



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 963**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06709294 .0**

96 Fecha de presentación : **10.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1846570**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **Procedimiento de detección y/o de medición a alto caudal de una actividad lipásica o fosfolipásica.**

30 Prioridad: **11.02.2005 FR 05 01425**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Vergier, Robert;
Serveau-Avesque, Carole y
Chahinian, Henri**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 366 963 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 de detección y/o de medición a alto caudal de una actividad lipásica o fosfolipásica.

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* a alto caudal de una actividad lipásica o fosfolipásica, así como sus aplicaciones.

La elaboración de métodos analíticos para la detección y la dosificación de lipasas ha sido el objeto de investigaciones desde hace numerosos años (Beisson F., Tiss A., Rivière C. y Verger R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2: 133-153).

10 Unos triglicéridos naturalmente fluorescentes para detectar actividades lipásicas muy bajas han sido utilizados con el objetivo de caracterizar las propiedades cinéticas y enantioselectivas de las lipasas generadas mediante la técnica del "phage display" (Beisson F., Ferté N., Nari J., Noat G., Arondel V. y Verger R. (1999). Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. J. Lipid Res. 40: 2313-2321).

15 El principio de este método se basa por un lado en la presencia en el aceite de parinarario de un ácido graso naturalmente fluorescente (ácido parinárico) que posee cuatro dobles enlaces conjugados y por consiguiente absorbe la luz en el campo ultravioleta y la reemite mediante un fenómeno de fluorescencia. Bajo la acción hidrolítica de las lipasas, el ácido parinárico se libera del triglicérido de origen para ser solubilizado en una fase micelar. Este cambio de fase (de una fase emulsificada hacia una fase micelar) se acompaña de una variación de emisión espectral de fluorescencia que ha sido aprovechada para seguir, con una gran sensibilidad, la evolución en el curso del tiempo de la reacción de hidrólisis.

20 Una de las limitaciones de este método fluorescente está relacionada con la oxidabilidad por el oxígeno atmosférico de los cuatro dobles enlaces conjugados del ácido parinárico. Es por eso que los inventores han extrapolado el mismo principio de medición a un aceite extraído de la madera de China (Tung oil) y utilizado desde la antigüedad en la fabricación de las lacas chinas. Este aceite contiene una proporción muy grande de ácido α -eleosteárico que posee sólo tres dobles enlaces conjugados y que no es fluorescente pero absorbe la luz ultravioleta. Este ácido es asimismo mucho menos oxidable que el ácido parinárico. Así es como los inventores han utilizado por un lado las propiedades de absorción ultravioleta del ácido alfa-eleosteárico y, por otro lado, el cambio de fase descrito anteriormente (de una fase emulsificada hacia una fase micelar) para poner a punto un método denominado en "emulsión" descrito en el artículo de Pencreac'h G., Graille J., Pina M. y Verger R. (2002) An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. Anal. Biochem, 303: 17-24.

25 El documento US 20040014133 describe unos procedimientos de detección de una actividad lipásica, por ejemplo, mediante SPA o fluorescencia, y obtiene una buena reproducibilidad uniendo el sustrato después de la modificación sobre la fase sólida (ejemplo biotina).

30 En el marco del desarrollo de estas investigaciones, los inventores han utilizado los triglicéridos purificados del aceite de tung para cubrir con una película muy delgada (equivalente a algunos centenares de capas monomoleculares) los pocillos de placas de microtitulación (constituidos por un material plástico no absorbente en el ultravioleta). Los inventores han demostrado que esta película delgada de triglicéridos permanece perfectamente adsorbida en las paredes de los pocillos, incluso después del aclarado mediante diferentes tampones acuosos. Bajo la acción hidrolítica (en la interfaz aceite-agua) de diferentes lipasas, tal como se ha descrito anteriormente, el ácido α -eleosteárico se libera y se solubiliza en fase micelar. Por consiguiente, su espectro de absorción ultravioleta se modifica y, por otro lado, el camino óptico aumenta considerablemente tras el paso del estado adsorbido al estado soluble, lo cual constituye una ventaja significativa para la técnica por revestimiento o "coating".

35 La presente invención es el resultado de la demostración por los inventores del hecho de que esta nueva técnica por revestimiento o "coating" de lípidos (triglicéridos o ésteres de síntesis) presenta con relación a la técnica en "emulsión" anterior, las ventajas siguientes:

- 40 - una mejor conservación a lo largo del tiempo de los sustratos lipídicos adsorbidos (o "revestidos") en los pocillos de las placas de microtitulación,
- 45 - una actividad de las lipasas más elevada sobre el sustrato "revestido" que sobre el sustrato en emulsión,
- 50 - una mejor reproducibilidad de los experimentos con el sustrato "revestido",
- 55 - una relación señal/ruido más favorable debido al incremento del camino óptico tras el paso del estado adsorbido al estado soluble.

60 Así, la presente invención tiene por objetivo proporcionar un nuevo método de medición de la actividad lipásica que

es más específico, cuantitativo y sensible, que los métodos descritos hasta ahora en este campo, y que permite medir actividades lipolíticas muy débiles (equivalentes a una cantidad mínima de aproximadamente 2 ng para la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, "TLL"), utilizando un sustrato natural de las lipasas.

5 La presente invención tiene asimismo por objetivo proporcionar un nuevo método de medición de la actividad lipásica que permite cribar a alto caudal los numerosos mutantes de las lipasas susceptibles de ser generados gracias a la técnica del "phage display".

10 La invención tiene asimismo por objetivo proporcionar un nuevo método de medición de la actividad lipásica a alto caudal para seleccionar unos mutantes y unas lipasas enantioselectivas, con la ayuda de los ésteres quirales, de interés farmacéutico y biotecnológico, que contienen ácido alfa-eleosteárico. Estos mutantes así seleccionados podrán servir de catalizadores enzimáticos para la síntesis asimétrica de moléculas de interés farmacéutico y agroalimentario.

15 La invención tiene asimismo por objetivo proporcionar un nuevo método de medición de la actividad lipásica que se puede utilizar en clínica humana, para la medición de la lipasemia plasmática, durante el diagnóstico precoz de diversas afecciones pancreáticas.

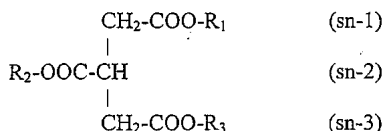
20 La invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* de una actividad lipásica o fosfolipásica característica de una lipasa o fosfolipasa de origen natural o sintético en una muestra susceptible de contener esta lipasa o fosfolipasa, caracterizado porque comprende:

- 25 - añadir la muestra mencionada anteriormente susceptible de contener dicha lipasa o fosfolipasa en disolución acuosa, en los pocillos de placas de microtitulación revestidos con una capa de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 µm, y preferentemente de aproximadamente 1 µm de grosor de un sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por dicha lipasa o fosfolipasa liberando ácido α-eleosteárico que se solubiliza en fase micelar en dicha disolución acuosa,
- 30 - detectar y/o medir la actividad lipásica o fosfolipásica mediante espectrofotometría en el espectro de absorción UV del ácido α-eleosteárico liberado durante la etapa anterior.

35 Por lipasa o fosfolipasa de origen natural o sintético se entiende cualquier lipasa o fosfolipasa de mamíferos o de microorganismos (bacterias, hongos, etc.), llegado el caso modificada por mutación de uno o varios aminoácidos. La actividad lipásica puede ser medida clásicamente según los métodos descritos en particular en Beisson *et al.* (Beisson F., Tiss A., Rivière C. y Verger R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2: 133-153). La actividad lipásica o fosfolipásica puede ser, por ejemplo, medida por el método descrito en Wolf *et al.* (Wolf C., Sagaert L. y Bereziat G. (1981) A sensitive assay of phospholipases using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin. Biochem. Biophys. Res. Com. 99: 275-283) en el que se ha utilizado un fosfolípido de síntesis que contiene ácido parinárico para medir la actividad enzimática de una fosfolipasa A2 de veneno de serpiente.

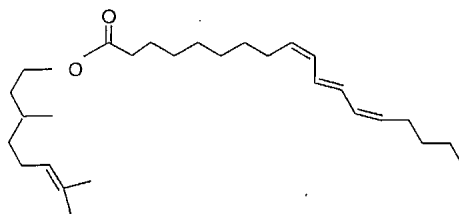
40 La invención se refiere más particularmente a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por dicha lipasa o fosfolipasa liberando ácido α-eleosteárico es un lípido seleccionado de entre unas moléculas de interés industrial y/o farmacéutico en el que se unen de manera covalente unos grupos α-eleostearatos, y seleccionado en particular de entre:

- los triglicéridos purificados del aceite de tung de fórmula general



50 en la que R₁ y R₃ representan unos residuos de ácido graso idénticos o diferentes, que comprenden aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono, y preferentemente 18 átomos de carbono, y que presentan eventualmente una o varias insaturaciones y en la que R₂ representa el ácido α-eleosteárico

- 55 - teniendo los di- y monoglicéridos, o unos ésteres de colesterol o unos fosfolípidos 1 ó 2 cadenas de α-eleostearato en posición adecuada según el tipo de regioselectividad de las lipasas o de las fosfolipasas buscadas,
- el α-eleostearato de citronelol de fórmula siguiente:



- 5 - o unos ésteres de ácido α -eleosteárico con otros alcoholes o moléculas proquirales o quirales de interés farmacéutico tal como el propanolol, el sotalol o el carvedilol utilizados como β -bloqueante, o con unas moléculas de interés industrial tal como el mentol (derivado terpénico de interés aromático).

10 En particular, los triglicéridos de síntesis en los que R_1 y R_3 tales como los definidos anteriormente representan unos restos de ácidos grasos idénticos o diferentes, que comprenden aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono, y preferentemente 18 átomos de carbono, y que presentan eventualmente una o varias insaturaciones, y en los que R_2 representa el ácido α -eleosteárico permiten cribar unas lipasas sn-2 específicas (es decir capaz de liberar el ácido graso presente en la posición sn-2 de los triglicéridos). De manera comparable, los fosfolípidos de síntesis que contienen el ácido α -eleosteárico en la posición sn-1 y/o sn-2 permiten medir las actividades enzimáticas de las fosfolipasas A1 y/o de las fosfolipasas A2, siendo una fosfolipasa A1 definida como una enzima capaz de liberar el ácido graso presente en la posición sn-1 de los glicerofosfolípidos, y siendo una fosfolipasa A2 definida como una enzima capaz de liberar el ácido graso presente en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos.

20 En el aceite de tung, los ácidos grasos en cantidad importante son: el ácido α -eleosteárico (70-80%), el ácido oleico (10%) y el ácido linoleico (15%), tal como se ha descrito en particular en Radunz *et al.* (A. Radunz, P. He y G. H. Schmid, Analysis of the seed lipids of Aleurites montana. Z. Naturforsch 53 (1998), p. 305-310).

25 La invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como el definido anteriormente, caracterizado porque comprende, previamente a la adición de la muestra susceptible de contener la lipasa o la fosfolipasa en los pocillos de placas de microtitulación, una etapa de adición a los pocillos de las placas de microtitulación revestidas con el sustrato lipídico, de una disolución tampón constituida por Tris y por sales biliares (NaTDC) y, llegado el caso, por β -ciclodextrina, en particular en las proporciones siguientes: NaTDC (4 mM) y β -ciclodextrina (3 mg/ml).

La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento tal como el definido anteriormente, caracterizado porque las placas de microtitulación revestidas con el sustrato lipídico son tales como las obtenidas mediante:

- 30 - la adición de una composición que comprende el sustrato lipídico en disolución en un disolvente apropiado susceptible de poder ser evaporado al vacío, tal como el hexano o el éter de petróleo, siendo esta adición, llegado el caso, efectuada después del lavado de los pocillos de dichas placas con dicho disolvente,
- 35 - la evaporación al vacío de dicho disolvente hasta la formación de un revestimiento con dicho sustrato lipídico de 0,5 a 5 μ m, y preferentemente de 1 μ m de grosor en las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación.

40 La invención tiene más particularmente por objeto un procedimiento tal como el definido anteriormente, de medición *in vitro* de la lipasemia plasmática en el ser humano o en el animal, caracterizado porque la muestra que contiene la lipasa es una muestra sanguínea extraída del ser humano o del animal.

La presente solicitud describe asimismo la aplicación de un procedimiento tal como el definido anteriormente, al diagnóstico *in vitro* de patologías relacionadas con un incremento del porcentaje plasmático de lipasa en el ser humano o en el animal, con respecto a los porcentajes plasmáticos de esta lipasa en un individuo sano.

45 La invención se refiere más particularmente a la aplicación mencionada anteriormente de un procedimiento tal como el definido anteriormente, al diagnóstico *in vitro*:

- 50 - de afecciones pancreáticas tales como la pancreatitis aguda, la pancreatitis crónica, caracterizadas por un incremento del porcentaje plasmático de lipasa en el ser humano o en el animal, con respecto a los porcentajes plasmáticos de esta lipasa en un individuo sano, o
- de la insuficiencia renal, los traumatismos del abdomen (isquemia, infarto mesentérico, perforación u oclusión intestinal).

55 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de placas de microtitulación que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por una lipasa o una fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- añadir a los pocillos de dichas placas una composición que comprende el sustrato lipídico en disolución en un disolvente apropiado susceptible de poder ser evaporado al vacío, tal como el hexano o el éter de petróleo, siendo esta adición, llegado el caso, efectuada después del lavado de los pocillos de dichas placas con dicho disolvente,

5 - evaporar al vacío dicho disolvente hasta la formación de un revestimiento con dicho sustrato lipídico de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 μm , y preferentemente de aproximadamente 1 μm de grosor en las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación.

10 La invención tiene asimismo por objeto las placas de microtitulación que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por una lipasa o una fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico, tales como las obtenidas mediante el procedimiento mencionado anteriormente, siendo el revestimiento con dicho sustrato lipídico en las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación de 0,5 a 5 μm , y preferentemente de 1 μm de grosor.

15 La invención tiene más particularmente por objeto la utilización de las placas de microtitulación mencionadas anteriormente que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico, para la realización de un procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* de una actividad lipásica o fosfolipásica tal como el definido anteriormente, o para la realización de un procedimiento de cribado de inhibidores de enzimas lipolíticas (inhibidores de lipasas o de fosfolipasas) que comprende una etapa de medición de su eventual capacidad para inhibir dichas enzimas gracias al procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* de una actividad lipásica o fosfolipásica según la invención.

25 Leyenda de las figuras

La figura 1 representa los protocolos de preparación de las microplacas: "coating" *versus* emulsión. El sustrato lipídico se adsorbe en cada pocillo de la microplaca ("coating") o se prepara en emulsión y después se deposita en la microplaca (Emulsión).

30 Las figuras 2a y 2b representan la estabilidad del sustrato lipídico adsorbido o emulsificado.

En la figura 2a, la microplaca ha sido preparada mediante "coating" del éster S citronelol- α -eleostearato (80 μg /pocillo) y conservada varios días a 4°C. La estabilidad del coating ha sido estudiada mediante la dosificación de la actividad lipolítica de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (10 nM final) diferentes días después del "coating" del éster en un tampón Tris 10 mM pH 8,0, CaCl₂ 6 mM, EDTA 1 mM, BHT 0,001% y β -ciclodextrina 3 mg/ml. La figura 2a representa la actividad enzimática relativa (%) durante varios días después del "coating".

En la figura 2b, se han realizado y distribuido (200 μl) unas emulsiones a 20 μg /ml de α -eleostearato de S citronelol en cada pocillo de la placa de microtitulación. La estabilidad de las emulsiones se prueba midiendo la actividad de la TLL a diferentes tiempos después de la emulsificación, tal como se ha descrito anteriormente para la figura 2a.

La figura 3 representa la reproducibilidad de las actividades de la TLL dosificadas en el éster S citronelol- α -eleostearato "revestido" o en emulsión. La actividad de la TLL (4 nM) ha sido ensayada sobre el éster S citronelol- α -eleostearato adsorbido (80 μg /pocillo) o en emulsión (20 μg /ml) en microplaca en un tampón Tris 10 mM pH 8,0, CaCl₂ 6 mM, EDTA 1 mM, BHT 0,001% y β -ciclodextrina 3 mg/ml. Las velocidades se expresan en mili-unidades de absorbancia aparecidas por minuto (mAU/min.). La variabilidad de los resultados ha sido calculada en 8 experimentos para cada una de las condiciones experimentales.

Las figuras 4A y 4B representan la cinética de inhibición de la HPL (lipasa pancreática humana) por la THL (tetrahidrolipstatina). La microplaca se prepara mediante "coating" de los triglicéridos (50 μg /pocillo) extraídos a partir del aceite de tung que contiene una fuerte proporción de ácido α -eleosteárico. Una disolución (200 μl) de tampón Tris se añade en los pocillos. La actividad de la HPL sola, o pre-incubada con la THL, se mide mediante el registro de la densidad óptica (método A; figura 4A). La figura 4A representa la densidad óptica (DO) a 272 nm en función del tiempo. La curva con los círculos negros corresponde a la lipasa HPL sola; la curva con los cuadrados negros corresponde a la lipasa HPL pre-incubada con la THL en una relación 1:100 y la curva con los círculos blancos corresponde a la lipasa pre-incubada con la THL en una relación de 1:50.

La figura 4B corresponde a un protocolo diferente (método B): después de la inyección de la HPL (a la concentración final de 2 nM), la THL se inyecta en el medio de reacción (a la concentración final de 10 nM) durante la lipólisis.

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente de la realización de un método de medición de una actividad lipasa con la ayuda de las placas de microtitulación según la invención (método denominado de "coating"), por comparación con un método de medición denominado por "emulsión".

65 Este estudio ha sido realizado llevando a cabo en paralelo el estudio de la actividad lipásica o bien por "coating" de

lípidos (triglicéridos naturales o ésteres de síntesis), o bien en unas emulsiones realizadas previamente en un tubo, antes de la repartición de muestras en los pocillos de la microplaca (figura 1).

El estudio comparado "coating" *versus* "emulsión" utilizando unos ésteres enantioméricos (α -eleostearato de R o S citronelol) muestra claramente que el "coating" de estos sustratos sobre la microplaca presenta varias ventajas:

1. Mejor conservación a lo largo del tiempo de los sustratos revestidos

Una disolución de α -eleostearato de citronelol ha sido "revestida" (80 μ g/pocillo) en los 96 pocillos de una microplaca. La actividad de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (10 nM, concentración final) ha sido ensayada a continuación diferentes días después del "coating". La microplaca se ha conservado a 4°C, con o sin tampón en los pocillos. En el gráfico de la figura 2a, se puede observar que la actividad de la lipasa sigue constante a lo largo del tiempo, lo cual indica que la fijación del sustrato sobre la microplaca es reproducible y estable por lo menos durante 20 días.

En paralelo, se realizan unas emulsiones a 20 μ g/ml de α -eleostearato de S citronelol inyectando 12 μ l de una disolución de éster (5 mg/ml en etanol-BHT (Butylated Hydroxy Toluene) 0,001%) en el tampón de actividad de la lipasa (c.s.p. 3 ml), creando así un flash etanólico. La disolución se agita a continuación con un "vortex" durante 2 minutos. La estabilidad de las emulsiones se prueba midiendo la actividad de la TLL (10 nM) a diferentes tiempos después de la emulsificación. La actividad de la lipasa no es constante a lo largo del tiempo y disminuye significativamente 30 minutos después de la fabricación de la emulsión (figura 2b). Estos resultados indican que las emulsiones no se pueden conservar y por lo tanto deben ser utilizadas inmediatamente después de su fabricación. Esto es un inconveniente principal con respecto al "coating" de los sustratos en microplaca que puede ser realizado varios días antes.

2. Actividad de las lipasas más elevada sobre el sustrato "revestido" que sobre la emulsión

La actividad de la lipasa es más elevada con el sustrato "revestido" que con el sustrato en emulsión (véase la figura 3).

3. Mejor reproducibilidad de los experimentos con el sustrato "revestido"

La dispersión de los resultados obtenida mediante el cálculo de las medias y de las desviaciones estándares sobre 8 experimentos es más importante con los sustratos en emulsión (figura 3). Además, la fabricación de las emulsiones es difícil de obtener de manera reproducible (véase anteriormente).

En conclusión, el desarrollo de este ensayo en microplaca es un método que representa un carácter innovador con respecto a todos los métodos anteriores (Beisson *et al.*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2000, 2: 133 - 153) para la dosificación rápida y continua de las lipasas con unos triglicéridos naturales, que se basa en las propiedades espectrales en el UV del ácido α -eleosteárico. Es un ensayo sensible y reproducible. El "coating" del sustrato permite preparar con adelanto una microplaca y conservarla por lo menos dos semanas en cámara fría, sin precauciones particulares. Por el contrario, la técnica de emulsificación, tal como la publicada por Pencreac'h *et al.* (Anal Biochem. 2002; 303: 17-24), adolece de numerosos inconvenientes, a saber inestabilidad de las emulsiones, actividad lipolítica más baja, etc.

Con respecto a la publicación anterior (Pencreac'h *et al.*, Anal Biochem. 2002; 303: 17-24), la presente invención propone dos mejoras técnicas importantes:

- Alto caudal: adaptación del principio del método publicado (Pencreac'h *et al.*, Anal Biochem. 2002; 303: 17-24) en un sistema a alto caudal (microplaca de 96 pocillos).
- "Coating" de sustratos lipídicos en los pocillos de las placas de microtitulación con una duración de conservación considerablemente mayor.

Utilización de las placas de la invención para la realización de un procedimiento de cribado de inhibidores de enzimas lipolíticas

Las placas de microtitulación que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por una lipasa o una fosfolipasa A1 o A2 liberando ácido α -eleosteárico, obtenidas según el procedimiento de la invención, se utilizan para el cribado a alto caudal de inhibidores y para la medición de la inhibición de las lipasas o de las fosfolipasas A1 o A2.

Ejemplo de la tetrahidrolipstatina (Orlistat o THL): inhibidor potente de las lipasas digestivas

(Véanse los artículos siguientes: Digestive lipases inhibition: an in vitro study. Tiss A., Miled N., Verger R., Gargouri

Y., Abousalham A., 2004, Lipases and phospholipases in drug development from biochemistry to molecular pharmacology, Wiley VCH (Muller G. y Petry S., Eds), 155, 193; Covalent inactivation of lipases. Ransac S., Gargouri Y., Marguet F., Buono G., Beglinger C., Hildebrand P., Lengsfeld H., Hadvary P., Verger R., 1997, Methods in Enzymol., 286, 190-231).

5 Las placas de microtitulación, revestidas ("coating") del sustrato lipídico, se preparan tal como se ha descrito anteriormente. Se añade en los pocillos una disolución constituida por tampón Tris y por β -ciclodextrina (3 mg/ml). La densidad óptica a 270 nm se registra en función del tiempo durante 5 a 10 minutos (véanse las figuras 4A y 4B). Una disolución de lipasa pancreática humana (HPL), sola o pre-incubada con la THL (inhibidor), se inyecta en los
10 pocillos. La actividad enzimática se registra entonces en función del tiempo mediante la medición de la DO a 272 nm (método A; figura 4A). La pre-incubación de la HPL con la THL, con un exceso molar de 1 por 100 o de 1 por 50 durante 10 minutos, reduce la actividad lipásica inicial 75% o 40% respectivamente (véase la figura 4A).

15 El efecto de la THL sobre la actividad lipásica ha sido asimismo medido inyectando la THL durante la lipólisis (método B; figura 4B). La inyección de la THL (a la concentración final de 10 nM) reduce la actividad de la HPL aproximadamente 40%.

Conclusión

20 A la vista de los resultados presentados en las figuras 4A y 4B, se observa que la presente invención está perfectamente adaptada para la medición a alto caudal de la inhibición de las lipasas, y por lo tanto para el cribado de inhibidores de lipasas y de fosfolipasas A1 y A2.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de placas de microtitulación que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico, que puede ser hidrolizado por una lipasa o una fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- añadir a los pocillos de dichas placas una composición que comprende el sustrato lipídico en disolución en un disolvente apropiado susceptible de poder ser evaporado al vacío, siendo esta adición, llegado el caso, efectuada después del lavado de los pocillos de dichas placas con dicho disolvente,
- evaporar al vacío dicho disolvente hasta la formación de un revestimiento con dicho sustrato lipídico de 0,5 a 5 μm , y preferentemente de 1 μm de grosor en las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación.

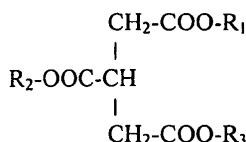
2. Placas de microtitulación que comprenden unos pocillos revestidos con un sustrato lipídico que puede ser hidroxilado por una lipasa o una fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico, obtenidas mediante el procedimiento según la reivindicación 1, siendo el revestimiento con dicho sustrato lipídico sobre las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación de 0,5 a 5 μm , y preferentemente de 1 μm de grosor.

3. Procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* de una actividad lipásica o fosfolipásica característica de una lipasa o fosfolipasa de origen natural o sintético en una muestra susceptible de contener esta lipasa o fosfolipasa, caracterizado porque comprende:

- añadir una disolución tampón constituida por Tris y por sales biliares (NaTDC) y, llegado el caso, por β -ciclodextrina, en los pocillos de placas de microtitulación obtenidas según la reivindicación 1,
- añadir la muestra mencionada anteriormente susceptible de contener dicha lipasa o fosfolipasa en disolución acuosa, en los pocillos de placas de microtitulación obtenidas según la reivindicación 1, revestidos con una capa de un sustrato lipídico que puede ser hidroxilado por dicha lipasa o fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico que se solubiliza en fase micelar en dicha disolución acuosa,
- detectar y/o medir la actividad lipásica o fosfolipásica mediante espectrofotometría en el espectro de absorción UV del ácido α -eleosteárico liberado durante la etapa anterior.

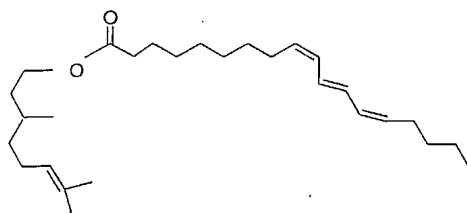
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el sustrato lipídico que puede ser hidrolizado por dicha lipasa o fosfolipasa liberando ácido α -eleosteárico se selecciona de entre:

- los triglicéridos purificados del aceite de tung de fórmula general



en la que R_1 y R_3 representan unos residuos de ácido graso idénticos o diferentes, que comprenden aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono, y preferentemente 18 átomos de carbono, y que presentan eventualmente una o varias insaturaciones y en la que R_2 representa el ácido α -eleosteárico.

- teniendo los di- y monoglicéridos, o unos ésteres de colesterol o unos fosfolípidos 1 ó 2 cadenas de α -eleostearato en posición adecuada según el tipo de regioselectividad de las lipasas o de las fosfolipasas buscadas,
- el α -eleostearato de citronelol de fórmula siguiente:



- o unos ésteres de ácido α -eleostearato con otros alcoholes o moléculas proquirales o quirales de interés

farmacéutico tal como el propanolol, el sotalol o el carvedilol, o con unas moléculas de interés industrial tal como el mentol.

5 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, de medición *in vitro* de la lipasemia plasmática en el ser humano o en el animal, caracterizado porque la muestra que contiene la lipasa es una muestra sanguínea extraída del ser humano o del animal.

6. Aplicación de un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, al diagnóstico *in vitro*:

10 - de afecciones pancreáticas tales como la pancreatitis aguda, la pancreatitis crónica, caracterizadas por un incremento del porcentaje plasmático de lipasa en el ser humano o en el animal, con respecto al porcentaje plasmático de esta lipasa en un individuo sano, o

15 - de la insuficiencia renal, los traumatismos del abdomen (isquemia, infarto mesentérico, perforación u oclusión intestinal).

20 7. Utilización de las placas según la reivindicación 2, para la realización de un procedimiento de detección y/o de medición *in vitro* de una actividad lipásica o fosfolipásica tal como el definido según una de las reivindicaciones 3 a 5, o para la realización de un procedimiento de cribado de inhibidores de enzimas lipolíticas.

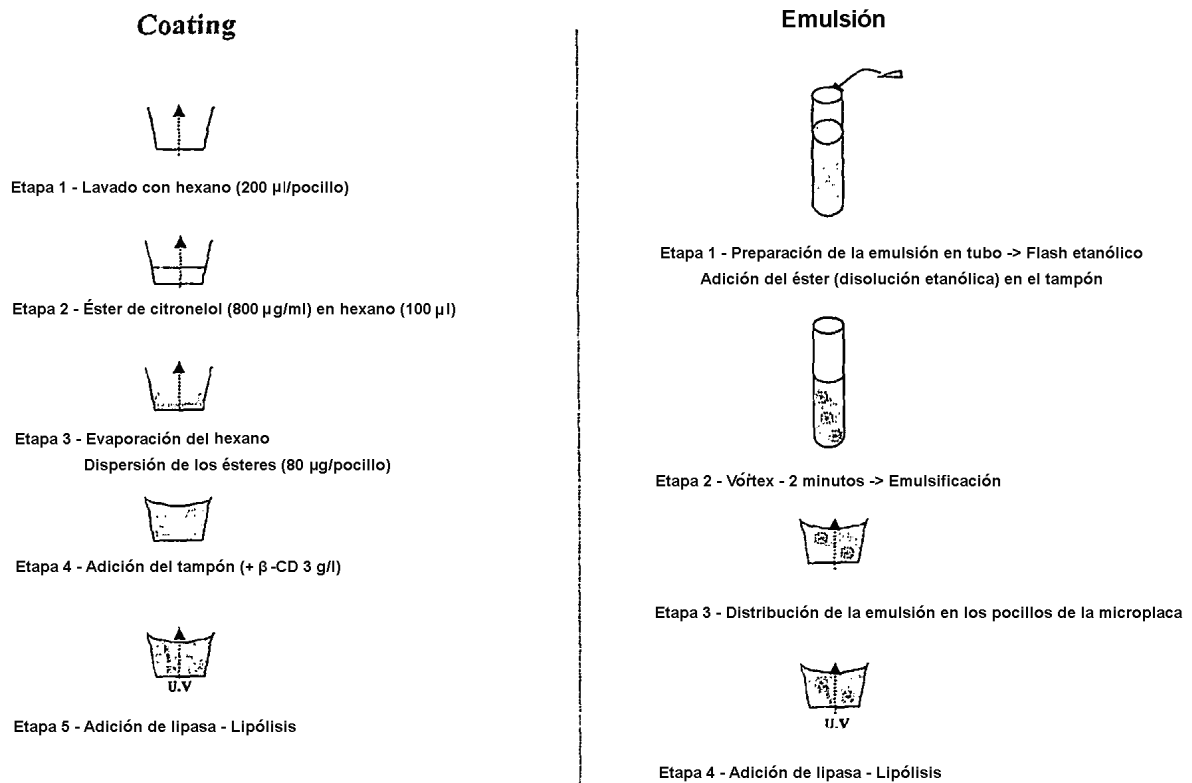


Figura 1

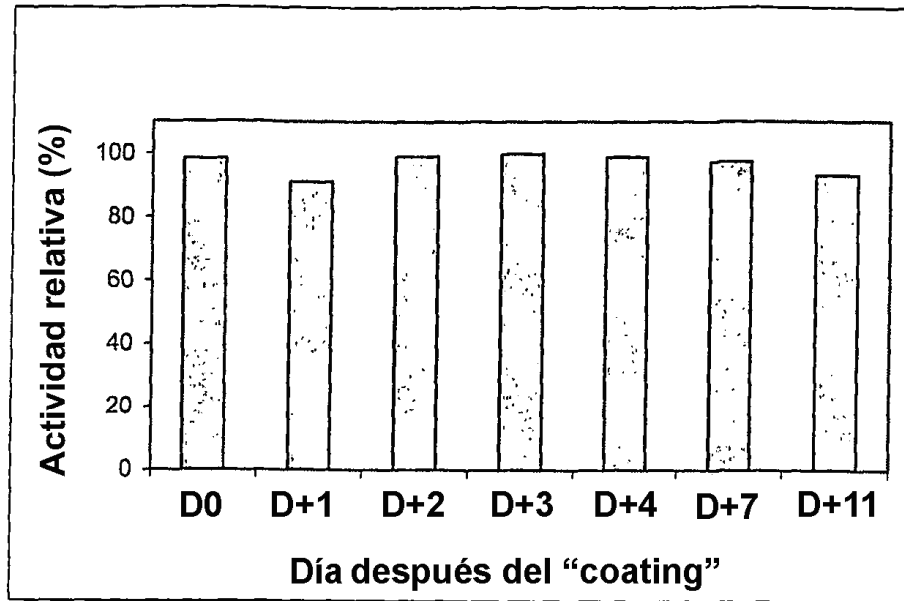


FIGURA 2a

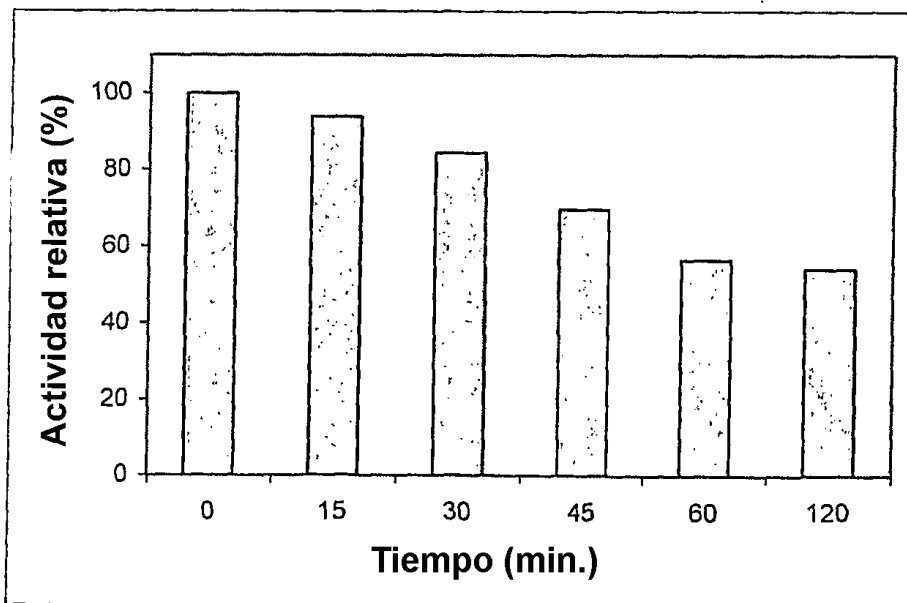


FIGURA 2b

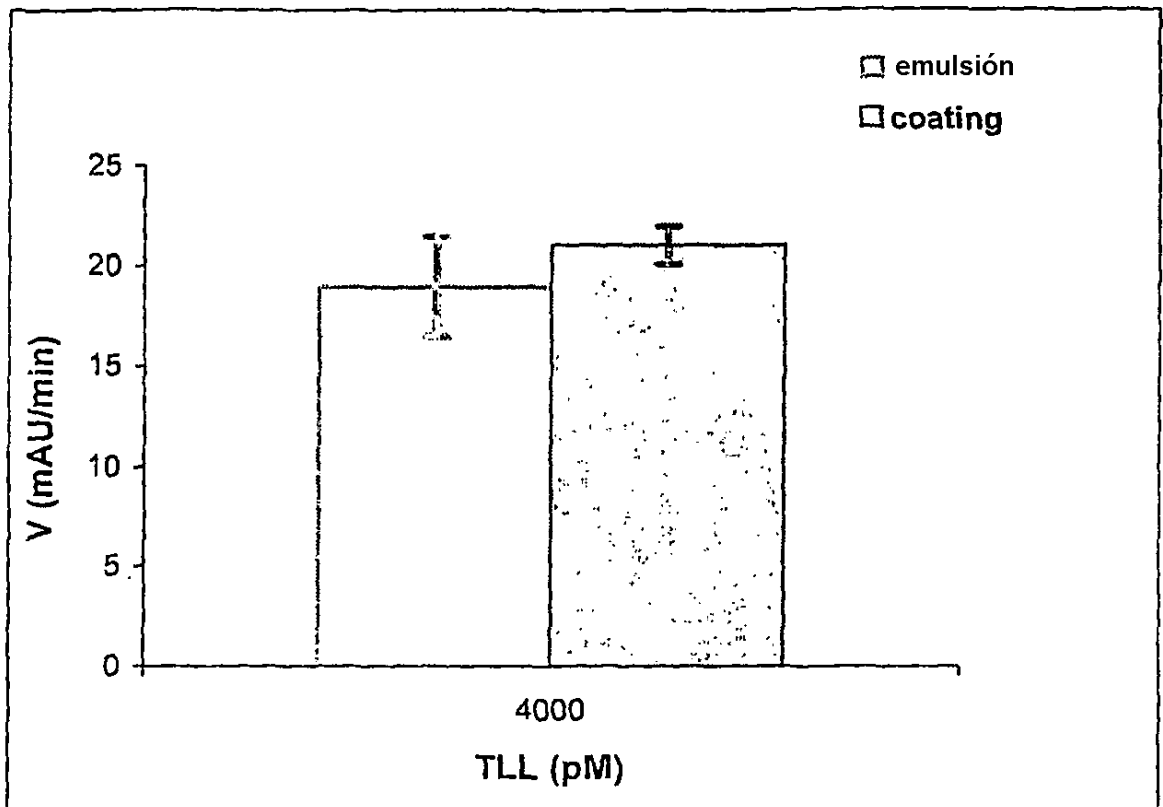


Figura 3

Figura 4A

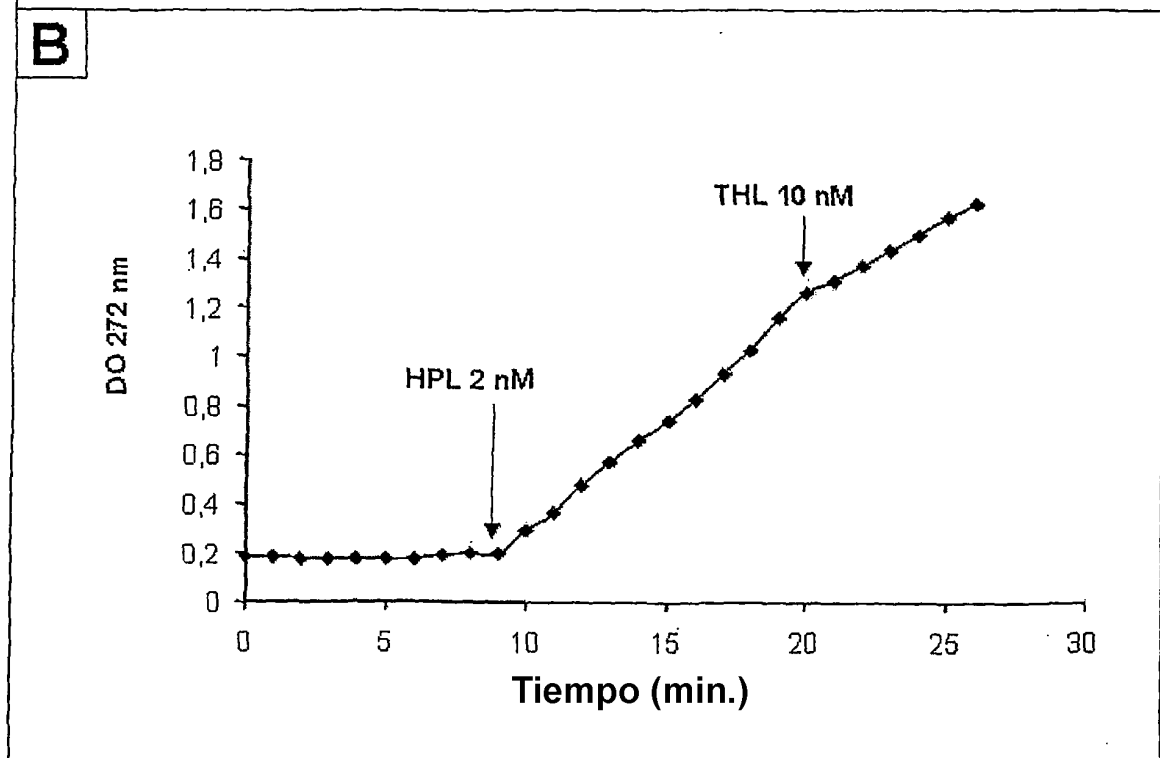
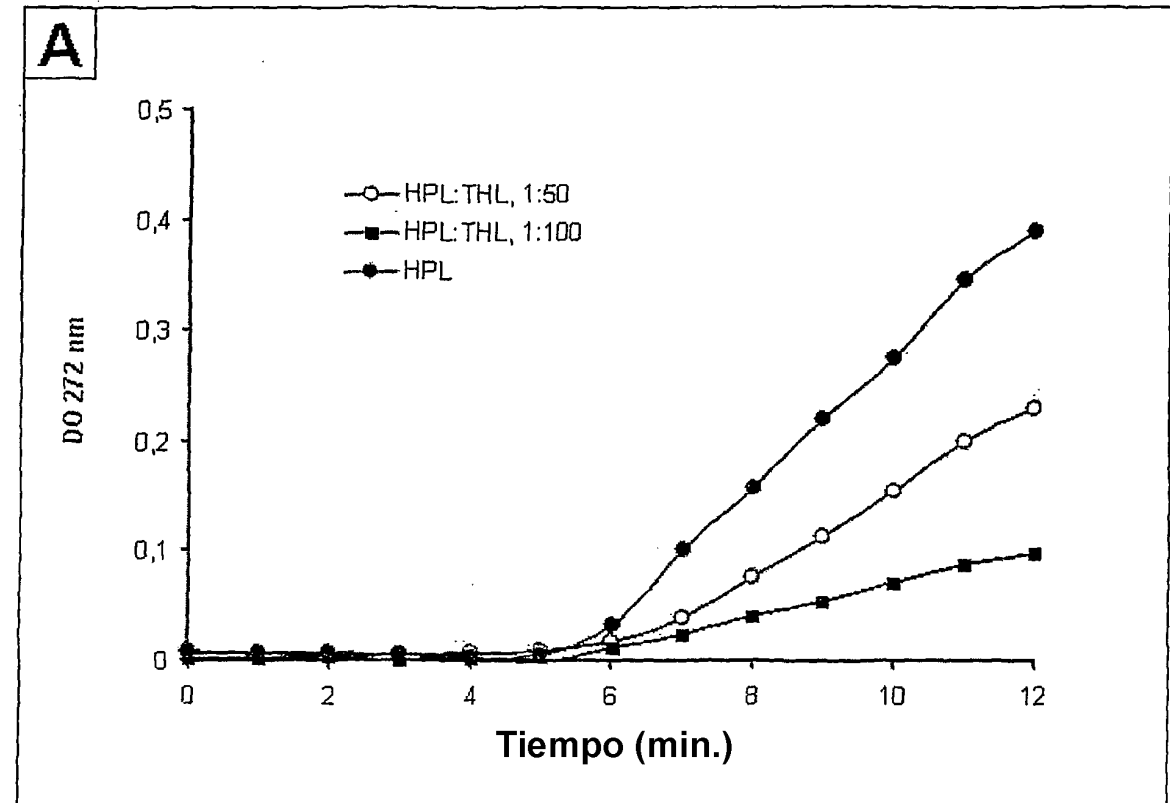


Figura 4B