

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 859**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05806617 .6**  
96 Fecha de presentación: **18.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1813680**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **COMPOSICIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPASA Y MÉTODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD.**

30 Prioridad:  
**19.11.2004 JP 2004335356**  
**13.12.2004 JP 2004359872**  
**27.05.2005 JP 2005155163**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.01.2012**

73 Titular/es:  
**Asahi Kasei Pharma Corporation**  
**1-105, Kanda Jinbocho Chiyoda-ku**  
**Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:  
**IMAMURA, Shigeyuki**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 859 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

Composiciones para la determinación de la actividad lipasa y método para determinar la actividad.

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una composición para determinar la actividad de la lipasa pancreática o de lipasas no pancreáticas (tales como lipasa hepática o lipasa de lipoproteínas), y a un método para determinar la actividad en el campo de los ensayos clínicos de laboratorio.

**Antecedentes de la técnica**

La lipasa pancreática en sangre es importante como marcador de diagnóstico de enfermedades pancreáticas, tales como la pancreatitis aguda, y se ha empleado en ensayos clínicos habituales.

10 Por otra parte, la lipasa hepática o la lipasa de lipoproteínas (denominadas colectivamente en lo sucesivo en la presente lipasas no pancreáticas) son enzimas importantes en el diagnóstico de enfermedades hepáticas o del metabolismo de lípidos de las lipoproteínas. Las lipasas no pancreáticas desempeñan un papel en el cuerpo vivo en forma de un conjugado con glicoproteínas ácidas del hígado o de diversos órganos/paredes vasculares. Las lipasas no pancreáticas aparecen en sangre por la inyección intravenosa de heparina o por el uso de la heparina durante una diálisis o similares, pero la actividad es extremadamente baja.

15 De manera convencional, para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática y/o para la determinación de la actividad de lipasas no pancreáticas en sangre, se ha empleado un triglicérido como sustrato. El triglicérido se ha empleado en una forma denominada emulsión, preparada emulsionando/dispersando el triglicérido mediante agitación vigorosa en un tampón con goma arábiga, poli(alcohol vinílico), etc. La determinación de la actividad lipasa empleando el sustrato se ha realizado cuantificando un ácido graso liberado por una reacción de lipasa mediante un alcalímetro. Se ha realizado un intento por determinar los niveles de ácidos grasos liberados a partir del sustrato de lipasa en una reacción de lipasa mediante un método enzimático, pero ha resultado imposible determinar la actividad lipasa de modo espectrofotométrico utilizando un sistema de enzimas acoplantes, debido a la intensa turbidez del sustrato de triglicéridos debido a la emulsión. Por otra parte, un sustrato en emulsión tiene la desventaja de poder provocar la separación de fases durante la conservación, y ha resultado difícil determinar la actividad lipasa con una buena reproducibilidad. Además, para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas se emplea en la práctica un triglicérido marcado con un compuesto radiactivo como sustrato, porque la actividad de las lipasas no pancreáticas es más baja en sangre que la de la lipasa pancreática, y se separan un ácido graso libre liberado por una reacción de lipasa y un sustrato de triglicéridos, seguido de la determinación de la radiactividad del ácido graso libre (documento que no es una patente (1)). Sin embargo, existen muchas restricciones a la hora de manipular un compuesto radiactivo, y el método no resulta adecuado para los ensayos clínicos habituales.

20 Para resolver estos problemas del método que emplea un sustrato de triglicéridos se han desarrollado métodos que emplean un diglicérido como sustrato (documentos de patente 1 y 2). En los documentos de patente, se emplea principalmente un 1,2-diglicérido como sustrato de las lipasas. Se sabe que el 1,2-diglicérido se transforma en un 1,3-diglicérido mediante una reacción de migración intramolecular de un enlace éster, y se ha utilizado para no provocar el cambio en la mayor medida posible.

25 El documento JP-A-03228699 describe una composición de reactivos para determinar la actividad lipasa mientras que se evita la influencia de la bilirrubina, teniendo dicha composición un pH de 8-9, y comprende (a) 0,3-1,0 mM de un 1,2-diglicérido del ácido láurico; (b) 0,05-0,2% en peso de un tensioactivo no iónico; (c) 0,4-2,5 U/ml de una monoglicérido lipasa; (d) 0,05-3 U/ml de una glicerol quinasa; (e) 15-150 U/ml de una ácido glicerofosfórico oxidasa; (f) 0,02-0,1% en peso de un compuesto fenólico o un derivado de anilina; (g) 0,01-0,1% en peso de 4-aminoantipirina; (h) 0,25-3 U/ml de una peroxidasa; y (i) 1-15 nmol/ml de un complejo de hierro.

30 Fossati et al., Clinical Chemistry, 38(2), 211-215 (1992) han descrito un ensayo colorimétrico cinético de la lipasa en suero que utiliza el kit de reactivos disponible en el mercado Sera-Pak® rk (Bayer Diagnostici SpA.), comprendiendo dicho kit una disolución 1 que contiene cantidades concretas de un tampón, 1,2-diglicérido, colipasa, 2-monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, peroxidasa, ascorbato oxidasa, ATP, iones de calcio, iones de magnesio, TOOS, ferrocianuro de potasio, ácido cólico, y tensioactivo de polioxitilén nonilfenil éter.

35 Las disoluciones conocidas de diglicéridos en un tensioactivo no iónico son inestables y no pueden conservarse durante largos periodos de tiempo. Por tanto, en la práctica, en un reactivo o en un kit que emplee un diglicérido como sustrato, el sustrato debe liofilizarse, y por tanto se requiere una operación de disolución antes del uso con lo que se complica su uso.

40 Por otra parte, tal como se describió anteriormente, resulta difícil determinar la actividad enzimática de las lipasas no pancreáticas en una muestra de sangre, así que en años recientes, en el campo de los ensayos clínicos de laboratorio se ha estado realizando un método para determinar el nivel de proteínas de la lipasa empleando un anticuerpo monoclonal mediante una técnica inmunológica (documento que no es una patente 2). Sin embargo, la

55

técnica inmunológica se emplea para cuantificar el nivel de proteínas de las lipasas y tiene la desventaja de que no determina la actividad enzimática que muestra la función lipasa. Bajo estas circunstancias, se desea desarrollar una técnica precisa, sensible y fácil para determinar la actividad de la lipasa pancreática o de las lipasas no pancreáticas.

[Documento de patente 1] JP 59-91898 A

5 [Documento de patente 2] JP 63-245672 A

[Documento que no es una patente 1] J. Clin. Invest., 1986, vol. 78, ejemplar 6, 1523-1528.

[Documento que no es una patente 2] Japanese Journal of Occupational Medicine and Traumatology, vol. 52/Clinical Chemistry, vol. 33, nº 3, 2004, p. 220.

### Descripción de la invención

10 Problemas resueltos por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la determinación de la actividad lipasa que está en forma líquida y tiene una excelente estabilidad de conservación a largo plazo. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un reactivo fácil de usar para la determinación de la actividad lipasa, un kit para la determinación de la actividad lipasa, y un método para determinar la actividad lipasa. De modo específico, un objeto es proporcionar una composición excelente comparada con una composición convencional para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática en el campo de los ensayos clínicos de laboratorio, y un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando la composición. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas, con alta sensibilidad y especificidad por las lipasas no pancreáticas, en una muestra, en particular una muestra de sangre, y un método para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que emplea la composición con facilidad y alta precisión.

15  
20

Medios para resolver los problemas

25 Para determinar la actividad de la lipasa pancreática de manera estable, en primer lugar el inventor de la presente invención concentró su atención sobre la estabilidad del 1,2-diglicérido que se emplea en este caso como sustrato, y después, descubrió que la actividad lipasa cambia debido a una hidrólisis gradual del 1,2-diglicérido en un reactivo durante un largo periodo de conservación, y descubrió que el cambio dificulta la determinación de la actividad de la lipasa pancreática de una manera estable y precisa. Para resolver estos problemas, el inventor realizó estudios profundos para descubrir un diglicérido con excelente estabilidad y, como resultado, descubrió que puede prepararse un reactivo para determinar la actividad lipasa de forma estable empleando diglicéridos que incluyan una gran cantidad de 1,3-diglicérido convertido tratando el 1-2,diglicérido en un tampón alcalino de baja concentración.

30

Por otra parte, el inventor de la presente invención descubrió que el diglicérido es útil como sustrato de lipasas no pancreáticas, y ha establecido un nuevo método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: preparar un sustrato de lipasa para su uso para la determinación de una reacción de lipasas no pancreáticas en una disolución transparente; y determinar un producto de la reacción de las lipasas mediante un método enzimático, descubriendo con ello un método de determinación muy sensible y fácil. Además, el inventor descubrió una composición para una reacción de lipasas no pancreáticas y ha desarrollado un nuevo método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas que tiene una excelente especificidad y en absoluto se ve afectado por la actividad de la lipasa pancreática, incluso en una muestra que contenga un componente que afecte a la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas, por ejemplo, una muestra que contenga un componente con alta actividad de lipasa pancreática.

35

40

Para lograr los anteriores objetos, los inventores de la presente invención realizaron profundos estudios que se centraron en mejorar la estabilidad de conservación a largo plazo de un diglicérido en una disolución acuosa y, como resultado, el inventor descubrió que la estabilidad de conservación a largo plazo mejora mediante la coexistencia con un tampón de baja concentración, completando con ello la presente invención.

45 Por tanto, la presente invención incluye lo siguiente:

[A-1] una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa, que se caracteriza porque incluye un diglicérido, un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, y un tensioactivo no iónico;

[A-2] una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] anterior, en la que los diglicéridos son una mezcla de 1,3-diglicéridos y 1,2-diglicéridos;

50 [A-3] una composición para la determinación de la actividad lipasa, que se caracteriza porque comprende la disolución de diglicéridos descrita en [A-1] o [A-2] y una enzima o enzimas que convierten un monoglicérido liberado de los diglicéridos descritos en [A-1] o [A-2] anteriores, mediante una reacción de lipasa, en glicerol-3-fosfato a través del glicerol libre;

- [A-4] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores;
- 5 [A-5] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores;
- 10 [A-6] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores;
- 15 [A-7] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de [A-4] a [A-6] anteriores, en la que la concentración de un tensioactivo no iónico es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática, y provoca la expresión de la actividad lipasa de las lipasas no pancreáticas, que se corresponde con una proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido de 2,5 veces molar o mayor;
- 20 [A-8] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de [A-4] a [A-7] anteriores, en la que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 está en forma líquida;
- [A-9] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal;
- 25 [A-10] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según [A-1] o [A-2] anteriores, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ATP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal;
- 30 [A-11] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal;
- 35 [A-12] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [A-9] a [A-11] anteriores, en la que la concentración de un tensioactivo no iónico es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de las lipasas no pancreáticas, y provoca la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática, que se corresponde con una proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido en el intervalo de 1,5 a 2,5 veces molar;
- 40 [A-13] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [A-9] a [A-12] anteriores, en la que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 está en forma líquida;
- [A-14] un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en [A-4] anterior, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; realizar una reacción de coloración dejando actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de peróxido de hidrógeno; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540 a 700 nm;
- 45 [A-15] un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en [A-5] anterior, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasa dependiente de ADP en presencia de glucosa; dejar actuar a la
- 50
- 55

glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia del NAD reducido o NADP reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;

- 5 [A-16] un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en [A-6] anterior, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;
- 10 [A-17] un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de [A-14] a [A-16] anteriores, en el que la concentración de un tensioactivo no iónico en una composición para la determinación de la actividad lipasa es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática, y provoca la expresión de la actividad lipasa de las lipasas no pancreáticas, que se corresponde con una proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido de 2,5 veces molar o mayor;
- 15 [A-18] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [A-9] anterior, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; realizar una  
20 reacción de coloración dejando actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de peróxido de hidrógeno; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540 a 700 nm;
- [A-19] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [A-10] anterior, que incluye: convertir un  
25 monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasa dependiente de ADP en presencia de glucosa; dejar actuar a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia del NAD reducido o NADP reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;
- 30 [A-20] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [A-11] anterior, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato  
35 deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;
- [A-21] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [A-18] a [A-20] anteriores, en el que la concentración de un tensioactivo no iónico en una composición para la determinación de la actividad lipasa es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de las lipasas no pancreáticas, y provoca la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática, que se corresponde con una proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido en el intervalo de 1,5 a 2,5 veces molar;
- 40 [A-22] un método para determinar la actividad lipasa según se describe en cualquiera de [A-14] a [A-21] anteriores, en el que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 en una composición para la determinación de la actividad lipasa está en forma líquida;
- 45 [B-1] una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa, que se caracteriza porque incluye un diglicérido, un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, y un tensioactivo no iónico;
- [B-2] una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] anterior, que se caracteriza porque contiene un diglicérido que se ha sometido a un tratamiento alcalino en presencia de un tensioactivo no iónico;
- 50 [B-3] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores;
- 55 [B-4] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y

- (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores;
- 5 [B-5] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores;
- 10 [B-6] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, peroxidasa, y una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM;
- 15 [B-7] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM;
- 20 [B-8] una composición para la determinación de la actividad lipasa que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, y una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-1] o [B-2] anteriores; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM;
- 25 [B-9] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de [B-3] a [B-8] anteriores, en la que la concentración de tensioactivo no iónico es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática;
- [B-10] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [B-3] a [B-8] anteriores, en la que la concentración de tensioactivo no iónico es tal que provoca la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática;
- 30 [B-11] un método para determinar la actividad lipasa, que incluye: poner en contacto una composición para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-3] o [B-6] anteriores, con una muestra; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda visible;
- 35 [B-12] un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas, que incluye: poner en contacto una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en [B-9] anterior, con una muestra; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda visible, o la tasa de aumento o la tasa de disminución de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;
- [B-13] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática, que incluye: poner en contacto una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [B-10] anterior, con una muestra; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda visible, o la tasa de aumento o la tasa de disminución de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm;
- 40 [B-14] una composición para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-3] o [B-6] anteriores, que se caracteriza porque contiene además una enzima que convierte un monoglicérido liberado, mediante una reacción de lipasa, de un glicérido, en glicerol-3-fosfato a través de glicerol libre;
- [B-15] una composición para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-14] anterior, que se caracteriza porque contiene además un reactivo de Trinder, y un acoplante;
- 45 [B-16] una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de [B-14] o [B-15] anteriores, en la que la concentración de tensioactivo no iónico es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática;
- 50 [B-17] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [B-14] o [B-15] anteriores, en la que la concentración de tensioactivo no iónico es tal que provoca la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática;
- [B-18] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [B-17] anterior, que se caracteriza además porque contiene colipasa, y un ácido biliar o su sal;
- [B-19] un método para determinar la actividad lipasa, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un

- 5 diglicérido en una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [B-3] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática, utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; y determinar la tasa de aumento del peróxido de hidrógeno;
- 10 [B-20] un método para determinar la actividad lipasa, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido en una composición para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-5] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática, utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 300 a 400 nm;
- 15 [B-21] un método para determinar la actividad lipasa, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido en una composición para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [B-15] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática, utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; dejar actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de peróxido de hidrógeno para producir una reacción de coloración; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540-700 nm;
- 20 [B-22] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [B-19] a [B-21] anteriores, en el que la concentración del tensioactivo no iónico es tal que no permite la expresión de la actividad lipasa de la lipasa pancreática;
- 25 [B-23] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [B-19] a [B-21] anteriores, en el que la concentración del tensioactivo no iónico es tal que provoca la expresión de la actividad de la lipasa pancreática;
- 30 [C-1] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática, que se caracteriza porque contiene un diglicérido que se ha sometido a un tratamiento alcalino en presencia de un tensioactivo no iónico, un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, y un tensioactivo no iónico;
- [C-2] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-1] anterior, que se caracteriza porque contiene además una enzima que convierte un monoglicérido, producido a partir de un diglicérido mediante una reacción de lipasa pancreática, en glicerol-3-fosfato a través de glicerol libre;
- 35 [C-3] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-2] anterior, que se caracteriza porque contiene monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa como enzimas; y contiene además ATP, fosfoenolpiruvato, y NAD reducido;
- [C-4] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-2] anterior, que se caracteriza porque contiene monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, y glicerol-3-fosfato oxidasa como enzimas; y contiene además ATP;
- 40 [C-5] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-4] anterior, que se caracteriza porque contiene además peroxidasa, un reactivo de Trinder, y un acoplante;
- [C-6] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [C-1] a [C-5] anteriores, que se caracteriza porque contiene además un tampón;
- [C-7] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [C-1] a [C-6] anteriores, que se caracteriza porque contiene además colipasa, y un ácido biliar o su sal;
- 45 [C-8] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de [C-1] a [C-7] anteriores, que se caracteriza porque está dividida al menos en dos reactivos;
- [C-9] una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-8] anterior, que se caracteriza porque se añade glicerol oxidasa a un reactivo, y se añade cualquiera o ambos de glicerol quinasa y adenosina trifosfato a cualquiera de los otros reactivos;
- 50 [C-10] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido en una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-3] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido

fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 300 a 400 nm;

5 [C-11] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido en una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-4] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; y determinar la tasa de aumento del peróxido de hidrógeno;

10 [C-12] un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática, que incluye: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido en una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en [C-5] anterior, mediante una reacción de la lipasa pancreática utilizando el diglicérido como sustrato, en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; dejar actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de peróxido de hidrógeno para producir una reacción de coloración; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540-700 nm;

Efecto de la invención

20 Puede proporcionarse un reactivo para la determinación de la actividad lipasa y una composición para la determinación de la actividad lipasa que sean fáciles de usar y que tengan una reproducibilidad y una precisión excelentes, y puede proporcionarse una disolución acuosa de un glicérido que tenga una excelente estabilidad de conservación a largo plazo. Por otra parte, la actividad de la lipasa pancreática puede determinarse con una alta reproducibilidad y precisión. Además, puede determinarse la actividad de las lipasas no pancreáticas en una muestra, en particular una muestra de sangre, de manera sensible y fácil con una alta precisión y especificidad.

#### Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: Resultados de una dilución lineal de la lipasa pancreática basados en el ejemplo 1-5 de la presente invención.

Figura 2: Resultados de una dilución lineal de lipasas no pancreáticas basados en el ejemplo 1-6 de la presente invención.

30 Figura 3: Resultados de una dilución lineal de lipasas no pancreáticas basados en el ejemplo 2-5 de la presente invención.

Figura 4: Resultados que muestran los efectos de un tensioactivo no iónico sobre la lipasa pancreática y sobre lipasas no pancreáticas basados en el ejemplo 2-6 de la presente invención. En esta gráfica, los símbolos "●" y "■" significan lipasas no pancreáticas y lipasa pancreática, respectivamente.

Figura 5: Desarrollo en el tiempo de una reacción de lipasa pancreática basada en la fórmula de reacción 1.

35 Figura 6: Resultados de una dilución lineal de la lipasa pancreática basados en la fórmula de reacción 1.

Figura 7: Resultados de una dilución lineal de la lipasa pancreática basados en la fórmula de reacción 3.

#### Mejor modo de realizar la invención

A continuación se describirá la presente invención de modo específico.

40 Una disolución acuosa de diglicéridos que tenga una excelente estabilidad de conservación a largo plazo, un método para estabilizar la conservación a largo plazo de una disolución acuosa de diglicéridos, un método para conservar una disolución acuosa de diglicéridos de manera estable durante la distribución de la presente invención son útiles para diversos productos que contienen la disolución, tales como una composición para la determinación de la actividad lipasa que tenga una excelente estabilidad de conservación a largo plazo y un reactivo para la determinación de la actividad lipasa. Además, son útiles para un método para estabilizar la conservación a largo plazo de una composición para la determinación de la actividad lipasa y un reactivo para la determinación de la actividad lipasa, y para un método para estabilizar la conservación a largo plazo de una composición para la determinación de la actividad lipasa y un reactivo para la determinación de la actividad lipasa durante la distribución y/o la conservación.

50 Una composición para la determinación de la actividad lipasa, un reactivo para la determinación de la actividad lipasa, y un método para determinar la actividad lipasa de la presente invención son útiles para la determinación precisa y fácil de la actividad lipasa en una muestra, en particular para la determinación precisa y fácil de la actividad de la lipasa pancreática o de lipasas no pancreáticas en una muestra, en el campo de los ensayos clínicos de



laboratorio.

Una composición para la determinación de la actividad lipasa de la presente invención es una composición fácil de usar para la determinación de la actividad lipasa que se caracteriza porque contiene una disolución de diglicéridos que tiene una estabilidad de conservación a largo plazo notablemente mejorada durante la distribución y/o la conservación, etc., por la coexistencia con un tampón de baja concentración para mejorar la estabilidad a largo plazo de un sustrato de diglicéridos disuelto en un tensioactivo no iónico. Además, la composición se caracteriza porque un tampón de baja concentración coexiste con un sustrato de diglicéridos que se ha sometido a un tratamiento alcalino en presencia de un tensioactivo no iónico. Además, la composición se caracteriza porque la concentración del tensioactivo no iónico se ajusta a una concentración apropiada dependiendo del tipo de lipasa que se va a determinar (la lipasa pancreática o las lipasas no pancreáticas).

Un método para determinar la actividad lipasa de la presente invención se caracteriza porque se detecta de modo enzimático un monoglicérido liberado por la acción de la lipasa pancreática o de las lipasas no pancreáticas sobre el sustrato.

Un sustrato de lipasa que se puede utilizar en la presente invención puede obtenerse preparando previamente un fosfolípido, tal como 1,2-dioleoilglicerilcolina, 1-palmitoil-2-oleilglicerilcolina, lecitina purificada derivada de yema de huevo, o lecitina purificada derivada de soja; y dejar actuar a la fosfolipasa C sobre el fosfolípido, pero sus ejemplos preferidos incluyen un 1,2-diglicérido producido por la reacción de la fosfolipasa C con un fosfolípido, tal como lecitina. Por otra parte, los diglicéridos (una mezcla de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos), en los que parte de los 1,2-diglicéridos se ha convertido en 1,3-diglicéridos mediante un tratamiento alcalino en presencia de un tensioactivo no iónico, pueden utilizarse como sustratos de una reacción de lipasa de la presente invención. Desde el punto de vista de producir una actividad lipasa más estable, la mezcla de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos es preferible como sustrato de lipasa y, en otro aspecto, es preferible una mezcla en que los 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos están aproximadamente en estado de equilibrio. La mezcla de diglicéridos puede producirse mediante un tratamiento alcalino utilizando un tampón que contenga un tensioactivo no iónico mientras que se cambia la temperatura y el tiempo de calentamiento. La temperatura del tratamiento alcalino y el tiempo del tratamiento alcalino pueden ajustarse de modo apropiado basándose en la proporción medida del 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido. De manera específica, la proporción de 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido preferiblemente está en el intervalo de 2:1 a 2:3, o preferiblemente está en el intervalo de 1:1 a 2:3. Por otra parte, en otro aspecto, la proporción está preferiblemente en el intervalo de 2:1 a 1:1. Además, la proporción de 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido preferiblemente está en el intervalo de 70:30 a 30:70, o preferiblemente está en el intervalo de 50:50 a 30:70. Por otra parte, en otro aspecto, la proporción de 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido preferiblemente está en el intervalo de 70:30 a 50:50. Además, en otro aspecto, la proporción de 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido preferiblemente está en el intervalo de 50:50 a 35:65. Los ejemplos de una condición para lograr un estado de equilibrio de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos incluyen: en el caso de pH 8 a pH 9, un método de calentamiento a 37 °C durante aproximadamente 5 a 8 horas, a 30 °C durante aproximadamente 10 a 20 horas; y en el caso de pH 9 a pH 11, un método de calentamiento a 37 °C durante aproximadamente 1 hora. En el caso de pH 9 a pH 11, es más preferible un método de calentamiento a 37 °C de aproximadamente 1 hora. Además, en otro aspecto, en el caso de pH 8 a pH 9, es más preferible un método de calentamiento a 37 °C durante aproximadamente 5 a 8 horas, o a 30 °C durante aproximadamente 10 a 20 horas. En el caso de pH 8 a pH 9, el límite superior de pH es preferiblemente menor que pH 9,0, más preferiblemente pH 8,7 o menor, aún más preferiblemente pH 8,5 o menor, mientras que el límite inferior de pH es preferiblemente pH 8,0 o mayor, más preferiblemente 8,1 o mayor, aún más preferiblemente pH 8,3 o mayor, y preferiblemente en particular pH 8,4 o mayor. Por otra parte, en el caso de pH 9 a pH 11, el límite superior de pH es preferiblemente pH 11,0 o menor, más preferiblemente pH 10,7 o menor, aún más preferiblemente pH 10,5, preferiblemente en particular pH 10,3 o menor, y lo más preferiblemente pH 10,25 o menor, mientras que el límite inferior de pH es preferiblemente pH 9,0 o mayor, preferiblemente en particular pH 9,7 o mayor, y lo más preferiblemente pH 9,8 o mayor. La disolución de sustrato preparada de esta forma se deja preferiblemente en una conservación en frío durante una conservación a largo plazo. El sustrato se utiliza en una disolución de reacción de lipasa descrita a continuación.

Por otra parte, según la presente invención, se proporciona un sustrato líquido para la determinación de la actividad lipasa que contiene diglicéridos, en el que la distribución de la concentración de los 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos está fundamentalmente en un estado en equilibrio en presencia de un tampón de baja concentración y un tensioactivo no iónico. La distribución de la concentración en un estado en equilibrio no está particularmente limitada, con la condición de que sea una proporción de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos en que la proporción de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos no cambie bajo ciertas condiciones de temperatura, y los ejemplos específicos incluyen un estado en que una mezcla de diglicéridos se somete al tratamiento alcalino descrito anteriormente, y después se conserva de 4 °C a 8 °C. En el caso en que la mezcla se conserva de 4 °C a 8 °C, la proporción de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos no cambia. En el caso en que la mezcla se deja en una conservación en frío, puede utilizarse a un pH en el intervalo de 5 a 9,5, y el límite superior es preferiblemente pH 9,5 o menor, más preferiblemente pH 9,0 o menor, aún más preferiblemente pH 8,5 o menor, preferiblemente en particular pH 8,3 o menor, y lo más preferiblemente pH 8,1 o menor, mientras que el límite superior es preferiblemente pH 5,0 o mayor, más preferiblemente pH 6,0 o mayor, aún más preferiblemente pH 7,0 o mayor, preferiblemente en particular pH 7,5 o mayor, y lo más preferiblemente pH 7,8 o mayor. En otro aspecto, el pH durante la conservación en frío es preferiblemente de aproximadamente pH 8.

Debe advertirse que, como método para determinar la proporción de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos, se realizó un análisis mediante el método de barrido Yatoro (la detección se realiza mediante FID; método de barrido de ionización de llama) después del revelado mediante una cromatografía en capa fina (disolvente de revelado, 95% de cloroformo:5% de acetona).

5 La concentración óptima del sustrato para una reacción de lipasa está en el intervalo de 0,25 mM a 2 mM, y resulta particularmente preferible aproximadamente 0,5 mM en vista de la estabilidad y la especificidad por una lipasa. Con respecto a la concentración de material bruto de diglicérido que se va a utilizar en la presente invención, el límite inferior es preferiblemente 0,25 mM o mayor, más preferiblemente 0,30 mM o mayor, preferiblemente en particular 0,32 mM o mayor, y lo más preferiblemente 0,34 mM o mayor. Por otra parte, el límite superior es preferiblemente 0,5 mM o menor, más preferiblemente 0,4 mM o menor, preferiblemente en particular 0,38 mM o menor, y lo más preferiblemente 0,36 mM o menor. En particular, resulta preferible aproximadamente 0,35 mM en vista de la estabilidad y la especificidad por la lipasa pancreática. Con respecto a la concentración de diglicérido que se va a utilizar en la presente invención, puede seleccionarse una concentración óptima para una reacción de lipasas no pancreáticas, y el límite inferior es preferiblemente 0,25 mM o mayor, más preferiblemente 0,30 mM o mayor, preferiblemente en particular 0,32 mM o mayor, y lo más preferiblemente 0,5 mM o mayor. Por otra parte, el límite superior es preferiblemente 2 mM o menor, más preferiblemente 1 mM o menor, preferiblemente en particular 0,8 mM o menor, y lo más preferiblemente 0,6 mM o menor. En particular, resulta preferible aproximadamente 0,5 mM en vista de la estabilidad y la especificidad por la lipasa pancreática. En general, un sustrato que tenga una mayor afinidad por una enzima es preferible como sustrato para la determinación de la actividad enzimática, porque puede lograrse un cierto nivel de actividad enzimática incluso si el sustrato disminuye durante la conservación. El indicador de la afinidad es un valor de  $K_m$ . El valor de  $K_m$  de la lipasa pancreática por el 1,2-diglicérido es  $1,1 \times 10^{-3}$  M, mientras que el valor de  $K_m$  de un sustrato que contiene 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos a una proporción de 1:1 es  $2,3 \times 10^{-3}$  M, de forma que un sustrato que contenga 1,3-diglicéridos es más preferible. Además, un sustrato que contiene una gran cantidad de 1,3-diglicéridos es más preferible.

25 Un ácido graso como resto ácido graso superior en un diglicérido puede ser un ácido graso superior que tenga 12 o más átomos de carbono, y los ejemplos incluyen ácidos grasos superiores saturados, tales como ácido laurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido araquídico; y ácidos grasos superiores insaturados, tales como ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, y ácido araquidónico. Estos ácidos grasos superiores pueden utilizarse de forma individual o en combinación de dos diferentes, y resulta más preferible un diglicérido que contenga un ácido o ácidos grasos superiores insaturados porque una disolución del diglicérido preparada como sustrato tiene una elevada transparencia. Los ejemplos particularmente preferibles del diglicérido incluyen 1,2-dioleilglicerol y 1-palmitoil-2-oleilglicerol. Estos diglicéridos pueden prepararse previamente preparando un fosfolípido, tal como 1,2-dioleoilglicerolcolina, 1-palmitoil-2-oleilglicerilcolina, lecitina purificada derivada de yema de huevo, o lecitina purificada derivada de soja; y dejando actuar a la fosfolipasa C sobre el fosfolípido.

35 En la presente invención, el tensioactivo no iónico que se va a utilizar para producir una composición líquida para la determinación de la actividad lipasa que tenga una excelente estabilidad a largo plazo puede seleccionarse de un polioxietilén (POE) alcohol superior éter, un etoxilato de alcohol secundario de POE, un POE alquilfenil éter, un éster de ácido graso de POE, un éster de ácido graso de sorbitán de POE, etc., y en términos de solubilidad y estabilidad resulta preferible un tensioactivo no iónico de POE alquilfenil éter. Los ejemplos del tensioactivo no iónico de POE alquilfenil éter incluyen el POE nonilfenil éter.

45 En el caso de la lipasa pancreática, la concentración de tensioactivo no iónico utilizada puede estar en el intervalo en el que se expresa la actividad de la lipasa pancreática a un nivel máximo y no se inhibe, es decir, en el intervalo de proporción molar en 1,5 a 2,5 veces con respecto al material bruto de diglicérido, y resulta particularmente preferible una proporción molar en 2 veces. En el caso de las lipasas no pancreáticas, si los componentes que afectan a la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas están ausentes en una muestra, la concentración puede estar, en general en uno, y de modo específico debe ser una proporción molar en 1,5 veces o más con respecto al diglicérido. En el caso en que la lipasa pancreática esté presente en una muestra como componente que afecta a la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas, la concentración preferiblemente se ajusta a una concentración en la que la actividad lipasa de la lipasa pancreática no se exprese, y una reacción de lipasa de las lipasas no pancreáticas no se inhiba. Para ajustar la concentración, la proporción molar del tensioactivo no iónico al diglicérido debe ajustarse a una proporción distinta de aproximadamente 1,5 a 2 molar, y preferiblemente es 2,5 veces molar o mayor, más preferiblemente 3 veces molar o mayor, aún más preferiblemente 4 veces molar o mayor, y preferiblemente en particular 5 veces molar o mayor. Desde el punto de vista de las operaciones reales, un límite inferior específico es preferiblemente 0,08% (% en peso) o mayor, más preferiblemente 0,10% o mayor, aún más preferiblemente 0,15% o mayor, y preferiblemente en particular 0,20% o mayor. Por otra parte, desde el punto de vista de las operaciones reales, un límite superior específico es preferiblemente 2% (% en peso) o menor, más preferiblemente 1% o menor, aún más preferiblemente 0,5% o menor, y preferiblemente en particular 0,3% o menor. Por ejemplo, el intervalo de concentración es preferiblemente del 0,15% al 2%, preferiblemente en particular del 0,2% al 0,3%.

60 Fundamentalmente, centrándose en la estructura de micelas hidrosolubles que se forma dependiendo de la proporción molar del diglicérido y el tensioactivo no iónico, el tensioactivo no iónico debe utilizarse al menos en una

cantidad necesaria para formar una estructura de micelas diferente de la formada en el caso de diglicérido:tensioactivo no iónico = aproximadamente 1:2. Por otra parte, el tensioactivo no iónico y el diglicérido pueden utilizarse en una proporción molar en el intervalo de una proporción molar en 10 a 30 veces, en la que la actividad de la lipasa pancreática no se expresa y la actividad de las lipasas no pancreáticas sí se expresa, y resulta particularmente preferible utilizar una proporción molar en 15 a 20 veces.

En la presente invención, los ejemplos de un tampón que puede utilizarse para lograr una estabilidad a largo plazo de un diglicérido disuelto en un tensioactivo incluyen un tampón de Good, tal como Tris-HCl, TES, HEPES, TAPSO, POPSO, tricina, o bicina; y un tampón glicina-NaOH. De éstos, desde el punto de vista de un blanco reactivo bajo, son más preferibles la tricina y la bicina, y la bicina resulta particularmente preferible. La concentración del tampón utilizada debe ser aproximadamente de un equimolar a 2 veces molar con respecto a la concentración de diglicérido.

La estabilidad a largo plazo de un diglicérido disuelto en un tensioactivo depende de la concentración del tampón coexistente, de forma que es extremadamente importante seleccionar la concentración del tampón. En el caso en que la concentración del tampón que se va a añadir a un diglicérido disuelto en un tensioactivo no iónico sea una concentración alta, por ejemplo 10 mM o mayor, el diglicérido será inestable a temperatura ambiente y se hidroliza incluso si se deja en conservación en frío. Para mantener la estabilidad de conservación a largo plazo de un diglicérido, la concentración del tampón se emplea preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 9 mM. El intervalo es más preferiblemente de 2 a 7 mM, y preferiblemente en particular de 3 a 5 mM. Por tanto, si es necesario, otras medidas, tales como la división de un reactivo, resultan muy preferibles para una composición para la determinación de lipasas, en vista de la estabilidad a largo plazo de una disolución que contenga un diglicérido y un tensioactivo, y el tipo de lipasa que se va a determinar, etc.

Una composición para la determinación de la actividad lipasa de la presente invención puede tener los siguientes seis modos.

(A) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según se describe en [A-1] o [A-2] anteriores.

Tal como se describió anteriormente, un sustrato de lipasa, es decir, un diglicérido, se emplea preferiblemente en un tampón de baja concentración, pero la concentración del otro tampón que no contiene sustrato puede seleccionarse libremente. Un tampón de alta concentración es fundamental para conseguir la reproducibilidad de una reacción de lipasa. El límite inferior de la concentración de tampón utilizada es preferiblemente 50 mM o mayor, más preferiblemente 100 mM o mayor, aún más preferiblemente 150 mM o mayor, y preferiblemente en particular 180 mM o mayor. Por otra parte, el límite inferior es preferiblemente 500 mM o menor, más preferiblemente 300 mM o menor, aún más preferiblemente 250 mM o menor, preferiblemente en particular 220 mM o menor, y lo más preferiblemente es aproximadamente 200 mM.

En el caso de la lipasa pancreática, el pH óptimo de un tampón es de 7,8 a 8,1, mientras que en el caso de las lipasas no pancreáticas, el pH óptimo de un tampón es de 7,7 a 8,3. Puede utilizarse un tampón que tenga una capacidad de tamponamiento del pH en el intervalo de pH, tal como un tampón de Good, que incluye Tris-HCl, TES, HEPES, TAPSO, POPSO, tricina, y bicina. De éstos, desde el punto de vista de un blanco reactivo bajo, son más preferibles la tricina y la bicina, y la bicina resulta particularmente preferible.

(B) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, peroxidasa, y la disolución de diglicéridos descrita anteriormente para la determinación de la actividad lipasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración. Debe advertirse que los mejores modos de monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, peroxidasa, y otros componentes se describirán en detalle en la fórmula de reacción 3 a continuación.

(C) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos la disolución de diglicéridos descrita anteriormente para la determinación de la actividad lipasa.

(D) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y la disolución de diglicéridos descrita anteriormente para la determinación de la actividad lipasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración. Debe advertirse que los mejores modos de monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se describirán en detalle en la fórmula de reacción 2 a continuación.

(E) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos la disolución de diglicéridos descrita anteriormente para la determinación de la

actividad lipasa.

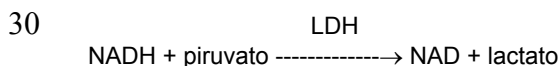
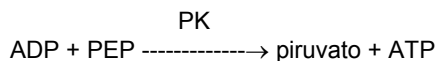
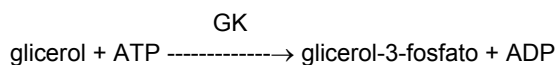
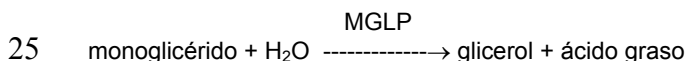
5 (F) La composición incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de baja concentración, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, y la disolución de diglicéridos descrita anteriormente para la determinación de la actividad lipasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración. Debe advertirse que los mejores modos de las enzimas utilizadas en (E) y (F), es decir, monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa se describirán en detalle en la fórmula de reacción 1 a continuación.

10 En el caso de utilizar un diglicérido como sustrato, los productos de una reacción de lipasa son un ácido graso libre y un monoglicérido. La actividad lipasa puede determinarse mediante la determinación de la velocidad de producción del ácido graso libre o monoglicérido con el acoplamiento de reacciones enzimáticas utilizando una técnica espectroscópica; pero los ácidos grasos libres están presentes en la sangre, en particular están presentes a alta concentración en el suero después de una diálisis o de la inyección intravenosa de heparina. Por tanto, resulta más preferible determinar en su lugar el monoglicérido mediante el método enzimático. Para la cuantificación del monoglicérido, la determinación se realiza preferiblemente mediante el método enzimático utilizando una enzima acoplante implicada con el monoglicérido.

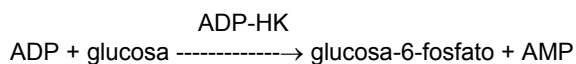
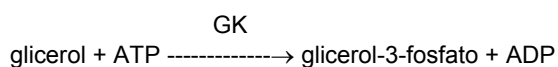
15 Los métodos para cuantificar un monoglicérido mediante el método enzimático incluyen los siguientes métodos mostrados en las siguientes fórmulas de reacción.

20 En las siguientes fórmulas de reacción, MGLP es monoglicérido lipasa, GK es glicerol quinasa, ATP es adenosina trifosfato, ADP es adenosina difosfato, PEP es fosfoenolpiruvato, NADH es  $\beta$ -difosfopiridín nucleótido reducido, NAD es  $\beta$ -difosfopiridín nucleótido oxidado, ADP-HK es hexoquinasa dependiente de ADP, y G6PDH es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. GPO es glicerol-3-fosfato oxidasa, POD es peroxidasa, 4-AA es 4-aminoantipirina, y TOOS es la sal de sodio de etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina.

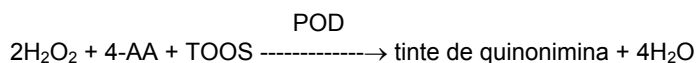
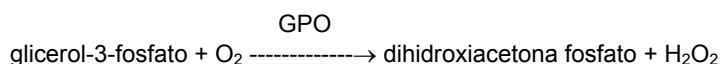
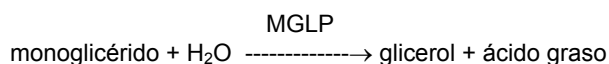
Fórmula de reacción 1



Fórmula de reacción 2



Fórmula de reacción 3



En primer lugar se describirá la fórmula reacción 1.

El origen de la monoglicérido lipasa que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitado, con la condición de que la enzima no actúe sobre un diglicérido y actúe de modo específico sobre un monoglicérido, pero desde el punto de vista de un suministro estable, resulta preferible una enzima derivada de un microorganismo.

5 En particular, resulta preferible una enzima derivada del género *Bacillus*. El límite inferior de la concentración de la monoglicérido lipasa que se va a utilizar como enzima acoplante en una reacción de lipasa es preferiblemente 0,5 U/ml o mayor, más preferiblemente 0,6 U/ml o mayor, aún más preferiblemente 0,7 U/ml o mayor, preferiblemente en particular 0,72 U/ml o mayor, y muy preferiblemente 0,74 U/ml o mayor. El límite superior es aproximadamente 5 U/ml, y preferiblemente es 3 U/ml o menor, más preferiblemente 1,13 U/ml o menor, aún más preferiblemente 1 U/ml o menor, preferiblemente en particular 0,8 U/ml o menor, muy preferiblemente 0,78 U/ml o menor, y muy preferiblemente en particular 0,76 U/ml o menor. Lo más preferiblemente es aproximadamente 0,75 U/ml.

15 El origen de la glicerol quinasa que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitado, pero se emplea preferiblemente una enzima que tenga una estabilidad excelente. En particular, resulta preferible una enzima derivada del género *Flavobacterium*. El límite inferior de la concentración de glicerol quinasa que se va a utilizar como enzima acoplante en una reacción de lipasa pancreática es preferiblemente 0,1 U/ml o mayor, más preferiblemente 0,15 U/ml o mayor, aún más preferiblemente 0,18 U/ml o mayor, y preferiblemente en particular 0,2 U/ml o mayor. Por otra parte, el límite superior es aproximadamente 2 U/ml, y es preferiblemente 1 U/ml o menor, más preferiblemente 0,5 U/ml o menor, aún más preferiblemente 0,3 U/ml o menor, y preferiblemente en particular 0,22 U/ml o menor. Lo más preferiblemente es aproximadamente 0,2 U/ml.

20 Como la piruvato quinasa que se va a utilizar en la presente invención, puede utilizarse una enzima derivada de músculos de animales que se emplea en general como material bruto de un reactivo para ensayos clínicos de laboratorio. La concentración de piruvato quinasa que se va a utilizar como enzima acoplante en una reacción de lipasa pancreática debe ser de aproximadamente 0,5 a 10 U/ml, y preferiblemente está en el intervalo de 1 a 2 U/ml, y preferiblemente en particular en el intervalo de 0,8 a 1,2 U/ml. Lo más preferiblemente es aproximadamente 1 U/ml. La concentración de fosfoenolpiruvato que se va a utilizar en la presente invención como sustrato de la piruvato quinasa está en el intervalo de 0,3 a 2 mM, preferiblemente de 0,3 a 0,4 mM, por lo demás de 0,48 a 0,52 mM, y preferiblemente es aproximadamente 0,5 mM.

25 El origen de la lactato deshidrogenasa que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitado, pero se emplea más preferiblemente una enzima que tenga una excelente estabilidad y que se deriva del corazón de pollo. La concentración de la enzima que se va a utilizar como enzima acoplante en una reacción de lipasa pancreática debe ser aproximadamente de 0,15 a 1,5 U/ml, y preferiblemente está en el intervalo de 0,3 a 0,4 U/ml, por lo demás de 0,28 a 0,32 U/ml. Preferiblemente es aproximadamente 0,3 U/ml.

30 La concentración de NAD reducido que se va a utilizar en la presente invención como sustrato de la lactato deshidrogenasa está preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 0,4 mM, aún más preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 0,35 mM, preferiblemente en particular en el intervalo de 0,28 a 0,32 mM. Preferiblemente es aproximadamente 0,3 mM. En otro aspecto, preferiblemente está en el intervalo de 0,3 a 0,4 mM.

35 Una composición preparada añadiendo también iones magnesio que actúan como activadores de la glicerol quinasa y de la piruvato quinasa a la composición de la presente invención es muy preferible. La concentración de los iones magnesio debe estar en el intervalo de 1,5 a 4 mM, y está preferiblemente en el intervalo de 1,8 a 2,2 mM, y preferiblemente en particular es aproximadamente 2 mM. Como ion magnesio, puede utilizarse una sal, tal como sulfato de magnesio o acetato de magnesio, y particularmente se prefiere el sulfato de magnesio.

40 Para mantener el pH de una reacción de lipasa a un cierto nivel, el uso de un tampón es muy preferible. El pH óptimo de la lipasa pancreática es pH 7,7 a 8,1, mientras que el pH óptimo de las lipasas no pancreáticas es pH 7,7 a 8,3, y puede utilizarse un tampón que tenga una capacidad tamponante del pH en los intervalos de pH, tal como un tampón de Good, que incluye Tris-HCl, TES, HEPES, TAPSO, POPSO, tricina, y bicina. En particular, desde el punto de vista de un blanco reactivo bajo, son más preferibles la tricina y la bicina, y la bicina resulta particularmente preferible. El límite inferior de la concentración de tampón utilizada es preferiblemente 50 mM o mayor, más preferiblemente 100 mM o mayor, aún más preferiblemente 150 mM o mayor, y preferiblemente en particular 180 mM o mayor. Por otra parte, el límite superior es preferiblemente 500 mM o menor, más preferiblemente 300 mM o menor, aún más preferiblemente 250 mM o menor, y preferiblemente en particular 220 mM o menor. Lo más preferiblemente es aproximadamente 200 mM.

A continuación se describirá la fórmula de reacción 2.

45 En la composición de un reactivo para la determinación de lipasas utilizando la fórmula de reacción 2, los tampones, la monoglicérido lipasa, la glicerol quinasa, y el ATP son los mismos que en la fórmula de reacción 1 anterior. El ADP es uno de los productos de la glicerol quinasa que puede ser convertido en glucosa-6-fosfato por la hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HK) en presencia de glucosa. El origen de la ADP-HK no está particularmente limitado, pero desde el punto de vista de un suministro estable, resulta preferible una enzima derivada de un microorganismo. En particular, resulta particularmente preferible una enzima derivada de una

bacteria extremadamente termófila que pertenezca al género *Pyrococcus*, *Thermococcus*, etc. La concentración de glucosa que es un sustrato de la ADP-HK puede estar en el intervalo de 2 a 50 mM, y está preferiblemente en el intervalo de 10 a 30 mM, preferiblemente en particular en el intervalo de 15 a 25 mM. La concentración de la enzima utilizada como enzima acoplante en una reacción de lipasa puede estar en el intervalo de 0,2 a 3 U/ml, y preferiblemente en particular está en el intervalo de 0,4 a 1 U/ml. La glucosa-6-fosfato, que es un producto de la enzima, puede ser convertida en NADP o NAD reducido por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NADP o NAD oxidado. El origen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no está particularmente limitado, pero desde el punto de vista de un suministro estable, resulta preferible una enzima derivada de un microorganismo. En particular, resulta particularmente preferible una enzima derivada del género *Leuconostoc*. La concentración de enzima utilizada como enzima acoplante en una reacción de lipasa puede estar en el intervalo de 0,2 a 3 U/ml, y preferiblemente en particular está en el intervalo de 0,4 a 1 U/ml.

A continuación se describirá la fórmula de reacción 3.

En la composición de un reactivo para la determinación de lipasas utilizando la fórmula de reacción 1, los tampones, la monoglicérido lipasa, la glicerol quinasa, y el ATP son los mismos que en la fórmula de reacción 1 anterior. El glicerol-3-fosfato, que es uno de los productos de la glicerol quinasa, puede ser convertido en peróxido de hidrógeno por la glicerol-3-fosfato oxidasa que oxida de modo específico al glicerol-3-fosfato. El origen del glicerol-3-fosfato no está particularmente limitado, y desde el punto de vista de un suministro estable, resulta preferible una enzima derivada de un microorganismo. En particular, resulta particularmente preferible una enzima derivada de una bacteria de ácido láctico. La concentración de la enzima utilizada como enzima acoplante en una reacción de lipasa pancreática puede estar en el intervalo de 2 a 50 U/ml, y preferiblemente en particular está en el intervalo de 5 a 20 U/ml. El peróxido de hidrógeno, producido mediante una reacción de la glicerol-3-fosfato oxidasa, produce un tinte mediante condensación oxidativa de la peroxidasa, un cromógeno del reactivo de Trinder, y un acoplante. Como cromógeno de un reactivo de tipo Trinder puede utilizarse un derivado o derivados de fenol, un derivado o derivados de anilina, un derivado o derivados de toluidina, etc. y los ejemplos específicos incluyen N,N-dimetilanilina, N,N-dietilanilina, 2,4-diclorofenol, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS), N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetilanilina (MAPS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina (MAOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS), N-etil-N-sulfopropil-m-anisidina (ADPS), N-etil-N-sulfopropil-anilina (ALPS), N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina (DAPS), N-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina (HDAPS), N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina (TOPS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-anisidina (ADOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina (ALOS), N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (HDAOS), y N-sulfopropil-anilina (HALPS) (fabricados por Dojindo Laboratories). La concentración de cromógeno utilizada en un reactivo para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática puede estar en el intervalo del 0,02% al 0,5%, y preferiblemente en particular está en el intervalo del 0,05% al 0,1%. Como acoplante, puede utilizarse un acoplante tal como 4-aminoantipirina o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). La concentración del acoplante utilizada en un reactivo para la determinación de la lipasa pancreática puede estar en el intervalo del 0,02% al 0,5%, y preferiblemente en particular está en el intervalo del 0,05% al 0,1%.

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno puede desarrollar un color con un reactivo de tipo leuco en presencia de peroxidasa. Los ejemplos específicos del reactivo incluyen o-dianisidina, o-tolidina, 3,3-diaminobenzidina, 3,3,5,5-tetrametilbenzidina (fabricados por Dojindo Laboratories), N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4-bis(dimetilamino)bifenilamina (DA64), y 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)fenotiazina (DA67) (fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

El origen de la peroxidasa que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitado, pero resulta particularmente preferible una enzima derivada de rábano porque tiene un suministro estable. La concentración de la enzima utilizada como enzima acoplante en una reacción de lipasa puede estar en el intervalo de 2 a 50 U/ml, y preferiblemente en particular está en el intervalo de 5 a 20 U/ml.

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno puede cuantificarse mediante un método de fluorescencia, un método de análisis que emplee quimioluminiscencia, un método para cuantificar un aldehído formado a partir de un alcohol, o un método de electrodos. El método de fluorescencia puede realizarse utilizando un compuesto que emita fluorescencia mediante oxidación, tal como ácido homovanílico, 4-hidroxifenilacetato, tiramina, paracresol, o un derivado de diacetilfluoresceína, mientras que el método de quimioluminiscencia puede realizarse utilizando, como catalizador, luminol, lucigenina, isoluminol, pirogalol, etc. Los ejemplos de un método para producir un aldehído a partir de un alcohol que emplea catalasa o similares, y cuantificar el aldehído resultante incluyen un método que emplea una reacción de Hantzsch, un método para revelar un color mediante una reacción de condensación con MBTH, y un método que emplea aldehído deshidrogenasa.

Por otra parte, en el caso de la determinación del peróxido de hidrógeno utilizando electrodos, los materiales de los electrodos no están particularmente limitados, con la condición de que puedan transferir electrones desde y hasta el peróxido de hidrógeno, y los ejemplos incluyen platino, oro, y plata. El método de determinación que emplea electrodos incluye métodos conocidos, tales como amperometría, potenciometría, y coulometría, y puede utilizarse un mediador de electrones para mediar en la reacción entre una oxidasa o un sustrato y los electrodos, seguido de la determinación de la corriente de oxidación o reducción resultante o de su cantidad eléctrica. Como mediador de electrones puede utilizarse cualquier sustancia que tenga una función de transferencia de electrones, y los ejemplos

incluyen sustancias, tales como derivados de ferroceno y derivados de quinona. Por otra parte, puede utilizarse un mediador de electrones para mediar entre el peróxido de hidrógeno producido por una reacción de oxidasa y electrodos, seguido de la determinación de la corriente de oxidación o reducción resultante o de su cantidad eléctrica.

5 Una composición para la determinación de la actividad lipasa de la presente invención puede utilizarse como un reactivo que contenga todos los componentes, pero preferiblemente se emplea como dos reactivos, el reactivo 1 (R1) y el reactivo 2 (R2). En el caso de la fórmula de reacción 1, R1 es preferiblemente un reactivo que contiene, por ejemplo, ATP, fosfoenolpiruvato, monoglicérido lipasa, glicerol quinasa, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa, y también puede contener iones calcio, iones magnesio, iones amonio, un tampón de Good, etc. El R1 o R2 en las  
10 fórmulas de reacción 1 a 3 contienen un diglicérido como un sustrato de lipasa disuelto en un tensioactivo no iónico. Para mantener la estabilidad de conservación a largo plazo de un diglicérido en forma líquida sin desnaturalización, la concentración del tampón en R2 es extremadamente importante. El tipo de tampón puede seleccionarse de tampones de Good, tales como tampón acetato, tampón citrato, tampón Tris-HCl, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, tricina, bicina, TAPS, CHES, CAPSO, y CAPS. La concentración del tampón utilizada puede estar en el intervalo de 0,5 a 10 mM, y preferiblemente está en el intervalo de 1 a 5 mM, preferiblemente en particular en el intervalo de 1,5 a 2 mM. Por  
15 otra parte, en el caso de la determinación de la lipasa pancreática, R2 es preferiblemente un reactivo que contiene un ácido biliar o su sal, y NAD reducido, y puede contener también un tampón de Good, etc. El ácido biliar es preferiblemente ácido desoxicólico, ácido taurodesoxicólico, o ácido glicodesoxicólico, más preferiblemente ácido desoxicólico. Estos ácido taurodesoxicólico, ácido glicodesoxicólico y ácido desoxicólico son particularmente preferibles en las formas de las sales de sodio por su mayor solubilidad. La sal del ácido biliar no se limita a la sal de sodio, y también son preferibles las sales de potasio o similares.

Una sustancia biogénica, tal como suero, a veces contiene glicerol libre que puede provocar errores, así que resulta preferible eliminar el glicerol libre de una muestra. El método de eliminación en los casos de las fórmulas de reacción  
25 1 y 2 es diferente del caso de la fórmula de reacción 3. En los casos de las fórmulas de reacción 1 y 2, para eliminar el glicerol libre se añade a R1 una enzima oxidante (glicerol oxidasa) que actúa sobre el glicerol para convertir el glicerol en un aldehído, evitando con ello los efectos del glicerol libre. En estos casos, debe añadirse a R2 glicerol quinasa o ATP o ambos. La glicerol oxidasa puede ser una glicerol oxidasa conocida, tal como glicerol oxidasa derivada del género *Aspergillus*, *Neurospora* o *Penicillium* (véase Agricultural Biological Chemistry, 44(2), 399-406,  
30 1980).

En el caso de la fórmula de reacción 3, se añade una disolución de ensayo al reactivo 1 (R1) que contiene glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, catalasa, o peroxidasa, y un cromógeno de un reactivo de Trinder, tal como un derivado de fenol, un derivado de anilina, o un derivado de toluidina, seguido de un calentamiento, para eliminar con  
35 ello el glicerol. Los ejemplos del cromógeno de un reactivo de Trinder incluyen los cromógenos descritos en la fórmula de reacción 1.

El reactivo 2 (R2) incluye un componente que contiene un acoplante, tal como 4-aminoantipirina o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). El peróxido de hidrógeno se produce en el momento de mezclar R1 y R2 mediante la reacción de la glicerol-3-fosfato, y produce un tinte mediante condensación oxidativa del reactivo de Trinder y un acoplante. La absorbancia del tinte puede determinarse de modo espectroscópico.

40 En el caso de preparar un reactivo para la determinación de la actividad lipasa utilizando las fórmulas de reacción 1, 2 y 3, puede añadirse de modo apropiado, si es necesario, una estabilizante de enzimas, tal como un azúcar, que incluye sacarosa, manitol, sorbitol, maltosa, lactosa, ciclodextrina, trehalosa; y un agente quelante, que incluye EDTA. La concentración del azúcar añadido puede estar en el intervalo del 1% al 20%, y preferiblemente está en el intervalo del 3% al 15%, preferiblemente en particular en el intervalo del 4% al 8%. En el caso de utilizar un agente  
45 quelante, su concentración puede estar en el intervalo de 0,02 mM a 1 mM, y preferiblemente está en el intervalo de 0,05 mM a 0,54 mM, preferiblemente en particular en el intervalo de 0,1 a 0,3 mM. Además, pueden añadirse de modo apropiado diversos conservantes, tales como azida de sodio, en una cantidad del 0,01% al 10%, preferiblemente del 0,05% al 1%. También, si es necesario, el reactivo puede dividirse en al menos tres reactivos.

Por otra parte, un reactivo para la determinación de las lipasas de la presente invención es estable en forma líquida, por tanto no es necesario formular el reactivo mediante el método de la liofilización, logrando con ello una manipulación extremadamente fácil y una excelente operabilidad del reactivo. Por otra parte, el método para determinar la actividad lipasa tiene una excelente precisión y reproducibilidad. De modo específico, en el caso de la fórmula de reacción 1, es un método para determinar la actividad lipasa que incluye convertir un monoglicérido liberado de un glicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa;  
55 convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de fosfoenolpiruvato; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido. La longitud de onda para la determinación de la absorbancia del NAD reducido puede ser cualquier longitud de onda en la que la actividad de la lipasa pancreática en una muestra pueda determinarse de modo preciso (puede ser una longitud de onda concreta o una integración de longitudes de onda en el intervalo de unas longitudes de onda concretas), pero se  
60

5 selecciona, por ejemplo, preferiblemente de 300 a 400 nm, más preferiblemente de 320 a 360 nm, aún más preferiblemente de 330 a 350 nm, muy preferiblemente de aproximadamente 340 nm. La longitud de onda de aproximadamente 340 nm significa, por ejemplo, preferiblemente una longitud de onda ajustada a 340 nm con un intervalo de error de 10 nm o menor, y el intervalo de error es más preferiblemente 5 nm o menor, aún más preferiblemente 3 nm o menor, y muy preferiblemente 1 nm o menor.

10 En el caso de la fórmula de reacción 2, un método para determinar la actividad lipasa incluye convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasa dependiente de ADP en presencia de glucosa; dejar actuar a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia del NAD reducido o NADP reducido. La longitud de onda para la determinación de la absorbancia del NAD reducido puede ser cualquier longitud de onda, con la condición de que la actividad de la lipasa pancreática en una muestra pueda determinarse de modo preciso (puede ser una longitud de onda concreta o una integración de longitudes de onda en el intervalo de unas longitudes de onda concretas), pero se selecciona, por ejemplo, preferiblemente de 300  
15 a 400 nm, más preferiblemente de 320 a 360 nm, aún más preferiblemente de 330 a 350 nm, muy preferiblemente de aproximadamente 340 nm. La longitud de onda de aproximadamente 340 nm significa, por ejemplo, preferiblemente una longitud de onda ajustada a 340 nm con un intervalo de error de 10 nm o menor, y el intervalo de error es más preferiblemente 5 nm o menor, aún más preferiblemente 3 nm o menor, y muy preferiblemente 1 nm o menor.

20 En el caso de la fórmula de reacción 3, un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa se convierte en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; el glicerol se convierte en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; y el peróxido de hidrógeno resultante puede ser convertido por la peroxidasa, reactivo de Trinder y un reactivo acoplante, en un tinte de quinona que tiene una longitud de onda visible. La longitud de onda depende del reactivo de Trinder utilizado, pero debería seleccionarse una longitud de onda de aproximadamente 540-700 nm. La proporción de aumento del tinte generado puede determinarse mediante un ensayo de determinación de la proporción. Como alternativa, después de una reacción desarrollada durante un tiempo determinado, la reacción se detiene con un agente desnaturalizante de enzimas, tal como laurilsulfato de sodio, y la absorbancia puede determinarse a una longitud de onda de aproximadamente 540-700 nm.

30 Después de la inyección intravenosa de heparina o durante el uso de la heparina para una diálisis, las lipasas que aparecen en la sangre son la lipasa hepática y la lipasa de lipoproteínas, y la composición descrita anteriormente para la determinación de las lipasas se emplea para determinar ambas enzimas de modo simultáneo. En el caso en que se requiera la determinación específica de cualquiera de las dos enzimas, puede utilizarse un inhibidor o un anticuerpo que inhiba de modo específico la otra lipasa, para expresar la especificidad de las lipasas.

### Ejemplos

35 A continuación, la presente invención se describirá con más detalle mediante ejemplos, pero no se limita a los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1-1: Preparación del sustrato de diglicéridos de la lipasa

40 Se disolvieron 0,5 gr de fosfatidilcolina derivada de lecitina de yema de huevo (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation) en 10 ml de cloroformo. Se añaden 5 mililitros de un tampón PIPES-NaOH 0,5 M (pH 7,5) en el que se han disuelto 400 unidades de fosfolipasa C (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), y la mezcla se agita a 37 °C para realizar una reacción hidrolítica. Dos horas después se separa la capa de disolvente y la capa acuosa para recoger la capa de cloroformo, y la capa se hace pasar a través de una columna de gel de sílice (3 ml) que previamente se había suspendido en cloroformo, seguido del revelado con cloroformo para producir con ello una fracción de diglicéridos. El cloroformo se retiró completamente mediante destilación utilizando un evaporador rotatorio, para producir con ello 1,1 gr de un diglicérido en forma de un aceite.

#### Ejemplo 1-2: Preparación de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática en la fórmula de reacción 2 anterior

(1) Preparación del reactivo 1 (R1)

50 Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 200 mM (pH 8,0), cloruro de calcio 2 mM, sulfato de magnesio 2 mM, cloruro de amonio 20 mM, adenosina trifosfato 3 mM, glucosa 30 mM, NADP 3 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 600 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 600 U/l (fabricada por Toyobo Co., Ltd.), ADP-HK 900 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), y colipasa 15.000 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation).

(2) Preparación del reactivo 2 (R2)

55 Se pesó una cierta cantidad del diglicérido producido en el ejemplo 1-1, y se añadió una cierta cantidad de POE



nonilfenil éter al 0,04% (tampón MES-NaOH 1,5 mM, pH 5,5) para producir 0,4 mM, seguido de agitación a 37 °C durante 30 minutos, para producir con ello una disolución de sustrato totalmente transparente. Se añadió ácido desoxicólico a la disolución de sustrato para producir 8 mM, para preparar con ello el reactivo 2.

5 **Ejemplo 1-3: Preparación de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas en la fórmula de reacción 3 anterior**

(1) Preparación del reactivo 1 (R1)

10 Se preparó un reactivo que incluye tampón Tris-HCl 300 mM (pH 8,5), cloruro de calcio 2 mM, sulfato de magnesio 3 mM, adenosina trifosfato 3 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 600 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol-3-fosfato oxidasa 30.000 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), peroxidasa 5.000 U/l (fabricada por Sigma), y TOOS al 0,2%.

(2) Preparación del reactivo 2 (R2)

Se preparó un reactivo que incluye una disolución de sustrato de diglicérido preparada mediante el método descrito en el ejemplo 1-2 (concentración de diglicérido: 1,5 mM, concentración de POE nonilfenil éter: 0,3%), bicina-NaOH 1 mM (pH 8,0), y 4-aminoantipirina al 0,2%.

15 **Ejemplo 1-4: Estabilidad de conservación del sustrato de diglicéridos de la lipasa**

Se pesó cierta cantidad del diglicérido producido en el ejemplo 1-1, y se añadió tampón bicina-NaOH 0,5 a 200 mM (pH 8) que contiene POE nonilfenil éter al 0,06%, de forma que la concentración de diglicérido fue 0,6 mM, seguido de un calentamiento a 37 °C durante 3 días. Después se determinó la concentración del diglicérido remanente mediante un método enzimático (se utilizó azida de sodio al 0,1% como conservante).

20 Los resultados se muestran en la tabla 1. Los resultados mostrados en la tabla 1 revelan que cuanto mayor sea la concentración del tampón, menor será la proporción del sustrato de diglicérido remanente.

Tabla 1

Concentración de tampón (mM)	Proporción de sustrato remanente (%)
0,5	99,6
1	98,1
2,5	99,4
5	98,8
10	96,9
20	88,4
50	84,9
100	83,5
200	63,9

**Ejemplo 1-5: Determinación de la actividad de la lipasa pancreática**

25 Se añadieron muestras (de 0 a 50 microlitros de disoluciones de enzimas) a 1.000 microlitros del reactivo 1 (R1) mostrado en el ejemplo 1-2, y se dejó que la mezcla reaccionase a 37 °C durante 3 minutos. Después se añadieron 500 microlitros del reactivo 2 (R2) que tiene la composición mostrada en el ejemplo 1-2 para comenzar la reacción. Se determinaron las absorbancias a 340 nm secuencialmente. Los cambios en la linealidad de la absorbancia en respuesta a las cantidades de enzima se muestran en la figura 1.

30 **Ejemplo 1-6: Determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas**

35 A 1.000 microlitros del reactivo 1 (R1) que tiene la composición mostrada en el ejemplo 1-3 se le añadieron muestras de plasma 15 minutos después de la inyección intravenosa de heparina, seguido de una incubación a 37 °C durante 5 minutos. Después se añadieron 500 microlitros de R2 para comenzar las reacciones de coloración, y se determinaron las absorbancias a 550 nm secuencialmente. Los cambios en la linealidad de la absorbancia en respuesta a las cantidades de enzima se muestran en la figura 2.

**Ejemplo 2-1: Preparación del sustrato de diglicéridos para la reacción de las lipasas no pancreáticas**

5 Se disolvieron 0,5 gr de fosfatidilcolina derivada de lecitina de yema de huevo (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation) en 10 ml de cloroformo. Se añaden 5 mililitros de un tampón PIPES-NaOH 0,5 M (pH 7,5) en el que se han disuelto 400 unidades de fosfolipasa C (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), y la mezcla se agita a 37 °C para realizar una reacción hidrolítica. Dos horas después se separa la capa de disolvente y la capa acuosa para recoger la capa de disolvente, y la capa se carga en una columna de gel de sílice húmeda (3 ml) que previamente se había preparado suspendido el gel en cloroformo, seguido del revelado con cloroformo para producir con ello una fracción de diglicéridos en el título.

**Ejemplo 2-2-1: Preparación de una disolución de sustrato para la reacción de las lipasas no pancreáticas**

10 Se tomó cierta cantidad del diglicérido disuelto en cloroformo producido en el ejemplo 2-1, y el disolvente se eliminó completamente mediante destilación a presión reducida. Se añadió cierta cantidad de POE nonilfenil éter al 2% (tampón MES-NaOH 10 mM, pH 5,5) para producir 10 mM, seguido de una agitación a 37 °C durante 30 minutos, para producir con ello una disolución de sustrato en el título en forma de una disolución de sustrato totalmente transparente. La disolución de sustrato se conservó en una nevera (aproximadamente 4 °C).

**Ejemplo 2-2-2: Preparación de una disolución de sustrato tratada con álcali para la reacción de las lipasas no pancreáticas**

15 Se repitió el procedimiento del ejemplo 2-2-1, excepto que se utilizó un tampón con un pH de 7,97 (Tris-HCl) en lugar de un tampón con un pH 5,5 empleado en el ejemplo 2-2-1, para producir con ello una disolución de sustrato en el título en forma de una disolución de sustrato totalmente transparente. La disolución de sustrato se conservó en una nevera (aproximadamente 4 °C).

**Ejemplo 2-3: Ejemplo de un sistema de enzimas acoplantes basado en la fórmula de reacción 1**

(I) Preparación de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas

Se preparó un reactivo que incluye el reactivo 1 (R1) y el reactivo 2 (R2) en forma de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas en el título.

25 (1) Preparación del reactivo 1 (R1)

30 Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 300 mM (pH 8,0), una disolución del sustrato de diglicérido preparada mediante el método descrito en el ejemplo 2 (concentración de diglicérido: 1,5 mM, concentración de POE nonilfenil éter: 0,3%), sulfato de magnesio 3 mM, adenosina-3-fosfato 3 mM, fosfoenolpiruvato 1,5 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 300 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), piruvato quinasa 3.000 U/l (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.), y lactato deshidrogenasa 600 U/l (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.).

(2) Preparación del reactivo 2 (R2)

Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 10 mM (pH 8,5) y NAD reducido 1 mM.

**Ejemplo 2-4: Ejemplo de sistema de enzimas acoplantes basado en la fórmula de reacción 3**

35 (I) Preparación de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas

Se preparó un reactivo que incluye el reactivo 1 (R1) y el reactivo 2 (R2) en forma de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas en el título.

(1) Preparación del reactivo 1 (R1)

40 Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 300 mM (pH 8,0), una disolución del sustrato de diglicérido preparada mediante el método descrito en los ejemplos 2-2-1 y 2-2-2 (concentración de diglicérido: 1,5 mM, concentración de POE nonilfenil éter: 0,3%), sulfato de magnesio 3 mM, cloruro de amonio 30 mM, adenosina-3-fosfato 3 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 300 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol-3-fosfato oxidasa 15 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), peroxidasa 1.500 U/l (fabricada por Sigma Corporation), y TOOS al 0,2%.

45 (2) Preparación del reactivo 2 (R2)

Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 10 mM (pH 8,5) y 4-aminoantipirina al 0,2%.

**Ejemplo 2-5: Determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas**

Se añadieron muestras (de 0 a 50 microlitros de disoluciones de enzimas) a 800 microlitros del reactivo 1 (R1) que

tiene la composición mostrada en el ejemplo 2-4, y se dejó que la mezcla reaccionase a 37 °C durante 3 minutos. Después se añadieron 400 microlitros del reactivo 2 (R2) que tiene la composición mostrada en el ejemplo 2-4 para realizar la reacción de coloración a 37 °C durante justo 5 minutos, y se añadieron 500 microlitros de SDS (laurilsulfato de sodio) al 0,5% para detener la reacción, seguido de la determinación de las absorbancias a 550 nm. Los cambios en la absorbancia de la linealidad de la dilución en respuesta a las cantidades de enzima (cantidades de lipasas no pancreáticas) se muestran en la figura 3.

#### **Ejemplo 2-6: Efecto del tensioactivo no iónico sobre las actividades de la lipasa pancreática y de las lipasas no pancreáticas**

Se estudiaron los efectos de un tensioactivo no iónico utilizando ERM lote 1 certificado por Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards como lipasa pancreática, y empleando una fracción de lipasa (eluida con NaCl 0,8 M) purificada mediante una columna de heparina-Sepharose a partir de plasma después de una inyección intravenosa como lipasas no pancreáticas. Los resultados se muestran en la figura 4. En el intervalo de tensioactivo no iónico al 0,2%, donde se activa la actividad de las lipasas no pancreáticas, hasta el nivel máximo, se descubrió que la actividad de la lipasa pancreática no se expresa en absoluto.

#### **Ejemplo 3-1: Preparación del sustrato de diglicérido para la reacción de la lipasa pancreática**

Se disolvieron 0,5 gr de fosfatidilcolina purificada derivada de lecitina de yema de huevo (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation) en 10 ml de cloroformo. Se añaden 5 mililitros de un tampón PIPES-NaOH 0,5 M (pH 7,5) en el que se han disuelto 400 unidades de fosfolipasa C (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), y la mezcla se agita a 37 °C para realizar una reacción hidrolítica. Dos horas después se separa la capa de disolvente y la capa acuosa para recoger la capa de disolvente, y la capa se carga en una columna de gel de sílice húmeda (3 ml) que previamente había sido preparada suspendiendo el gel en cloroformo, seguido del revelado con cloroformo para producir con ello una fracción de diglicéridos en el título.

#### **Ejemplo 3-2: Preparación de disoluciones de sustrato para la reacción de la lipasa pancreática**

Se tomó cierta cantidad del diglicérido disuelto en cloroformo producido en el ejemplo 3-1, y el disolvente se eliminó completamente mediante destilación a presión reducida. Se añadió cierta cantidad de POE nonilfenil éter al 0,7% (diversos tampones 15 mM) para producir 7 mM, seguido de un calentamiento a 37 °C durante 10 horas bajo diversas condiciones de pH, para producir con ello disoluciones de sustrato en el título. Las disoluciones de sustrato se conservaron en una nevera (aproximadamente 4 °C).

#### **Ejemplo 3-3: Experimento para determinar la lipasa pancreática utilizando los sustratos**

La tabla 2 muestra los niveles de producción de 1,3-DG en los sustratos producidos y las actividades de la lipasa pancreática determinadas mediante el método descrito en el ejemplo 3-5 utilizando el sustrato y los reactivos de la composición descritos en el ejemplo 3-5 (fórmula de reacción 1).

Tal como se muestra en la tabla 2, en los casos en que el pH es 7 o menor no se produjo el 1,3-diglicérido, y los valores de actividad de la lipasa pancreática son bajos.

Tabla 2

pH	1,3-DG (%)	Lipasa pancreática (%)
4,52	0	75,6
5,04	0	87,2
7,28	20,9	100
7,97	50,3	99,1
8,51	60,2	98,9
9,12	61,7	99,6

#### **Ejemplo 3-4: Método para preparar el sustrato**

Se tomó cierta cantidad del diglicérido disuelto en cloroformo producido en el ejemplo 3-1, y el disolvente se eliminó completamente mediante destilación a presión reducida. Se añadió cierta cantidad de POE nonilfenil éter al 0,7% (tampón 2,5 mM descrito en la tabla 3) para producir 7 mM, y la mezcla se dejó en reposo, con calentamiento a 37 °C durante 1 hora y 4 horas. Los contenidos en 1,3-diglicéridos se analizaron mediante el método de barrido de Yatoro. Tal como se muestra en la tabla 3, en los casos de pH de 10 o mayor, se logró el equilibrio en 1 hora. En los

casos de un pH en el intervalo de pH 7,88 a 9,33, se descubrió que los contenidos en 1,3-diglicéridos aumentaban con la extensión del periodo de calentamiento.

Tabla 3

Tampón	pH	1,3-diglicérido (%)	
		37 °C, 1 h	37 °C, 4 h
Bicina-NaOH	8,1	10,4	41,2
Glicina-NaOH	8,41	16,5	40,3
	9,33	38,6	63,1
	10,09	64,2	64,4
	10,25	64,6	64,0
Tris-HCl	7,88	6,8	31,7
	8,52	14,3	55,6
	9,19	30,7	58,8

### 5 Ejemplo 3-5: Experimento de estabilidad del sustrato

Los reactivos de la fórmula de reacción 3 se prepararon mediante el método de preparación convencional, es decir, mediante el método descrito en el ejemplo 3-7 utilizando, como materiales brutos: una disolución de sustrato de la lipasa pancreática (pH 5,5), que se había sometido a un tratamiento de calentamiento durante 1 hora con diglicérido derivado de fosfatidilcolina de yema de huevo 1,05 mM solubilizado con una disolución que contenía MES-NaOH 15 mM (pH 5,5) y POE nonilfenil éter al 0,053%; y la disolución de sustrato preparada en el ejemplo 3-2 bajo una condición de pH 7,97, y se conservaron a 15 °C. La determinación se realizó según el método para determinar la actividad de la lipasa pancreática descrito en el ejemplo 3-7, y los resultados se muestran en la tabla 4.

Tal como se muestra en la tabla 4, se descubrió que la actividad del sustrato era muy estable comparada con la del sustrato convencional.

Tabla 4

Periodo de conservación del reactivo	Sustrato preparado a pH 9,7	Sustrato convencional (pH 5,5)
Inmediatamente después de la preparación	320	246
Tres días después	322	274
Diez días después	318	307

### Ejemplo 3-6: Ejemplo de sistema de enzimas acoplantes basado en la fórmula de reacción 1

(I) Preparación de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática

Se preparó un reactivo que incluye el reactivo 1 (R1) y el reactivo 2 (R2) en forma de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática en el título.

(1) Preparación del reactivo 1 (R1)

Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 300 mM (pH 8,0), bicina-NaOH 15 mM (pH 8,0), un sustrato de la lipasa pancreática obtenido sometiendo a un diglicérido derivado de fosfatidilcolina de yema de huevo 1,05 mM solubilizado con una disolución que contenía POE nonilfenil éter al 0,053% a un tratamiento de calor a 37 °C durante 10 horas, sulfato de magnesio 3 mM, cloruro de amonio 30 mM, colipasa 4.500 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), adenosina-3-fosfato 3 mM, fosfoenolpiruvato 1,5 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 300 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), piruvato quinasa 3.000 U/l (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.), y lactato deshidrogenasa 600 U/l (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.).

(2) Preparación del reactivo 2 (R2)

Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 10 mM (pH 8,5), desoxicolato de sodio 21 mM, y NAD reducido 1 mM.

(II) Determinación de la actividad de la lipasa pancreática utilizando un analizador automático

5 Se añadieron 15 microlitros de muestras (ERM lote 1 certificado por Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards) a 200 microlitros del reactivo 1 (R1) que tiene la composición mostrada en (I), y después de un lapso de 5 minutos a 37 °C, se añadieron 100 microlitros del reactivo 2 (R2) para realizar una reacción a 37 °C, seguido de la determinación secuencial de las absorbancias (Abs) a 340 nm.

10 Se calcularon las actividades de la lipasa pancreática a partir de los cambios en las absorbancias desde 3 minutos a 5 minutos después de la adición de R2 mediante la siguiente expresión. El desarrollo en el tiempo de la reacción y la linealidad de la dilución se muestran en la figura 5 y la figura 6, respectivamente.

Actividad lipasa (U/L) = cambio en la absorbancia a 340 nm por minuto x 1/6,3 x 315/15 x 1.000

**Ejemplo 3-7: Ejemplo de sistema de enzimas acoplantes basado en la fórmula de reacción 3**

(I) Preparación de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática

15 Se preparó un reactivo que incluye el reactivo 1 (R1) y el reactivo 2 (R2) en forma de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática en el título.

(1) Preparación del reactivo 1 (R1)

20 Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 300 mM (pH 8,0), bicina-NaOH 15 mM (pH 8,0), un sustrato de la lipasa pancreática obtenido sometiendo a un diglicérido derivado de fosfatidilcolina de yema de huevo 1,05 mM solubilizado con una disolución que contenía POE nonilfenil éter al 0,053% a un tratamiento de calor a 37 °C durante 10 horas, sulfato de magnesio 3 mM, cloruro de amonio 30 mM, colipasa 4.500 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), adenosina trifosfato 3 mM, monoglicérido lipasa 1.125 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol quinasa 300 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), glicerol-3-fosfato oxidasa 15 U/l (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), peroxidasa 1.500 U/l (fabricada por Sigma Corporation), y TOOS al 0,2%.

(2) Preparación del reactivo 2 (R2)

Se preparó un reactivo que incluye bicina-NaOH 10 mM (pH 8,0), desoxicolato de sodio 21 mM, y 4-aminoantipirina al 0,2%.

(II) Determinación manual de la actividad de la lipasa pancreática

30 Se añadieron 50 microlitros de muestras (ERM lote 1 certificado por Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards) a 800 microlitros del reactivo 1 (R1) que tiene la composición mostrada en (I), para realizar una reacción a 37 °C durante 3 minutos, y se añadieron 400 microlitros del reactivo 2 (R2) que tiene la composición mostrada en el ejemplo 3-6, para realizar una reacción de coloración a 37 °C sólo durante 5 minutos. Después se añadieron 500 microlitros de SDS (laurilsulfato de sodio) al 0,5% para detener la reacción, y se determinaron las absorbancias a 35 550 nm. La linealidad de la dilución se muestra en la figura 7.

**Aplicabilidad industrial**

La composición para la determinación de la actividad lipasa de la presente invención permite una determinación precisa de la actividad lipasa y resulta adecuada como reactivo de diagnóstico de la actividad lipasa en sangre.

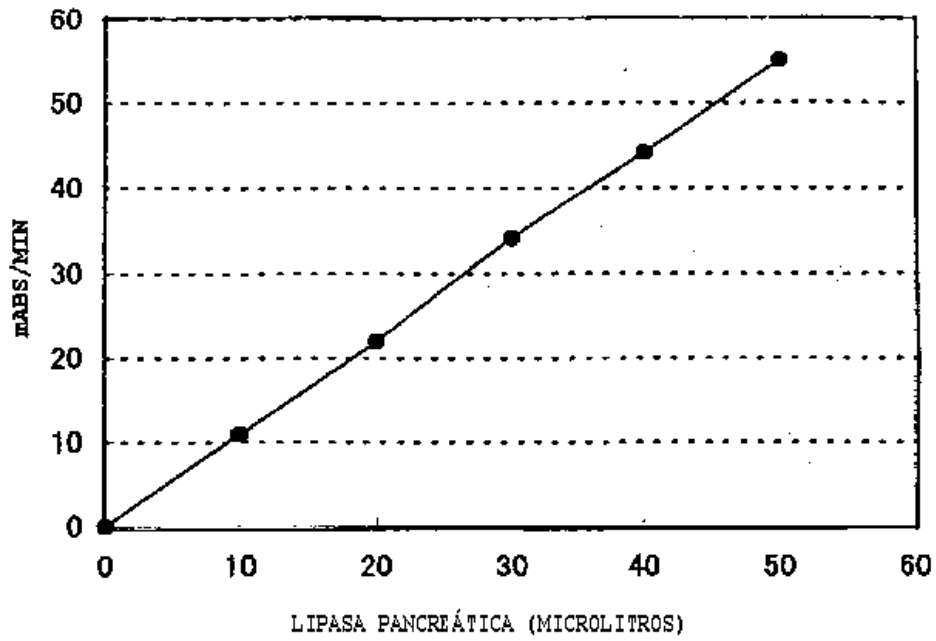
## REIVINDICACIONES

- 1.- Una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa, que se caracteriza porque comprende un diglicérido, un tampón de baja concentración en el intervalo de 0,5 a 9 mM, y un tensioactivo no iónico.
- 2.- Una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1, en la que los diglicéridos son una mezcla de 1,3-diglicéridos y 1,2-diglicéridos.
- 5 3.- Una composición para la determinación de la actividad lipasa, que se caracteriza porque comprende la disolución de diglicéridos según la reivindicación 1 ó 2, y una enzima o enzimas que convierten un monoglicérido liberado de los diglicéridos según la reivindicación 1 ó 2, mediante una reacción de lipasa, en glicerol-3-fosfato a través del glicerol libre.
- 10 4.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2.
- 15 5.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2.
- 20 6.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2.
- 25 7.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido es de 2,5 veces molar o mayor.
- 8.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 está en forma líquida.
- 30 9.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa, y peroxidasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal.
- 35 10.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD oxidado o NADP oxidado, glucosa, hexoquinasa dependiente de ATP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal.
- 40 11.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática que incluye: (1) el reactivo 1 que contiene al menos una disolución de diglicéridos para la determinación de la actividad lipasa según la reivindicación 1 ó 2, monoglicérido lipasa, ATP, glicerol quinasa, NAD reducido, fosfoenolpiruvato, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa; y (2) el reactivo 2 que contiene al menos un tampón de alta concentración en el intervalo de 50 a 500 mM, y un ácido biliar o su sal.
- 45 12.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido está en el intervalo de 1,5 a 2,5 veces molar.
- 13.- Un kit de una composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 está en forma líquida.
- 50 14.- Un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando la composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según la reivindicación 4, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; realizar una reacción de coloración dejando actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de

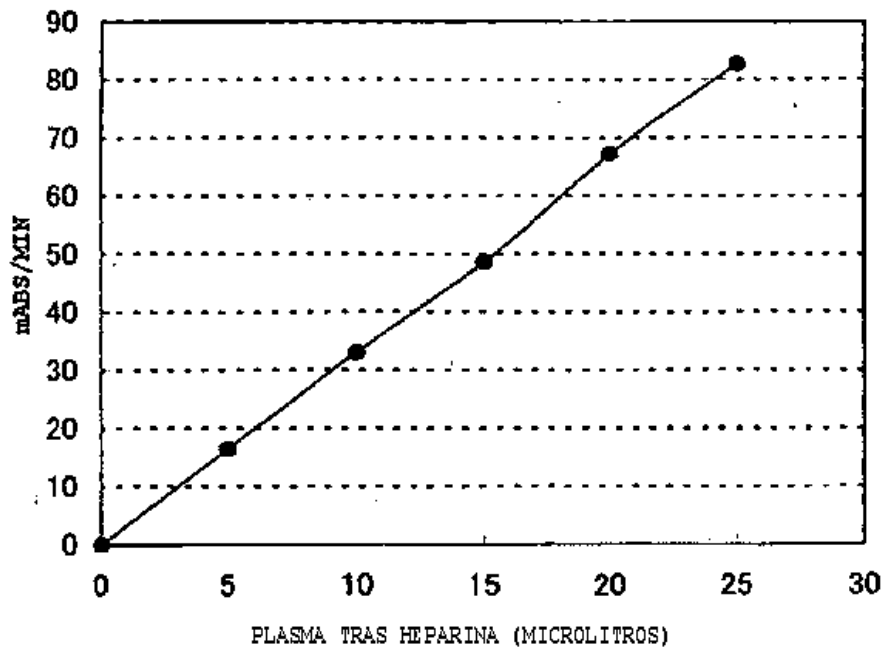
peróxido de hidrógeno; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540 a 700 nm.

- 5 15.- Un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando la composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según la reivindicación 5, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasa dependiente de ADP en presencia de glucosa; dejar actuar a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia del NAD reducido o NADP reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm.
- 10 16.- Un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas utilizando la composición para la determinación de la actividad de las lipasas no pancreáticas según la reivindicación 6, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm.
- 15 17.- Un método para determinar la actividad de las lipasas no pancreáticas según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que la proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido es de 2,5 veces molar o mayor.
- 20 18.- Un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando la composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según la reivindicación 9, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en glicerol-3-fosfato mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el glicerol-3-fosfato en peróxido de hidrógeno dejando actuar a la glicerol-3-fosfato oxidasa; realizar una reacción de coloración dejando actuar a la peroxidasa en presencia de un tinte que se colorea en presencia de peróxido de hidrógeno; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 540 a 700 nm.
- 25 19.- Un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando la composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según la reivindicación 10, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasa dependiente de ADP en presencia de glucosa; dejar actuar a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado; y determinar la tasa de aumento de la absorbancia del NAD reducido o NADP reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm.
- 30 20.- Un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática utilizando la composición para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática según la reivindicación 11, que comprende: convertir un monoglicérido liberado de un diglicérido mediante una reacción de lipasa en glicerol mediante la acción de monoglicérido lipasa; convertir el glicerol en ADP mediante glicerol quinasa en presencia de ATP; convertir el ADP en ácido pirúvico mediante piruvato quinasa en presencia de ácido fosfoenolpirúvico; dejar actuar a la lactato deshidrogenasa en presencia de NAD reducido; y determinar la tasa de disminución de la absorbancia del NAD reducido a una longitud de onda de aproximadamente 340 nm.
- 35 21.- Un método para determinar la actividad de la lipasa pancreática según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que la proporción molar de tensioactivo no iónico a diglicérido está en el intervalo de 1,5 a 2,5 veces molar.
- 40 22.- Un método para determinar la actividad lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en el que el reactivo 1 y/o el reactivo 2 en una composición para la determinación de la actividad lipasa está en forma líquida.

[FIG. 1]

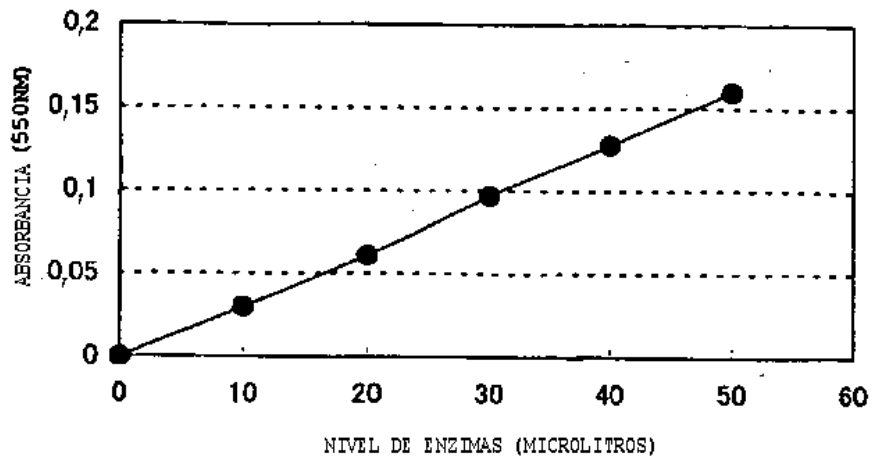


[FIG. 2]

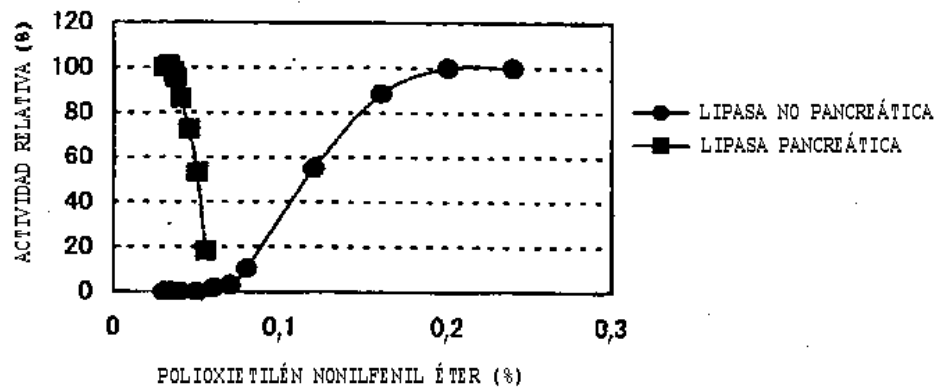




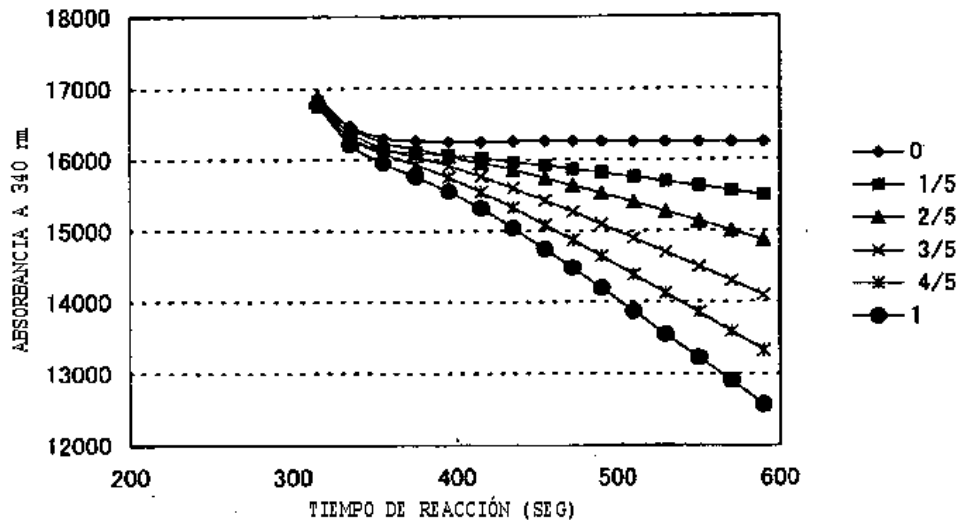
[FIG. 3]



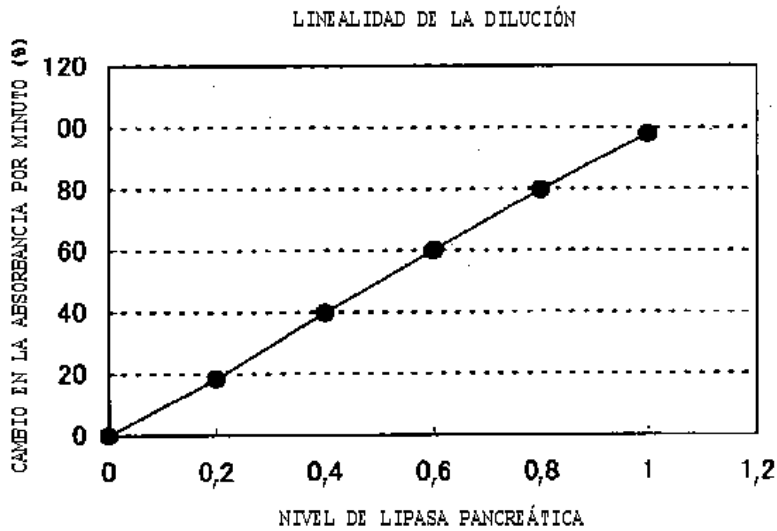
[FIG. 4]



[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]

