

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 622**

51 Int. Cl.:

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/84 (2006.01)

C12Q 1/58 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/025231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14774121 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2971068**

54 Título: **Control del ph en soluciones acuosas que contienen urea utilizando composiciones que contienen aminoácidos**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782851 P

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

23.06.2020

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**URETSKY, LAURA y
HORAN, KEVIN**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 768 622 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

Control del pH en soluciones acuosas que contienen urea utilizando composiciones que contienen aminoácidos

5 ANTECEDENTES

Las soluciones líquidas se usan actualmente en la calibración y el control de calidad de sensores, y estos reactivos por lo general se almacenan en sistemas cerrados tales como ampollas de vidrio o bolsas de barrera laminadas, donde el material de barrera sirve para evitar la interacción con el entorno y, por tanto, mantener un valor predeterminado cantidad de gas en la solución (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 6.632.675, otorgada a Conlon *et al.* el 14 de octubre de 2003; y la patente de EE. UU. N.º 6.136.607, otorgada a Conlon *et al.* el 3 de febrero de 1998). Sin embargo, la vida útil de estas soluciones puede verse limitada como resultado de productos de degradación tales como, pero sin limitación, amoníaco y dióxido de carbono.

15 Cuando está presente urea en la solución, se degrada en amoníaco y dióxido de carbono (CO₂), particularmente tras almacenamiento durante largos períodos de tiempo a temperaturas de almacenamiento no refrigeradas. La generación de amoníaco dentro de la solución aumenta significativamente y desestabiliza el pH de la solución, reduciendo por tanto la vida útil de la solución y limitando las opciones de temperatura disponibles para el almacenamiento de la solución.

20 Las soluciones que contienen urea también se utilizan para el procesamiento de proteínas/péptidos. Otro producto de degradación de la urea, el cianato, puede reaccionar con las proteínas/péptidos a procesar y, por tanto, interferir con la reacción de procesamiento de proteínas/péptidos. La carbamilación de una proteína/péptido ocurre cuando el cianato reacciona con ciertos grupos funcionales de la cadena lateral de aminoácidos, produciendo por tanto un derivado de proteína/péptido carbamilado que puede tener diferentes propiedades biológicas y/o antigénicas en comparación con la proteína/péptido nativo. Se han divulgado procedimientos para inhibir la carbamilación de proteínas en soluciones de procesamiento de proteínas/péptidos que contienen urea (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.605.513, otorgada a DiMarchi el 12 de agosto de 1986; la patente de EE. UU. N.º 7.459.425, otorgada a Wan y Ropp el 2 de diciembre de 2008; y las solicitudes publicadas de EE. UU. N.º 2005/0032153 y 2012/0007022, publicadas a Ropp *et al.* el 10 de febrero de 2005 y el 12 de enero de 2012, respectivamente; así como el documento US 2005/032153). En estos procedimientos, se añade una molécula captadora de cianato a una solución de procesamiento de proteínas/péptidos de urea 7-9 M (a una concentración final de 1 mM a 150 mM para el captador); los ejemplos de captadores de cianato divulgados por estas referencias incluyen, pero sin limitación, materiales similares a 1,2-etilendiamina y 1,2-etilendiamina; dietanolamina; aminoácidos y derivados de aminoácidos tales como, pero sin limitación, L-arginina, L-cisteína, L-glicina, L-histidina, L-lisina, L-treonina, taurina, glicinamida y 4-hidroxiprolina; los dipéptidos glicilglicina (Gly-Gly), histidilglicina (His-Gly) e histidilglicina (His-Gly); y el tripéptido triglicina (Gly-Gly-Gly). Sin embargo, no se ha determinado el efecto de una molécula captadora de cianato sobre el pH de estas soluciones de urea de alta molaridad.

40 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de nuevas y mejoradas realizaciones de reactivos que contienen urea acuosa que se utilizan en la calibración y el control de calidad de sensores que proporcionen control de pH de los mismos y así, exhiban una vida útil y opciones de almacenamiento de temperatura ampliadas para los reactivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La Figura 1 representa gráficamente los desplazamientos de pH observados en el reactivo 200 Cal que contiene urea en presencia o ausencia de lisina tras almacenamiento a 35 °C durante diversos períodos de tiempo.

50 La Figura 2 representa gráficamente el desplazamiento de pH observado en el reactivo RCx que contiene urea en presencia o ausencia de diversos aminoácidos tras almacenamiento a 45 °C durante diversos períodos de tiempo.

La Figura 3 representa gráficamente las variaciones en los niveles de pH observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

55 La Figura 4 representa gráficamente las variaciones en las concentraciones de BUN observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

La Figura 5 representa gráficamente la variación en las concentraciones de creatinina observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

60 La Figura 6 representa gráficamente la variación en las concentraciones de amoníaco observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

65 La Figura 7 ilustra los niveles de generación de amoníaco observados después de almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C en el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

La Figura 8 representa gráficamente el desplazamiento de pH observado en el Reactivo C en presencia o ausencia de diversos aminoácidos tras almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C.

5 La Figura 9 representa gráficamente los desplazamientos de pH observados en el reactivo RCx 7,4 Cal AA que contiene urea en presencia o ausencia de diversos aminoácidos tras almacenamiento a diversas temperaturas y períodos de tiempo.

10 La Figura 10 representa gráficamente las variaciones en las concentraciones de BUN observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx 7,4 Cal AA en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

La Figura 11 representa gráficamente la variación en las concentraciones de creatinina observada a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx 7,4 Cal AA en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

15 La Figura 12 ilustra los niveles de generación de amoníaco observados después de almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C en el reactivo RCx en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

La Figura 13 representa gráficamente la variación en las concentraciones de amoníaco observadas a diversas temperaturas y períodos de tiempo para el reactivo RCx 7,4 Cal AA en presencia o ausencia de diversos aminoácidos.

20 La Figura 14 representa gráficamente los cambios de pH observados en el reactivo Zero Cal en presencia o ausencia de lisina durante almacenamiento durante 28 días a diversas temperaturas.

25 La Figura 15 ilustra los niveles de generación de amoníaco observados después de almacenamiento durante tres meses a 30 °C para diversas soluciones de calibración tamponadas que contienen 100 mg/dl de BUN (nitrógeno ureico en sangre), ya sea en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

30 La Figura 16 representa gráficamente los niveles de generación de amoníaco observados después de almacenamiento durante diversos períodos de tiempo a 30 °C para diversas soluciones de calibración tamponadas que contienen 100 mg/dl de BUN, ya sea en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

La Figura 17 ilustra las variaciones en el pH observadas después de almacenamiento durante tres meses a 30 °C para diversas soluciones de calibración tamponadas que contienen 100 mg/dl de BUN, ya sea en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

35 La Figura 18 representa gráficamente los niveles de generación de amoníaco observados después de almacenamiento durante varios períodos de tiempo a 30 °C para diversas soluciones de calibración tamponadas que contienen 100 mg/dl de BUN, ya sea en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

40 La Figura 19 representa gráficamente el porcentaje de aumento de amoníaco (en relación con la concentración original de urea) observado en diversos períodos de tiempo a 30 °C para una solución de calibración tamponada que contiene urea a dos concentraciones diferentes, ya sea en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Antes de explicar al menos una realización del concepto o conceptos inventivos en detalle a través de dibujos ejemplares, experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio, debe entenderse que el concepto o conceptos inventivos no están limitados en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentación y/o resultados. El concepto o conceptos inventivos son susceptibles de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Como tal, el lenguaje usado en el presente documento pretende tener el alcance y el significado más amplios posibles; y las realizaciones pretenden a ser ejemplares, no exhaustivas. Se debe entender que la fraseología o terminología empleada en el presente documento es con el propósito de descripción y no debería considerarse limitante.

55 A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Las técnicas y procedimientos anteriores generalmente se realizan de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándares para síntesis químicas y análisis químicos.

Todas las patentes, solicitudes de patentes publicadas y publicaciones no patentadas mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la que pertenece este concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

5 Todos los artículos, composiciones y/o procedimientos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la vista de la presente divulgación. Si bien los artículos, composiciones y procedimientos del concepto o conceptos inventivos se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a los artículos, composiciones y/o procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los procedimientos descritos en el
10 presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance del concepto o conceptos inventivos. Todos los sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la materia se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto del concepto o conceptos inventivos según lo definido por las reivindicaciones adjuntas.

15 Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

El uso de la palabra "uno" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se
20 indique explícitamente que hace referencia solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que hace referencia solo a alternativas e "y/o". En toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye tanto uno como cualquier cantidad de más de
25 uno, incluyendo, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede ampliarse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al que se adjunte; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" incluye X solo, Y solo y Z solo, así como cualquier combinación de X, Y y Z.

30 El término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor, y/o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

35 Como se usa en esta memoria descriptiva y en la reivindicación o reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluyen" e "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contienen" y "contiene") son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de procedimiento adicionales no indicados.

40 El término "o combinaciones de los mismos", como se usa en el presente documento, hace referencia a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como
45 BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente por el contexto de otra manera.

50 Volviendo ahora al concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados, se logra la estabilización del pH en soluciones acuosas que contienen urea mediante la adición de composiciones que contienen aminoácidos a la solución que contiene urea. La adición de composiciones que contienen aminoácidos a la solución que contiene urea proporciona un procedimiento para controlar el pH y/o suprimir la formación de amoníaco en la solución por la degradación de la urea presente en la misma. En ciertas realizaciones no limitantes, las soluciones que contienen
55 urea son reactivos de calibración de diagnóstico y/o control de calidad. La reducción de los subproductos de urea, tales como el amoníaco y el CO₂, proporciona múltiples aspectos de estabilización deseados para las soluciones, incluyendo, pero sin limitación, la estabilización del pH del reactivo, las concentraciones de urea, amoníaco, CO₂ y bicarbonato, la quelación de Ca⁺² y Mg⁺² dependiente del pH y la relación de creatina a creatinina dependiente del pH. Una mejor estabilidad del reactivo que contiene urea permite objetivos de urea más altos y conduce a sensores más estables, exactos y precisos, tales como, pero sin limitación, sensores de BUN. Como se mencionó anteriormente, la estabilidad general del pH conduce a la estabilización de otros parámetros dependientes del pH dentro de la formulación.

65 Los aminoácidos están implicados o relacionados con aquellos en el "ciclo de la urea" natural, que regula las concentraciones de amoníaco en seres humanos y otros animales mediante la formación de urea. Los aminoácidos

pueden ayudar a estabilizar la urea en solución, ralentizando por tanto la formación de amoníaco, o la urea puede degradarse, y los aminoácidos reducen naturalmente el amoníaco.

5 Si bien el uso del concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados actualmente se describe en particular para su uso con reactivos de diagnóstico (tales como, pero sin limitación, reactivos de calibración y control de calidad), debe entenderse que el alcance del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados abarca el uso con cualquier solución acuosa que contenga urea en la que se desee estabilizar su pH.

10 En una realización, el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados están dirigidos a una composición que comprende un reactivo de control de calidad o calibración acuoso dispuesto en un sistema cerrado (tal como, pero sin limitación, un sistema cerrado de espacio de cabeza cero). La composición incluye urea, al menos un tampón y al menos una composición que contiene aminoácidos. La al menos una composición que contiene aminoácidos tiene una o más aminas primarias o secundarias disponibles y está presente en una cantidad suficiente para estabilizar el pH del reactivo de control de calidad o calibración acuoso tras almacenar la composición.

15 El término "sistema cerrado" hace referencia a un sistema sellado o contenido de otro modo que no permite que el reactivo contenido en el mismo reaccione con su entorno. En un "sistema cerrado con espacio de cabeza cero", el reactivo dispuesto en un contenedor maximiza el volumen del contenedor tanto como sea posible, de modo que el volumen disponible para que los gases queden atrapados dentro del sistema cerrado se minimice tanto como sea posible.

20 En ciertas realizaciones, el pH del reactivo de control de calidad o calibración acuoso está en un intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, y el pH del reactivo varía en +/- 1,0 o menos del pH original después de almacenamiento del mismo, tal como +/- 0,5 o menos del pH original, +/- 0,2 o menos del pH original, +/- 0,1 o menos del pH original, +/- 0,05 o menos del pH original, +/- 0,02 o menos del pH original, +/- 0,01 o menos del pH original, o +/- 0,005 o menos del pH original.

25 La al menos una composición que contiene aminoácidos puede incluir cualquier composición que contenga aminoácidos conocida en la técnica o contemplada de otro modo en el presente documento que sea capaz de funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados actualmente. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición que contiene aminoácidos puede incluir aminoácidos individuales, péptidos pequeños, polipéptidos más largos y/o proteínas de longitud completa; el único requisito es que la composición que contiene aminoácidos tenga al menos una amina primaria y/o secundaria que proporcione un sitio o sitios disponibles para reaccionar con productos intermedios de degradación de urea (tales como, pero sin limitación, cianatos). Muchos aminoácidos y combinaciones de aminoácidos ayudan a controlar la degradación de la urea en solución. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos que pueden estar presentes en la composición que contiene aminoácidos incluyen, pero sin limitación, lisina, arginina, ornitina, taurina, histidina, asparagina, treonina, así como combinaciones y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, el pKa de al menos un grupo carboxilo de aminoácidos en la al menos una composición que contiene aminoácidos está en un intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,7.

30 La estabilidad del pH descrita anteriormente en el presente documento puede observarse en una variedad de condiciones de almacenamiento. Los ejemplos no limitantes de condiciones de almacenamiento incluyen: almacenamiento durante al menos seis meses a una temperatura en un intervalo de 1 °C a 8 °C; almacenamiento durante al menos seis semanas a una temperatura en un intervalo de 9 °C a 17 °C; almacenamiento durante al menos cuatro semanas a una temperatura en un intervalo de 18 °C a 32 °C; almacenamiento durante al menos una semana a una temperatura en un intervalo de 33 °C a 44 °C; y almacenamiento durante al menos 24 horas a una temperatura en un intervalo de 45 °C a 50 °C. Otros ejemplos no limitantes de condiciones de almacenamiento incluyen: almacenamiento durante al menos un año o al menos dos años a una temperatura en un intervalo de 1 °C a 8 °C; almacenamiento durante al menos tres meses, seis meses, nueve meses o un año a una temperatura en un intervalo de 9 °C a 17 °C; almacenamiento durante al menos dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses o un año a una temperatura en un intervalo de 18 °C a 32 °C; (d) almacenamiento durante al menos dos semanas, tres semanas o cuatro semanas a una temperatura en un intervalo de 33 °C a 44 °C; y almacenamiento durante al menos 48 horas, 72 horas o cinco días a una temperatura en un intervalo de 45 °C a 50 °C.

35 En ciertas realizaciones, la al menos una composición que contiene aminoácidos puede estar presente en una cantidad suficiente para controlar la generación de productos de degradación de urea que pueden afectar la estabilidad del pH del reactivo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la al menos una composición que contiene aminoácidos puede estar presente en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la formación de amoníaco y/o dióxido de carbono en el reactivo de control de calidad o calibración acuoso después de almacenamiento de la composición. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la formación de amoníaco puede reducirse en al menos 5 %, o al menos 10 %, o al menos 15 %, o al menos 20 % después del almacenamiento de la composición. En otro ejemplo no limitante, se observa una concentración de dióxido de carbono de menos de 150 mm Hg +/- 3 % después de almacenamiento de la composición.

La urea puede estar presente en la composición a cualquier concentración deseada que (1) permita que el reactivo de calibración o control de calidad acuoso funcionen como se desee, y (2) permita que su pH se controle mediante la presencia de al menos una composición que contiene aminoácidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la urea puede estar presente en el reactivo acuoso a una concentración en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 150 mM, o un intervalo de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 55 mM, o un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, o un intervalo de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM.

Además, la proporción de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos puede ser cualquier proporción deseada que (1) permita que el reactivo de calibración o control de calidad acuoso funcionen como se desee, y (2) permita que se controle su pH mediante la presencia de al menos una composición que contiene aminoácidos. En la presente invención, la relación de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos está en un intervalo de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 100:1, o en un intervalo de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 10:1, o en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, o en un intervalo de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1. En ciertas realizaciones, la relación de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos es aproximadamente 3,57:1.

El tampón presente en la composición puede ser cualquier tampón conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento para su uso de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Los ejemplos no limitantes de tampones que se pueden usar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados incluyen MOPS, MES, ADA, PIPES, ACES, cloruro de colamina, BES, TES, HEPES, acetamidoglicina, tricina, glicinamida, bicina, fosfato y combinaciones y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, la al menos una composición que contiene aminoácidos también puede servir como el al menos un tampón presente en la composición.

El reactivo de control de calidad o calibración acuoso pueden utilizarse con cualquier sensor conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento, tal como, pero sin limitación, un sensor de nitrógeno ureico en sangre (BUN) o un sensor de creatinina.

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados incluyen además kits que contienen cualquiera de las realizaciones de composiciones descritas anteriormente en el presente documento; el kit puede contener al menos una de las composiciones descritas anteriormente en el presente documento o cualquier combinación de cualquiera de las realizaciones de composiciones descritas anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el kit puede contener una o más composiciones que comprenden un reactivo de calibración acuoso como se describe anteriormente en el presente documento y una o más composiciones que comprenden un reactivo de control de calidad acuoso como se describe anteriormente en el presente documento. Además, el kit puede contener además otros componentes/reactivos que podrían utilizarse con las composiciones descritas anteriormente en el presente documento. La naturaleza de estos componentes/reactivos adicionales dependerá del formato de ensayo particular, y la identificación de los mismos está dentro de la habilidad de un experto en la materia. Un ejemplo no limitante de otro componente/reactivo que puede proporcionarse en un kit que contiene al menos una de las composiciones descritas anteriormente en el presente documento es una solución de lavado.

Las composiciones/componentes/reactivos pueden estar dispuestos en recipientes/compartimentos separados del sistema cerrado, o pueden combinarse diversos componentes/reactivos en uno o más recipientes/compartimentos del sistema cerrado, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de las composiciones/componentes/reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo. Además, el kit puede incluir un dispositivo microfluídico en el que se disponen los componentes/reactivos.

Las cantidades relativas de las diversas composiciones/componentes/reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de las composiciones/componentes/reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante los procedimientos de ensayo y para optimizar sustancialmente además la sensibilidad de un ensayo. El kit puede incluir además un conjunto de instrucciones escritas que explican cómo usar el kit. Un kit de esta naturaleza puede usarse en cualquiera de los procedimientos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento.

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados también se dirigen a un procedimiento para estabilizar el pH de un reactivo de calibración o control de calidad acuoso como se describe anteriormente en el presente documento. El procedimiento incluye disponer al menos una composición que contiene aminoácidos (como se describe en detalle anteriormente en el presente documento) en un reactivo de control de calidad o calibración acuoso (como se describe anteriormente en el presente documento), por lo que el control del pH del reactivo se proporciona por la presencia de al menos una composición que contiene aminoácidos en el mismo.

EJEMPLOS

A continuación, se proporcionan ejemplos en el presente documento. Sin embargo, debe entenderse que el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados no están limitados en su aplicación a la

experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio específicos descritos en los Ejemplos. Más bien, los ejemplos se proporcionan simplemente como una de diversas realizaciones y pretenden ser ejemplares, no exhaustivos.

5 Ejemplo 1

En el presente Ejemplo, se dispuso una solución de referencia multianalítica (200 G Cal) a pH 6,8 y BUN (nitrógeno ureico en sangre) 10 mg/dl con dióxido de carbono y oxígeno tonometrados en una bolsa de espacio de cabeza cero y se probó. Los objetivos de formulación de estos reactivos se muestran en la Tabla 1.

10

TABLA 1		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		6,7-6,9
Na ⁺	mM	110-120
K ⁺	mM	3,8-4,2
Ca ⁺²	mM	1,15-1,35
Cl ⁻	mM	92-102
Glucosa	mg/dl	170-190
BUN	mg/dl	8-12
Creatinina	mg/dl	0,8-1,2

Las muestras de reactivos se almacenaron a 25 °C durante 8 semanas, a 35 °C durante 6 semanas, a 45 °C durante tres semanas, a 50 °C durante tres semanas o a 55 °C durante 3 semanas, respectivamente, y luego se almacenaron a 4 °C durante 1 año antes de la prueba. Las soluciones eran el control (formulación normal) y lisina 10 mM. La lisina era significativamente más estable (~ 1/4 de pérdida) para el pH que el control.

15

La Figura 1 representa la variación de pH observada a 35 °C durante diversos períodos de almacenamiento. Se observó un desplazamiento de pH de casi 0,014 después de cuatro semanas a 35 °C en el reactivo 200 Cal en ausencia de aminoácidos, mientras que este desplazamiento de pH se redujo a menos de 0,006 (es decir, se observó una reducción de más del 50 %) en presencia de lisina.

20

El cambio observado en el pH a 4 °C frente a 45 °C después de almacenamiento durante 4 semanas era de -0,045 para el control y -0,008 para el reactivo que contiene lisina (que es una especificación aceptable de vida útil). Esto representa una mejora significativa en la estabilidad del pH.

25

Ejemplo 2

En este ejemplo, se dispensó una solución de referencia multianalítica que contenía urea y tampón MOPS 50 mM (reactivo RCx) a pH 7,4 en una bolsa de espacio de cabeza cero y se almacenó durante cuatro semanas a diversas temperaturas en ausencia o presencia de lisina, treonina, arginina u ornitina, o una combinación de arginina-ornitina. Los objetivos de formulación de estos diversos reactivos se muestran en la Tabla 2.

30

TABLA 2		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		7,3-7,5
Na ⁺	mM	110-130
K ⁺	mM	7,8-8,2
Ca ⁺²	mM	0,58-0,69
Cl ⁻	mM	68-72
BUN	mg/dl	38-43
Creatinina	mg/dl	4,5-6,0

La Figura 2 ilustra la variación de pH observada para los diversos reactivos tras almacenamiento a 45 °C durante hasta cuatro semanas. Se observó un aumento de pH de 0,023 en el reactivo RCx en ausencia de aminoácidos; sin embargo, la presencia de lisina 10 mM, arginina 10 mM o treonina 10 mM en el reactivo RCx redujo este aumento de pH a solo ~0,003. La presencia de ornitina 10 mM o arginina 5 mM/ornitina 10 mM daba como resultado una disminución del pH de ~-0,005 del pH original del reactivo RCx.

35

Las Figuras 3-6 representan los niveles de pH y las concentraciones de BUN, creatinina y amoníaco, respectivamente, que se observaron en los reactivos RCx en presencia y ausencia de diversos aminoácidos tras almacenamiento a diversas temperaturas y durante 1 a 4 semanas de almacenamiento. A partir de estas figuras, es claro que la adición de aminoácidos reducía la formación de amoníaco y mejoraba significativamente la estabilidad.

Se observó un aumento en la concentración de amoníaco a 0,52 mM en ausencia de aminoácidos (Figura 7), y este aumento se redujo a un nivel de 0,33-0,37 mM en presencia de diversos aminoácidos. Esto representa una reducción del 27-37 % en la cantidad de amoníaco generado después de almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se probó el reactivo RCx del ejemplo 2 a pH 7,3 y tampón MOPS 50 mM en presencia de diferentes aminoácidos. Los objetivos de formulación de estos diversos reactivos, que no incluyen sin aminoácidos o taurina, histidina, asparagina, niacinamida o ácido nicotínico, se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		7,3-7,5
Na ⁺	mM	110-130
K ⁺	mM	7,8-8,2
Ca ⁺²	mM	0,58-0,69
Cl ⁻	mM	68-72
BUN	mg/dl	38-43
Creatinina	mg/dl	4,5-6,0

La Figura 8 ilustra la variación de pH observada para los diversos reactivos tras almacenamiento a 45 °C durante hasta cuatro semanas. Se observó un aumento de pH de 0,023 en el reactivo RCx en ausencia de aminoácidos, así como en presencia de niacinamida 10 mM, y se observó un mayor aumento de pH en presencia de ácido nicotínico 10 mM. Sin embargo, la presencia de histidina 10 mM, asparagina 10 mM o taurina 10 mM en el reactivo RCx reducía en gran medida el desplazamiento en el pH observado (a ~0,007, ~0,004 y ~0,0025, respectivamente).

Las Figuras 9-11 y 13 representan los niveles de pH y las concentraciones de BUN, creatinina y amoníaco, respectivamente, que se observaron en el reactivo RCx en presencia y ausencia de diversos aminoácidos tras almacenamiento a diversas temperaturas y durante 1 a 4 semanas de almacenamiento. A partir de estas figuras, es claro que la presencia de aminoácidos mejoraba significativamente la estabilidad del pH al limitar la generación de amoníaco.

Se observó un aumento en la concentración de amoníaco a 0,44 mM en el reactivo RCx en ausencia de aminoácidos después de almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C (Figura 12), y se observó un mayor aumento en la concentración de amoníaco en presencia de niacinimida y ácido nicotínico (0,48 y 0,49 mM, respectivamente). Sin embargo, la presencia de los otros aminoácidos daba como resultado una disminución en los niveles de amoníaco generado en estas condiciones de almacenamiento, con 0,40 mM observado para el reactivo que contiene asparagina, 0,36 mM observado para el reactivo que contiene taurina y 0,35 mM observado para el reactivo que contiene histidina. Esto representa una reducción del 9-21 % en la cantidad de amoníaco generado después de almacenamiento durante cuatro semanas a 45 °C.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra los resultados obtenidos con la solución de referencia multianalítica que contiene urea (reactivo Zero Cal) tonometrada con dióxido de carbono a pH 7,4 en presencia o ausencia de lisina y dispensada en bolsas con espacio de cabeza cero. Los objetivos de formulación de estos reactivos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		7,3-7,5
pCO ₂	mm Hg	65-85
Na ⁺	mM	150-170
K ⁺	mM	7,8-8,2
Ca ⁺²	mM	0,58-0,69
Cl ⁻	mM	68-72
BUN	mg/dl	35-45

La Figura 14 representa la variación de pH observada a diversas temperaturas tras almacenamiento durante 28 días. Se observó un desplazamiento de pH de ~0,045 a 50 °C en el reactivo Zero Cal en ausencia de aminoácidos, mientras que este desplazamiento de pH se redujo a menos de 0,02 (es decir, se observó una reducción de más del 50 %) en presencia de lisina 10 mM. También se observó una reducción de aproximadamente el 50 % en el desplazamiento de pH a 25 °C, 35 °C y 45 °C.

Ejemplo 5

En el presente Ejemplo, se dispuso para regulación de amoníaco y estabilidad del pH una solución de calibración tamponada que contiene MOPS 40 mM y BUN 100 mg/dl (urea 35,7 mM) con objetivo de pH 6,8 y tonometrado con dióxido de carbono y oxígeno en bolsas de espacio libre cero y se probó a 30 °C durante diversos períodos de almacenamiento en presencia o ausencia de aminoácidos 10 mM (arginina u ornitina). Los objetivos de formulación de estos reactivos se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		6,7-7,0
Na ⁺	mM	20-40
K ⁺	mM	3,8-4,2
Ca ⁺²	mM	1,15-1,35
Mg ⁺²	mM	0,80-1,00
BUN	mg/dl	90-105
Creatinina	mg/dl	9,0-11,0

Las Figuras 15-16 ilustran los efectos de la arginina y la ornitina sobre la regulación del amoníaco de la solución de calibración tamponada. Se observó un aumento en la concentración de amoníaco a 0,78 mM en la solución en ausencia de aminoácidos después de almacenamiento durante tres meses (Figura 15), y esta concentración se redujo en un 36 % y 41 % en presencia de ornitina o arginina, respectivamente (es decir, a 0,50 y 0,46 mM). La Figura 16 ilustra el aumento en la concentración de amoníaco observado tras almacenamiento de la solución durante hasta 12 semanas en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

Las Figuras 17-18 ilustran los efectos de la arginina y la ornitina sobre la estabilización del pH de la solución de calibración tamponada. Se observó un desplazamiento de pH de 0,017 en la solución en ausencia de aminoácidos después de almacenamiento durante tres meses (Figura 17), y este desplazamiento se redujo drásticamente con la adición de arginina u ornitina a la solución de calibración tamponada (a un desplazamiento de -0,001 en presencia de ornitina y un desplazamiento de 0,003 en presencia de arginina). Esto representa una reducción de aproximadamente el 85 % en la variación de pH observada en ausencia de aminoácidos. La Figura 18 ilustra la variación de pH observada durante el almacenamiento de la solución durante hasta 12 semanas en presencia o ausencia de ornitina o arginina.

Ejemplo 6

En el presente ejemplo, se calculó el porcentaje de aumento de amoníaco en una calibración tamponada que contiene urea después de almacenamiento durante hasta 16 semanas a 30 °C a BUN 60 mg/dl (urea 21,4 mM). Los objetivos de formulación de estos reactivos se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6		
Parámetro	Unidad	Objetivo
pH		6,7-7,0
Na ⁺	mM	20-40
K ⁺	mM	3,8-4,2
Ca ⁺²	mM	1,15-1,35
Mg ⁺²	mM	0,80-1,00
BUN	mg/dl	55-65
Creatinina	mg/dl	9,0-11,0

- 5 A las 16 semanas, el porcentaje de aumento de amoníaco en relación con la concentración original de urea era del 2,85 % para la urea 21,4 mM y del 3,11 % para la solución de urea 35,7 mM en el Ejemplo 5 sin aminoácidos añadidos. A concentraciones de urea 35,7 mM y de aminoácidos 10 mM en el Ejemplo 5, el porcentaje de aumento de amoníaco en relación con la concentración de urea original se redujo a 1,90 % para arginina y 1,75 % para ornitina. Esto indica que la urea en solución conduce directamente a la formación de amoníaco en relación con la cantidad de urea añadida a la solución, y la formación de amoníaco puede reducirse mediante la adición de aminoácidos. La Figura 19 ilustra esta relación.
- 10 Por tanto, de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados actualmente, se ha proporcionado un mecanismo para controlar/estabilizar el pH en composiciones acuosas que contienen urea, así como procedimientos para producirlos y usarlos, que satisfacen plenamente los objetivos y ventajas expuestos anteriormente en el presente documento. Aunque la invención se ha descrito junto con los dibujos, la experimentación, los resultados y el lenguaje específicos expuestos anteriormente en el presente documento, es claro que muchas
- 15 alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. La invención se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un reactivo de control de calidad o calibración acuoso dispuesto en un sistema cerrado, comprendiendo la composición:
- urea presente en una concentración en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 150 mM;
- al menos un tampón; y
- 10 al menos una composición que contiene aminoácidos que tiene al menos una amina primaria o secundaria disponible, en la que la relación de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos está en el intervalo de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 100:1.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el pH del reactivo de calibración o control de calidad acuoso varía en +/- 1,0 o menos del pH original después de almacenamiento de la composición en al menos un conjunto de condiciones de almacenamiento seleccionadas entre:
- (a) almacenamiento durante al menos seis meses a una temperatura en un intervalo de 1 °C a 8 °C;
- 20 (b) almacenamiento durante al menos 6 semanas a una temperatura en un intervalo de 9 °C a 17 °C;
- (c) almacenamiento durante al menos cuatro semanas a una temperatura en un intervalo de 18 °C a 32 °C;
- 25 (d) almacenamiento durante al menos 1 semana a una temperatura en un intervalo de 33 °C a 44 °C;
- y
- (e) almacenamiento durante al menos 24 horas a una temperatura en un intervalo de 45 °C a 50 °C.
- 30 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el pH original de la solución está en un intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8.
4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en la que el pH es de +/- 0,1 o menos después de almacenamiento de la composición.
- 35 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la al menos una composición que contiene aminoácidos está presente en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la formación de dióxido de carbono en el reactivo de control de calidad o calibración acuoso, por lo que se observa una concentración de dióxido de carbono de menos de 150 mm Hg +/- 3 % después de almacenamiento de la composición.
- 40 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la relación de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos es aproximadamente 3,57:1.
- 45 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sistema cerrado es un sistema cerrado con espacio de cabeza cero.
8. Un kit que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 50 9. El kit de la reivindicación 8, que se define que además que comprende:
- al menos una composición que comprende el reactivo de control de calidad acuoso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
- al menos una composición que comprende el reactivo de calibración acuoso de cualquiera de las
- 55 reivindicaciones 1-7; y
- al menos una solución de lavado.
- 60 10. Un procedimiento para estabilizar el pH de un reactivo de calibración o control de calidad acuoso que contiene urea y al menos un tampón, en el que la concentración de urea original del reactivo de calibración o control de calidad acuoso está en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 150 mM, comprendiendo el procedimiento la etapa de: disponer al menos una composición que contiene aminoácidos que tiene al menos una amina primaria o secundaria disponible en el reactivo de control de calidad o calibración acuoso, en el que la relación de urea a la al menos una composición que contiene aminoácidos está en un intervalo de aproximadamente 0,1:1 a
- 65 aproximadamente 100:1.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el pH del reactivo de calibración o control de calidad acuoso varía en +/- 1,0 o menos del pH original después de almacenamiento de la composición en al menos un conjunto de condiciones de almacenamiento seleccionadas entre:

- 5 (a) almacenamiento durante al menos seis meses a una temperatura en un intervalo de 1 °C a 8 °C;
- (b) almacenamiento durante al menos 6 semanas a una temperatura en un intervalo de 9 °C a 17 °C;
- 10 (c) almacenamiento durante al menos cuatro semanas a una temperatura en un intervalo de 18 °C a
32 °C;
- (d) almacenamiento durante al menos 1 semana a una temperatura en un intervalo de 33 °C a 44 °C;
y
- 15 (e) almacenamiento durante al menos 24 horas a una temperatura en un intervalo de 45 °C a 50 °C.

12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que la al menos una composición que contiene aminoácidos está presente en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la formación de amoníaco en el reactivo de control de calidad o calibración acuoso en al menos un 20 % después de almacenamiento de la composición.

20

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la concentración de urea en la composición está entre aproximadamente 1,5 mM y aproximadamente 55 mM.

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que el pKa de al menos un grupo carboxilo de aminoácidos en la composición que contiene al menos un aminoácido está en el intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,7.

25

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en el que la al menos una composición que contiene aminoácidos es también el al menos un tampón presente en la composición.

30

FIGURA 1

Experimento de lisina especial de 200 Cal

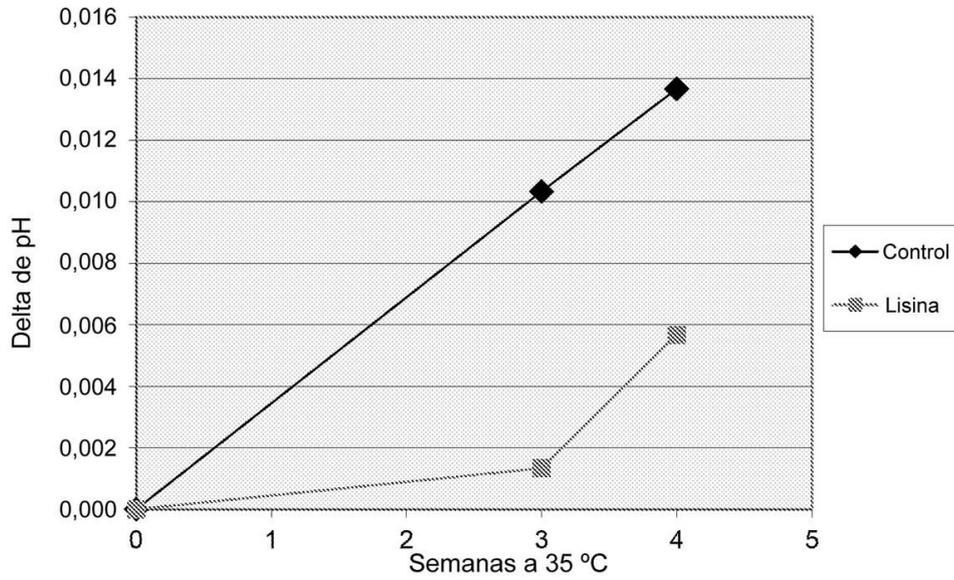


FIGURA 2

Desplazamiento de pH del reactivo RCx debido a la generación de amoníaco a partir de la degradación de la urea 4 semanas a 45 °C

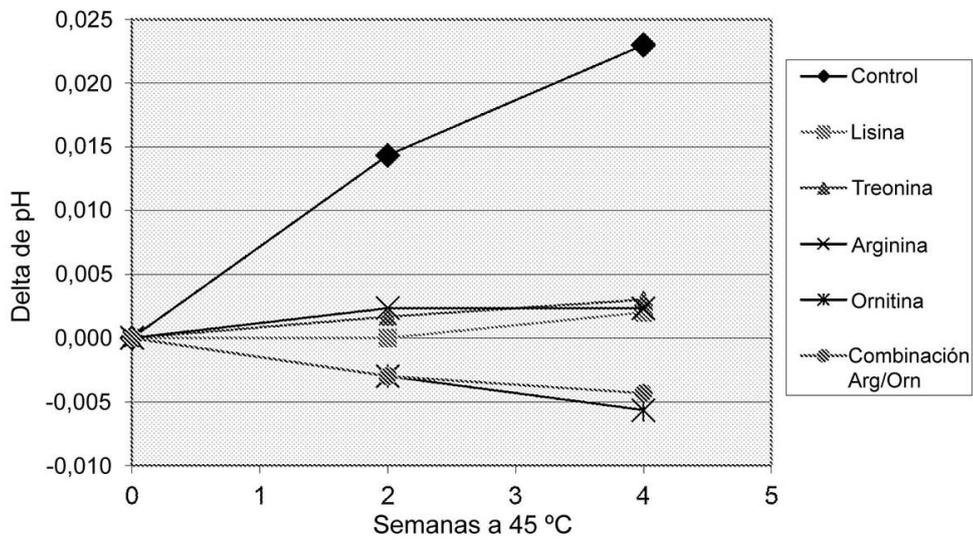


FIGURA 3

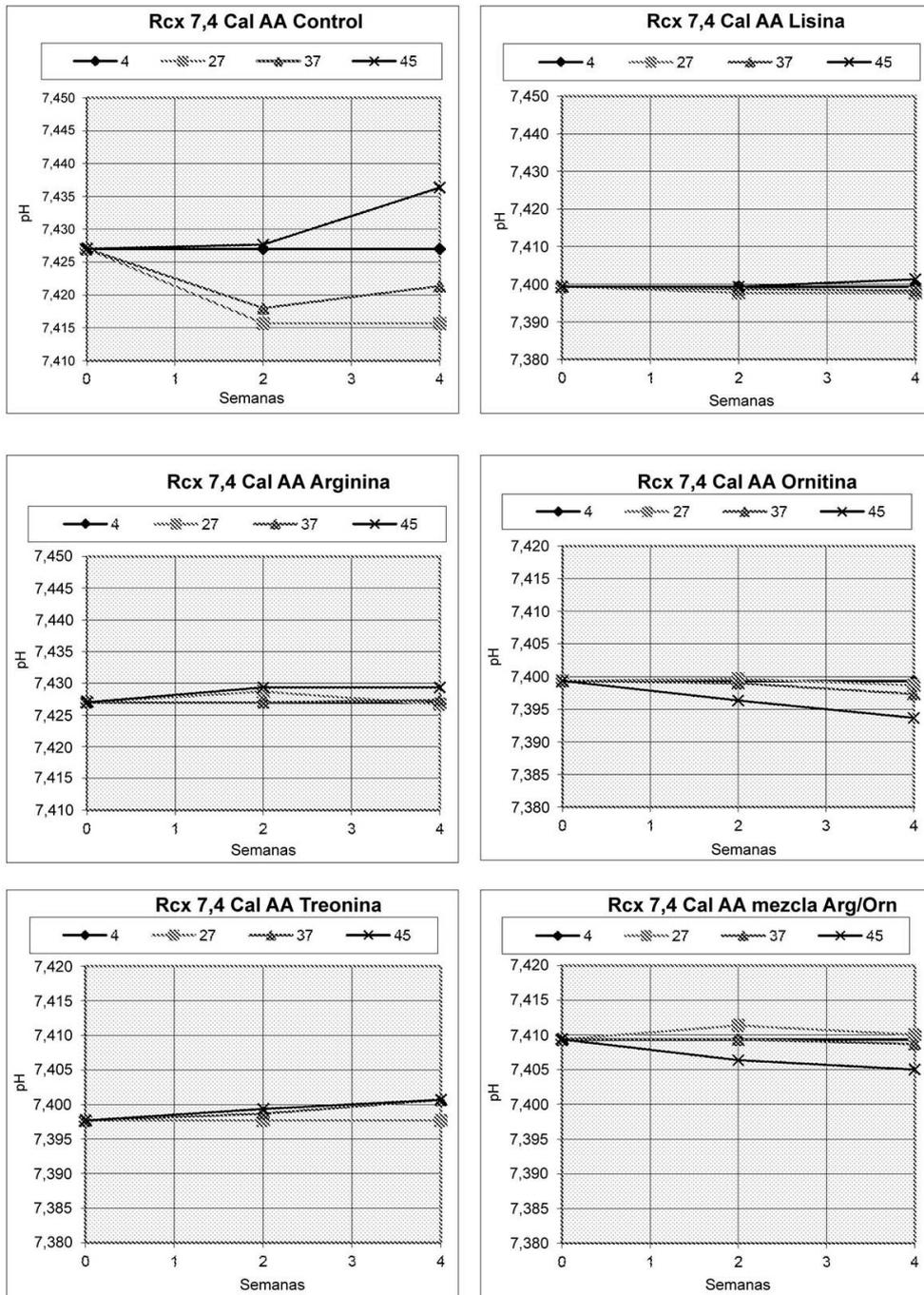


FIGURA 4

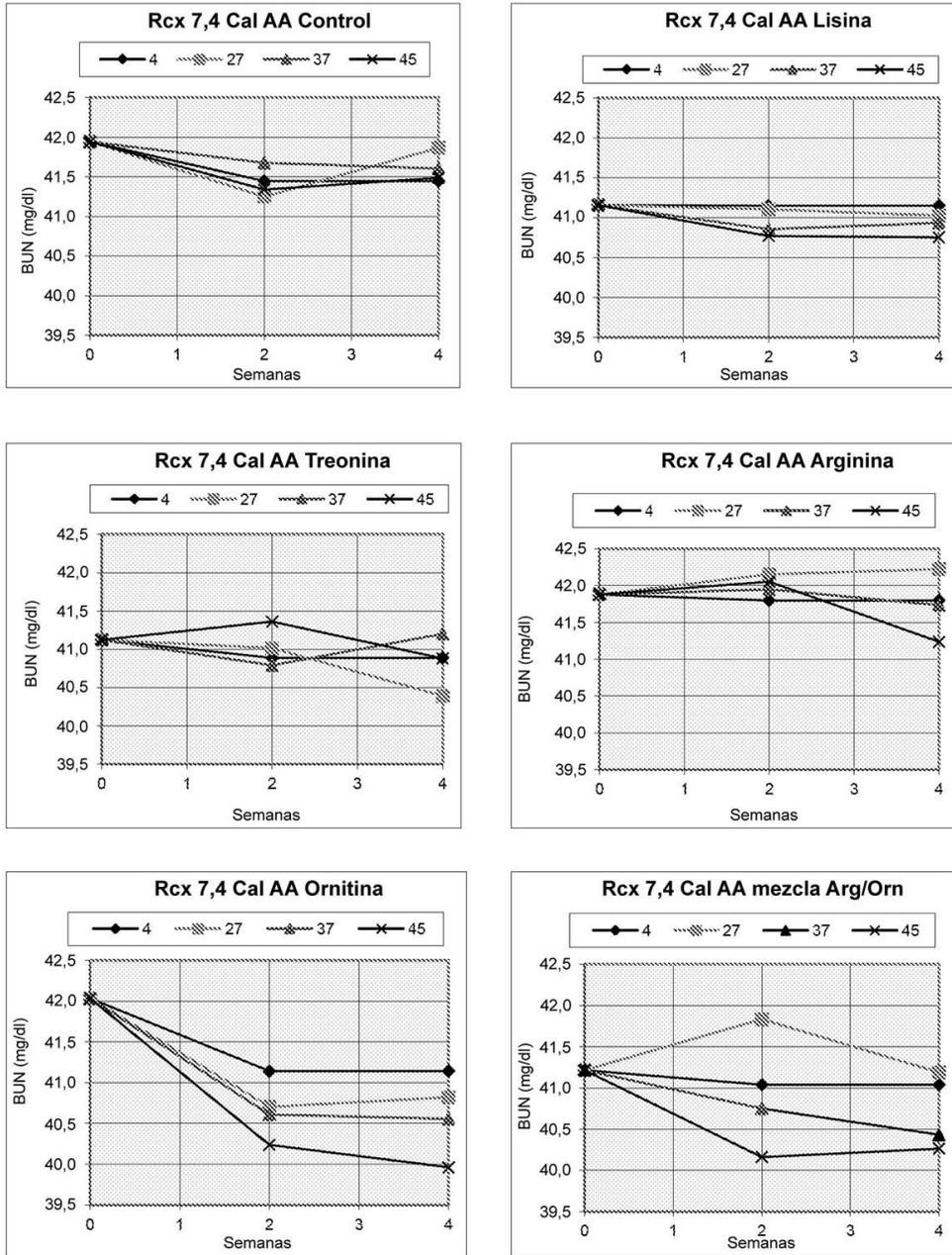


FIGURA 5

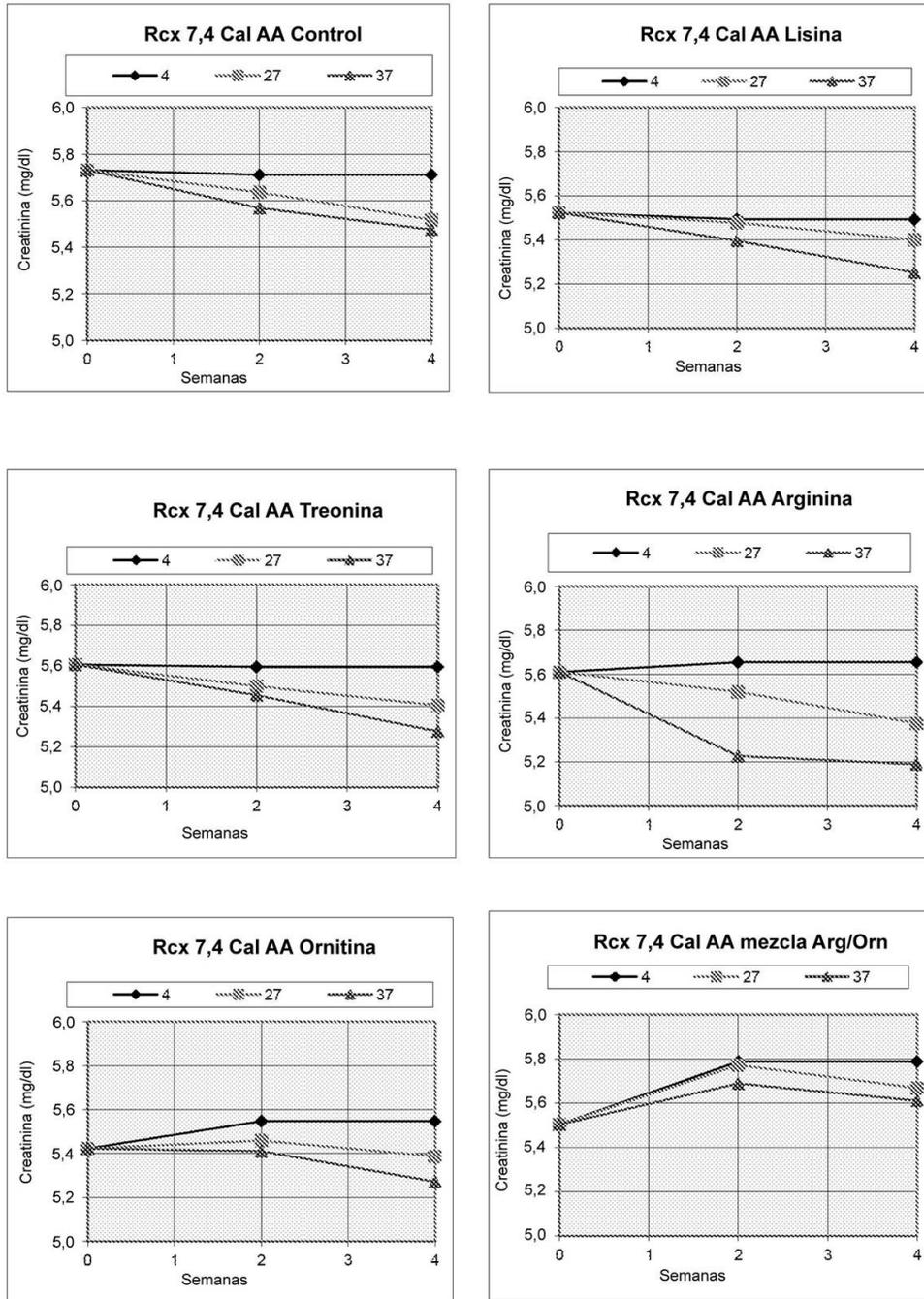


FIGURA 6

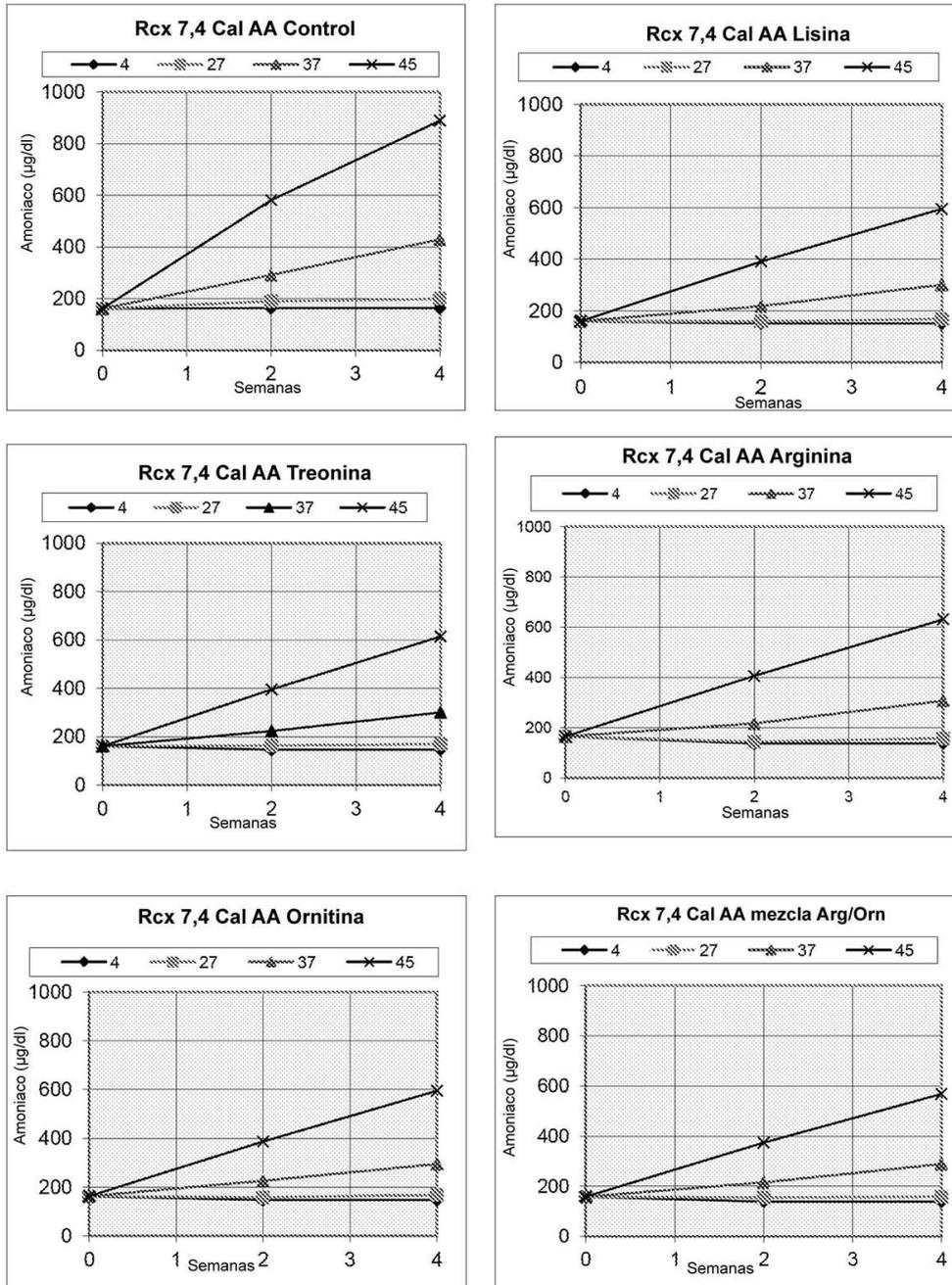


FIGURA 7
Generación de amoníaco del reactivo RCx debido a la degradación de la urea 4 semanas a 45 °C

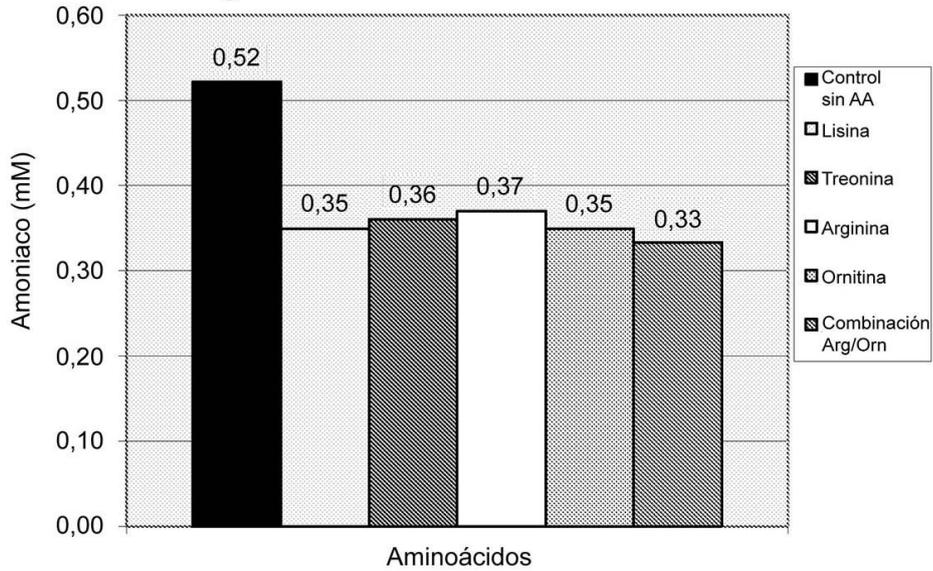


FIGURA 8
Desplazamiento de pH de Rgt C debido a la generación de amoníaco a partir de la degradación de la urea 4 semanas a 45 °C

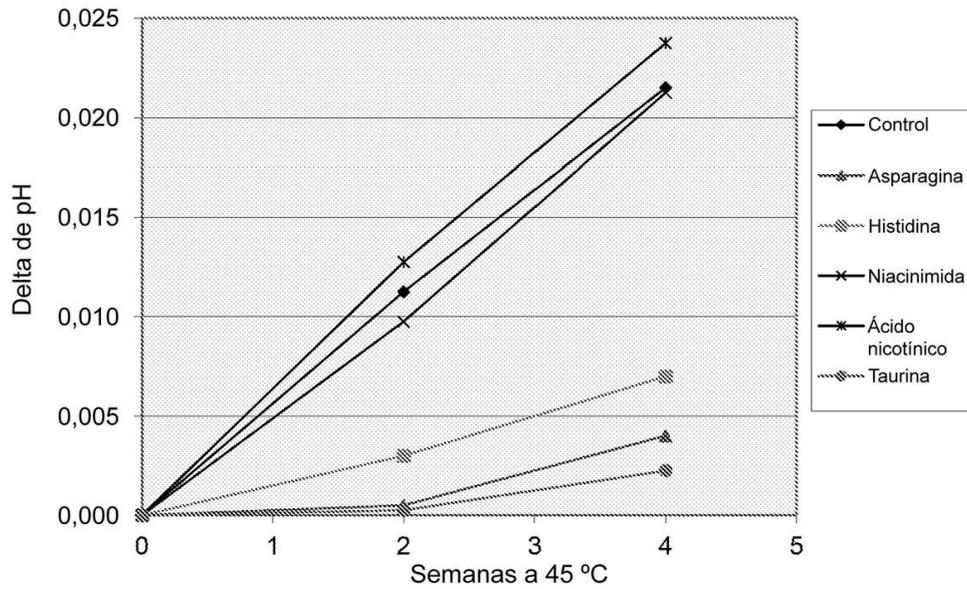


FIGURA 9

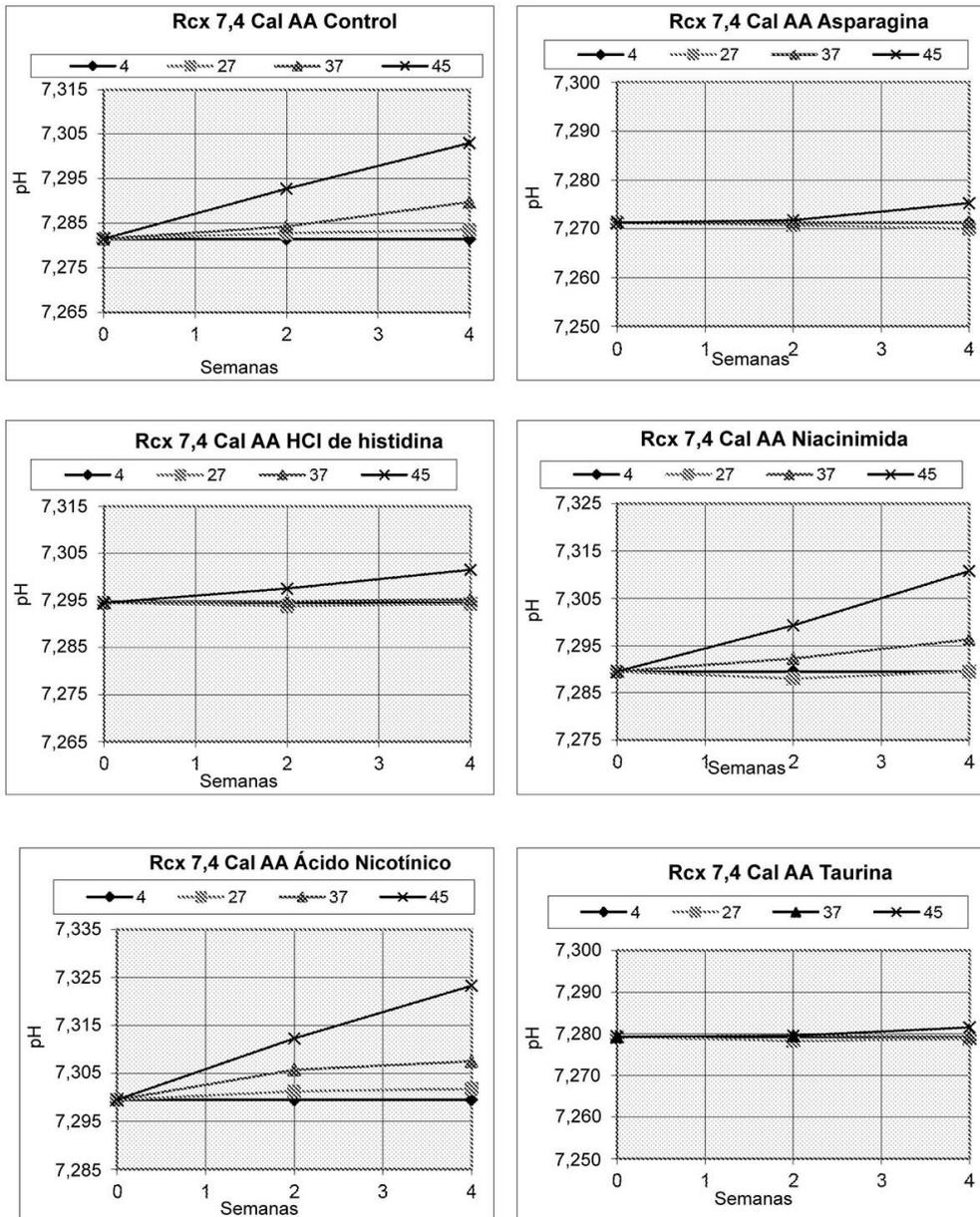


FIGURA 10

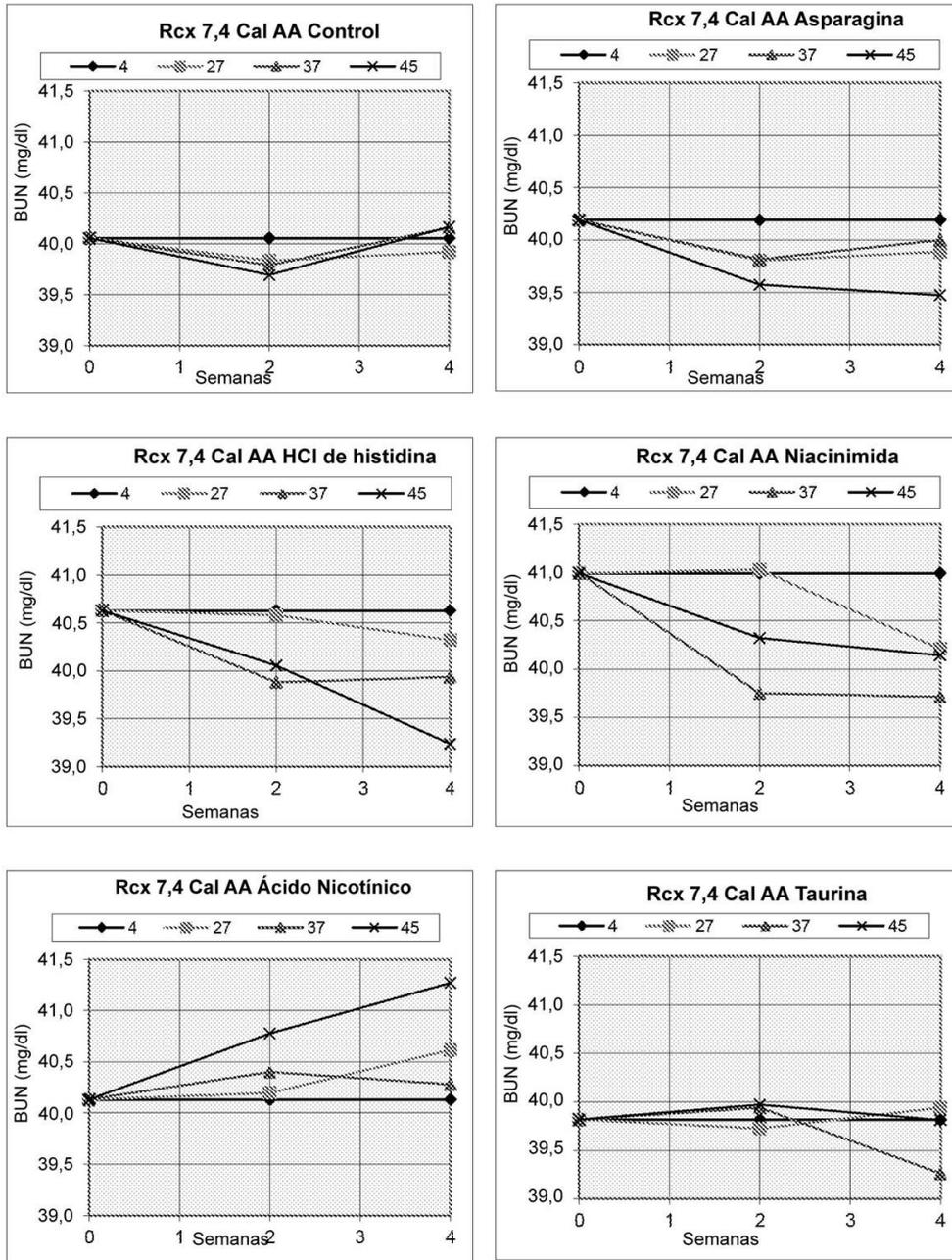


FIGURA 11

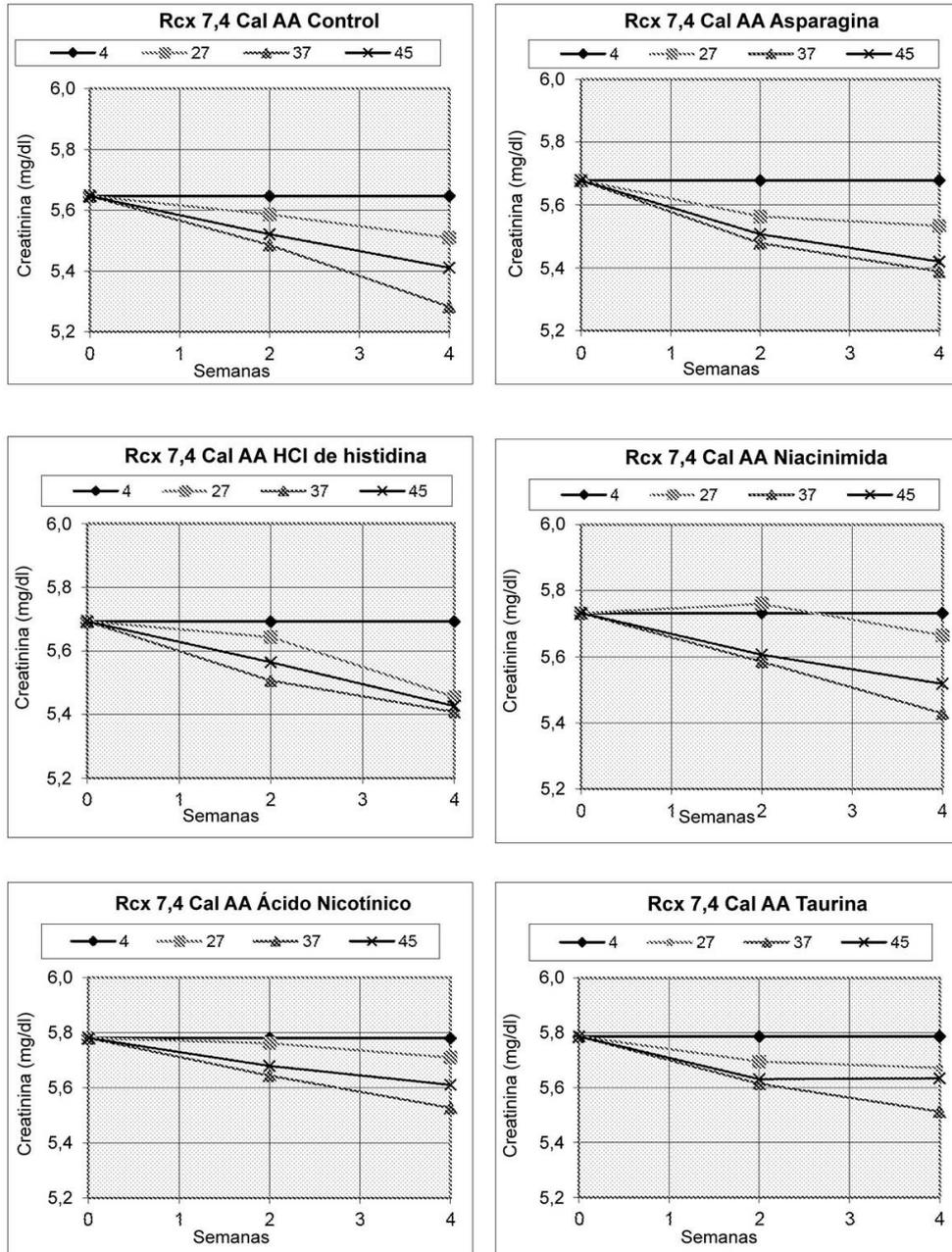


FIGURA 13

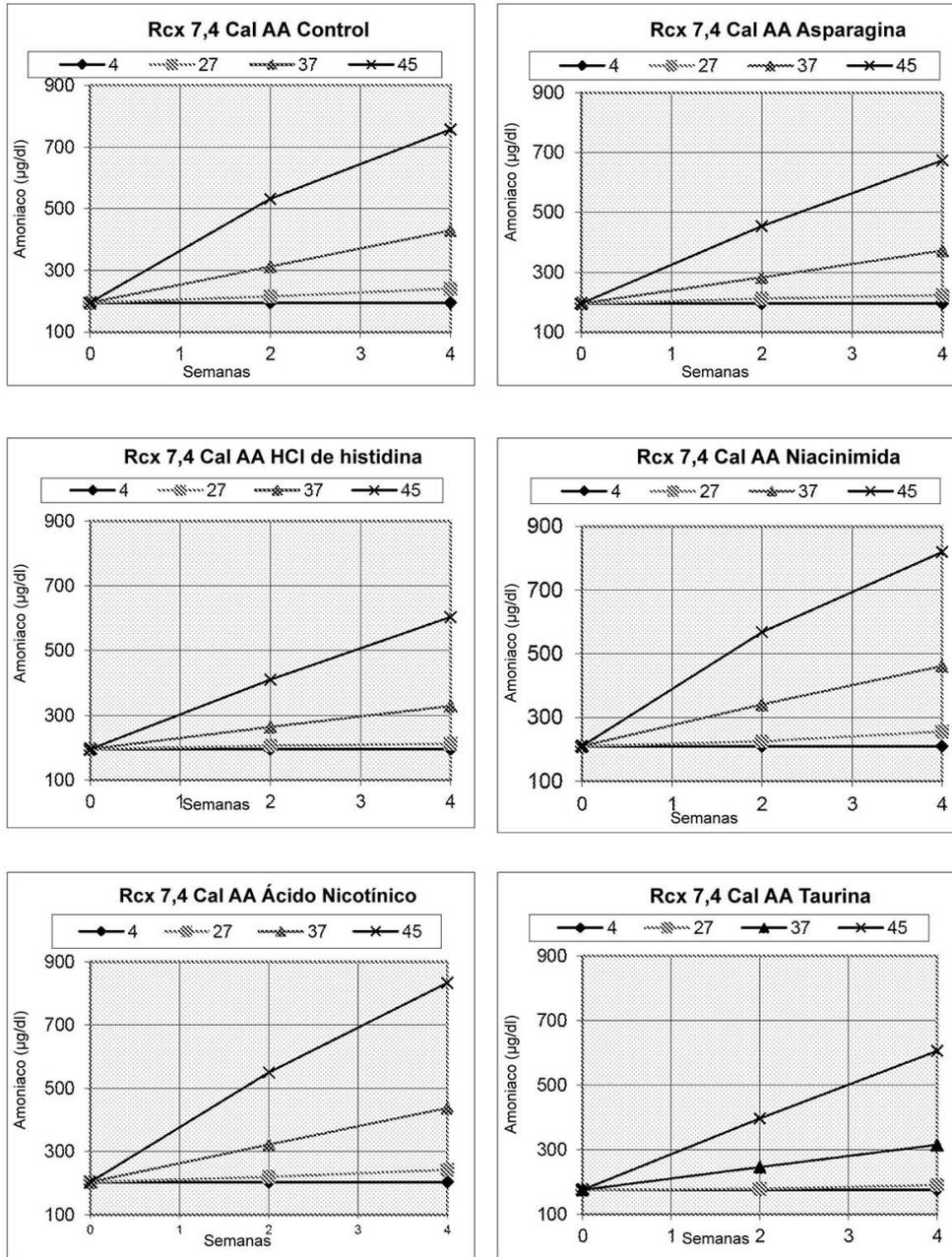


FIGURA 12
Generación de amoníaco de RCx debido a la degradación de la urea

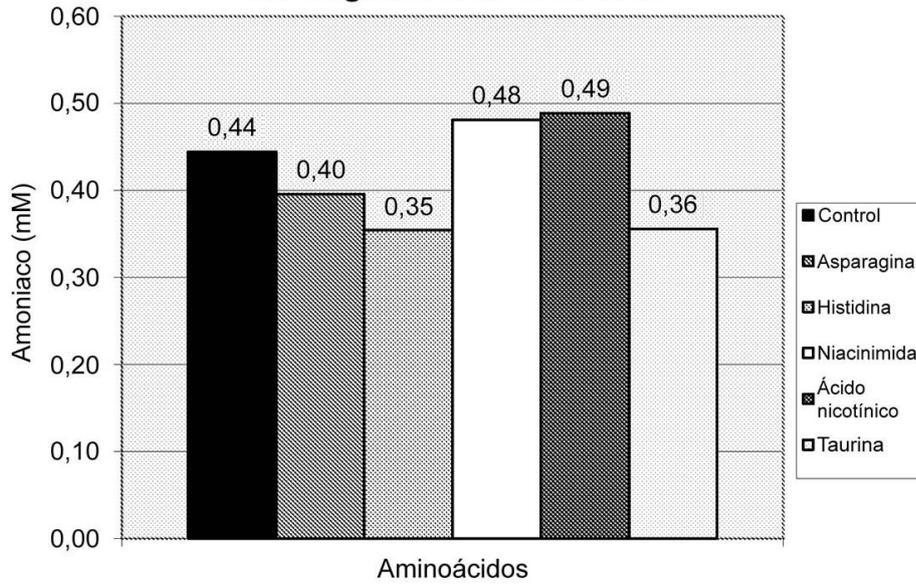


FIGURA 14
Experimento de Zero Cal con lisina

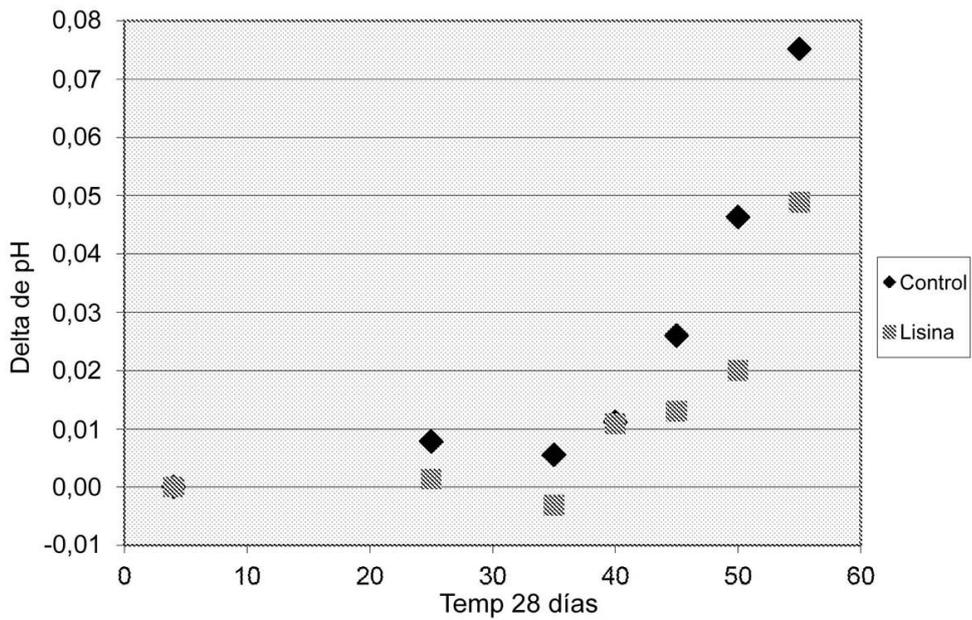


FIGURA 15

BUN 100 mg/dl en soluciones de calibración, regulación de amoniaco por aminoácidos frente a control sin aminoácidos

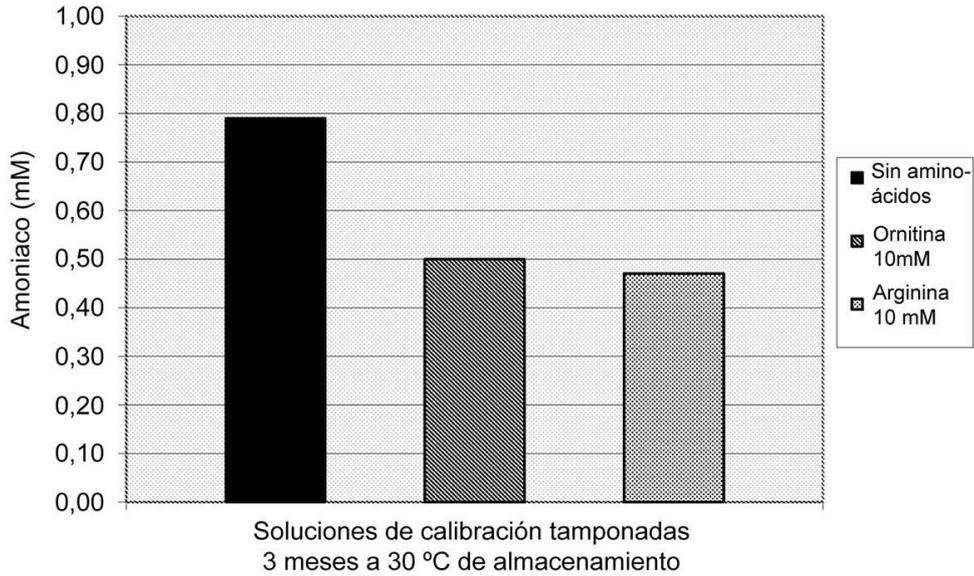


FIGURA 16

BUN 100 mg/dl en soluciones de calibración, regulación de amoniaco por aminoácidos frente a control sin aminoácidos

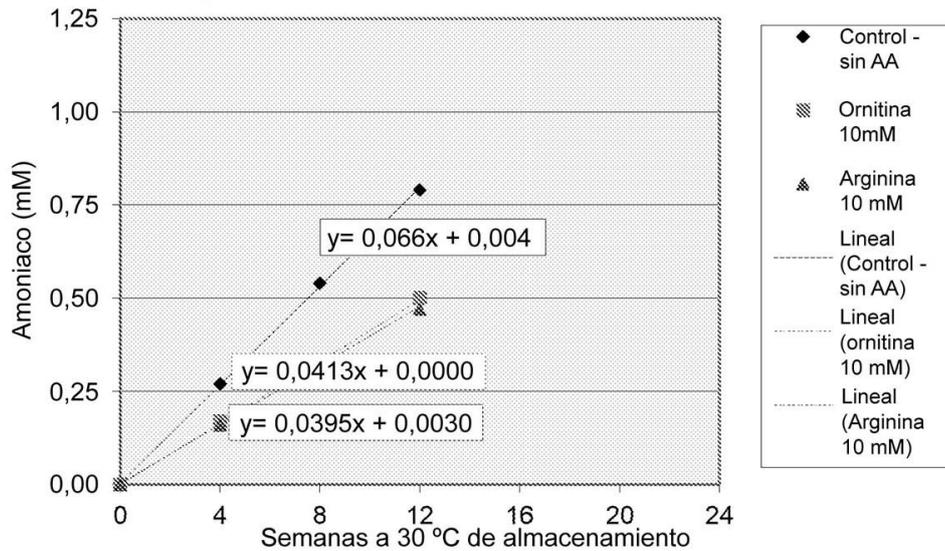


FIGURA 17
BUN 100 mg/dl en soluciones de calibración, estabilidad de pH de aminoácidos frente a control sin aminoácidos

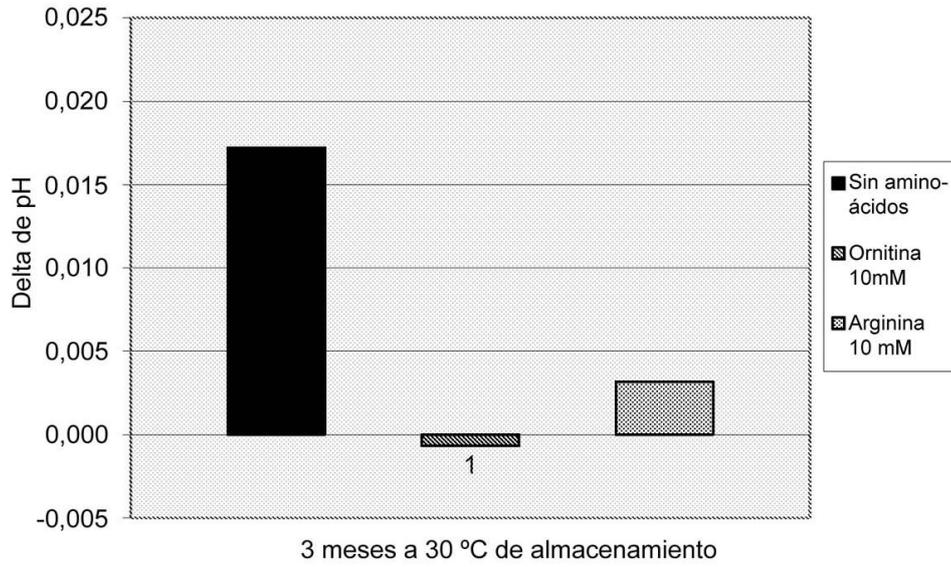


FIGURA 18
BUN 100 mg/dl en soluciones de calibración, estabilidad de pH de aminoácidos frente a control sin aminoácidos

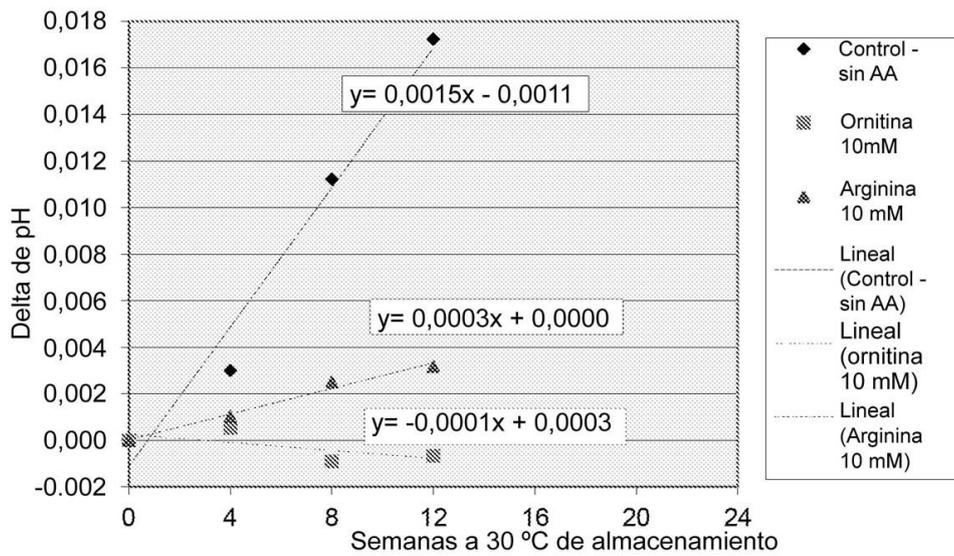


FIGURA 19

Porcentaje de aumento de amoníaco en relación con la concentración original de urea

