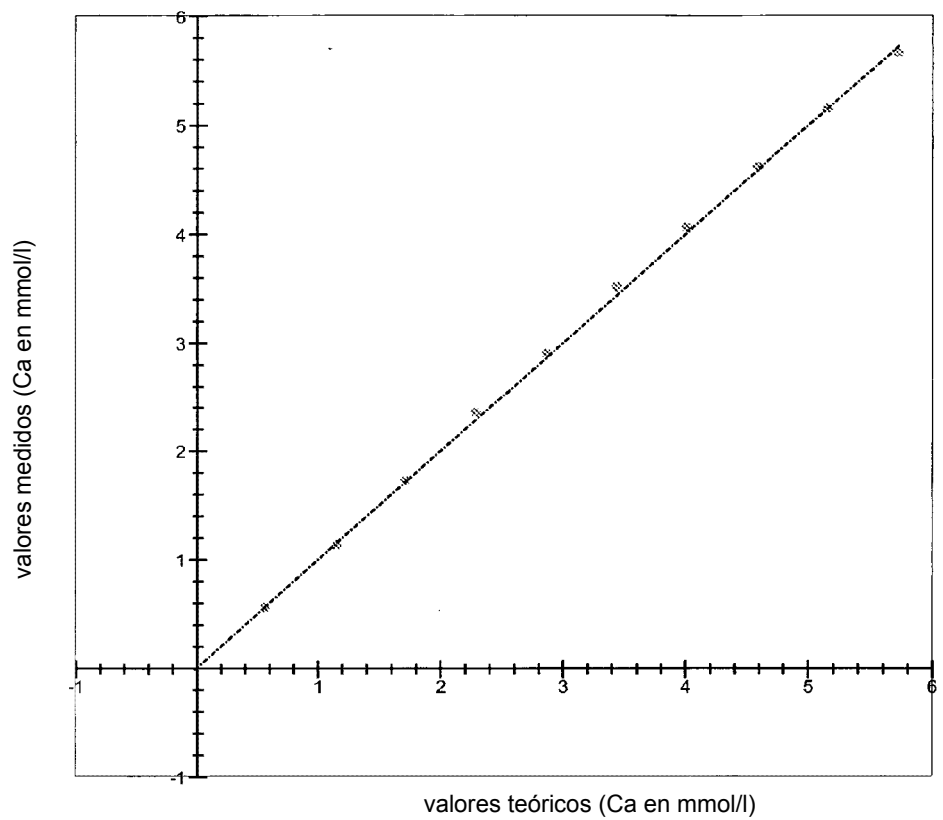


Fig. 4

Modular P 90 % R1

A; B

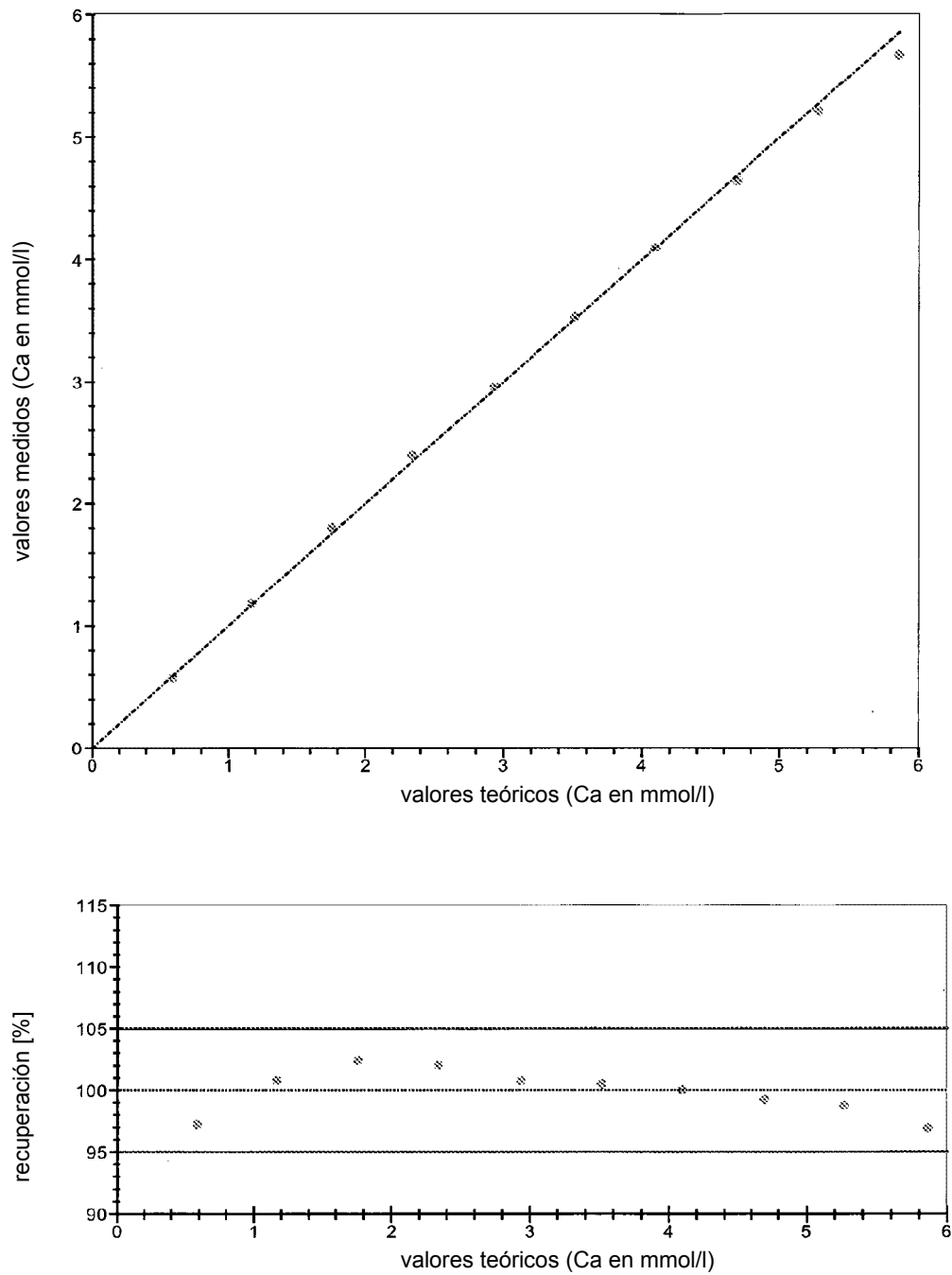


Fig. 5

Modular P 80 % R1

A; B

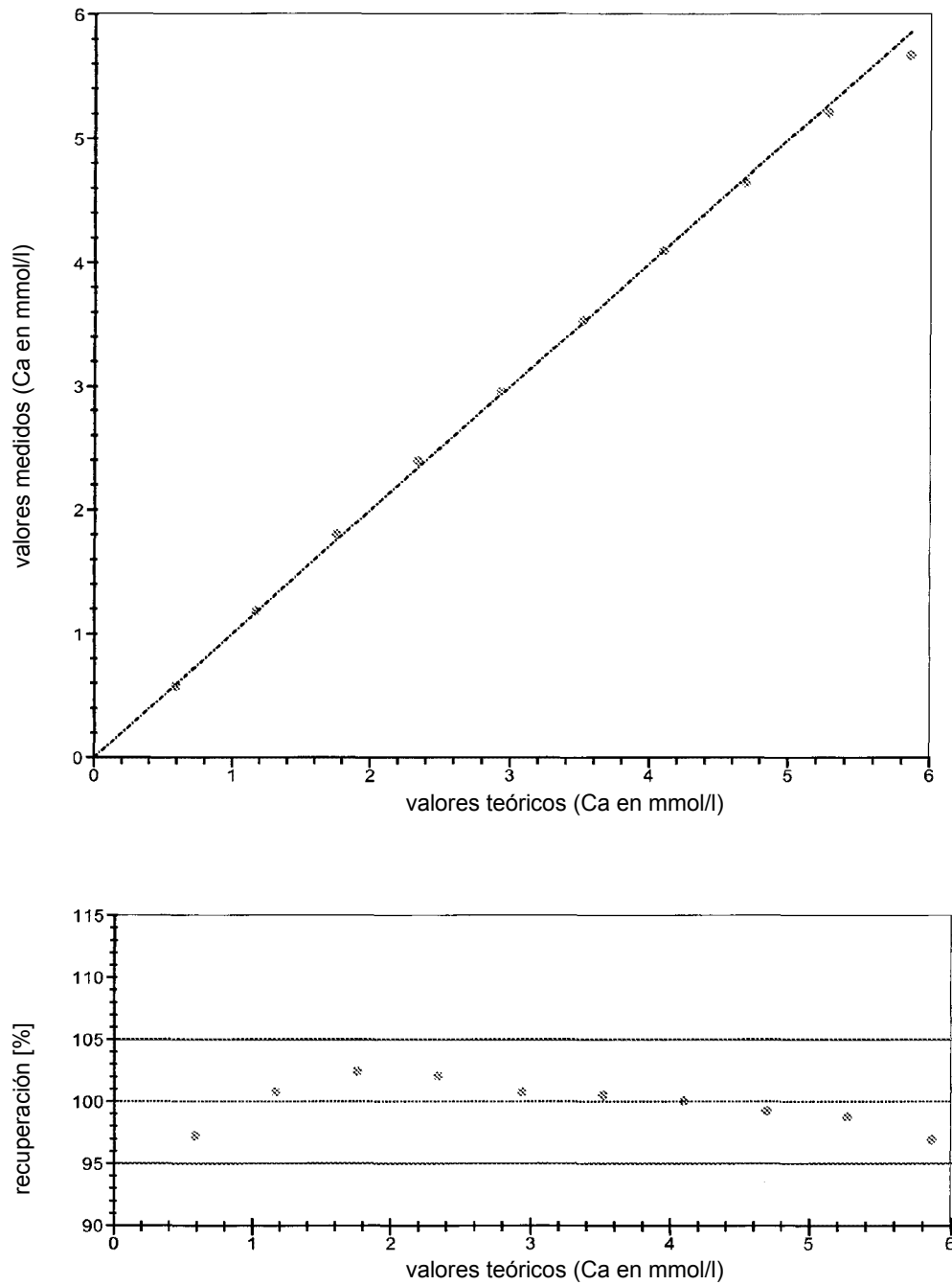


Fig. 6

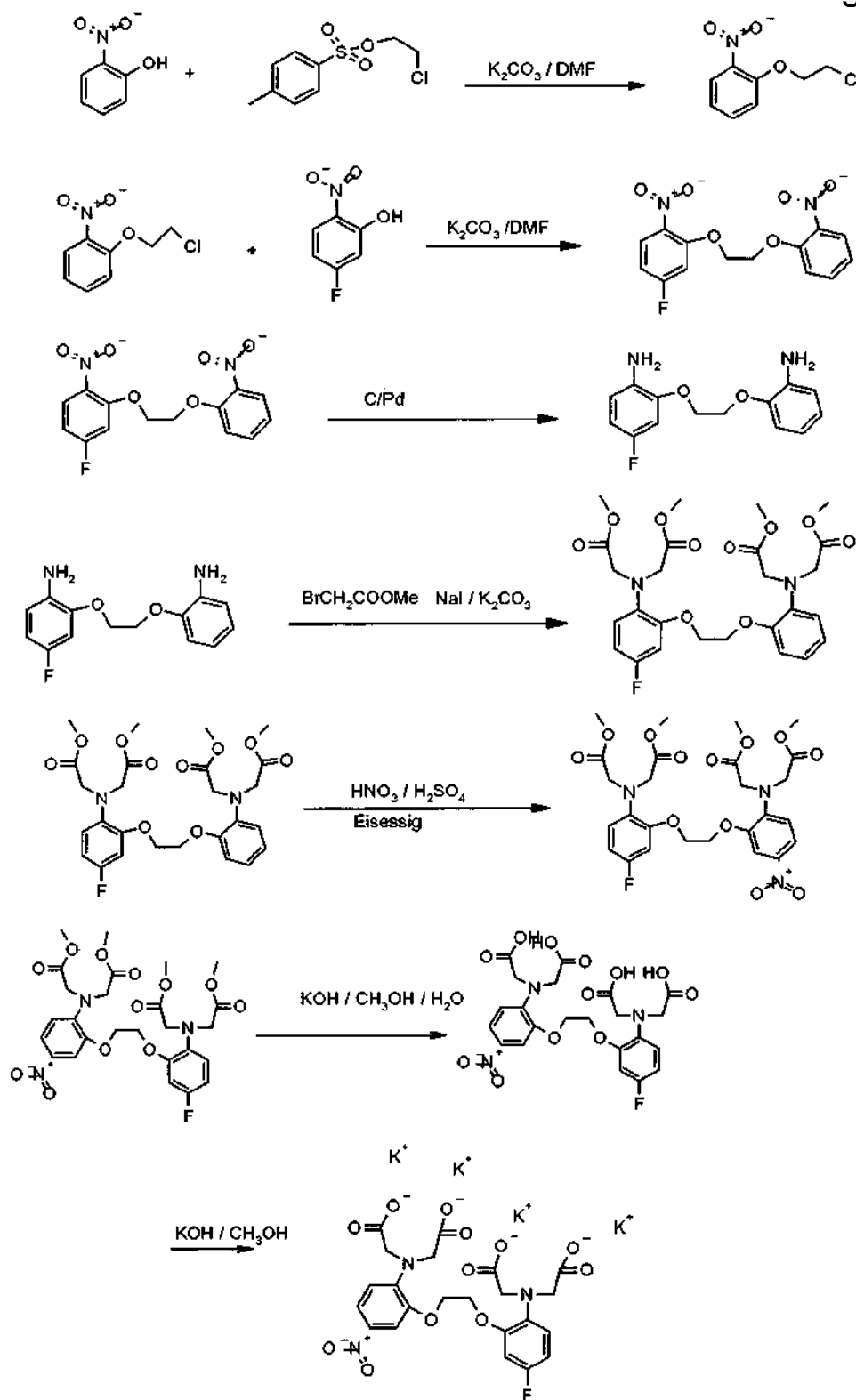


Fig. 7

