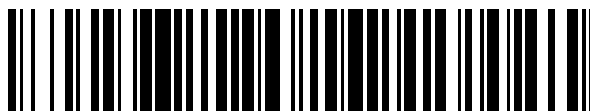


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 143**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

**C12Q 1/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2006** **E 06732406 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012** **EP 1876243**

54 Título: **Método para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad**

30 Prioridad:

**27.04.2005 JP 2005129319**

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

**19.02.2013**

73 Titular/es:

**KYOWA MEDEX CO., LTD. (100.0%)**

**8-10, Harumi 1-chome**

**CHUO-KU, TOKYO 104-6004, JP**

72 Inventor/es:

**KATAYAMA, YUKI y**

**FUJINAKA, MAYUMI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 396 143 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

Método para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método, un reactivo y un equipo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad en una muestra.

Fundamento de la técnica

Las lipoproteínas en sistemas vivos se clasifican en lipoproteína de alta densidad (en adelante abreviado como HDL), lipoproteína de baja densidad (en adelante abreviado como LDL), lipoproteína de muy baja densidad (en adelante abreviado como VLDL) y quilomicrón (en adelante abreviado como CM) según su gravedad específica. Cada clase de lipoproteína tiene una función considerablemente diferente in vivo principalmente según la clase de apoproteínas y además tiene una composición diferente de lípidos. Se sabe que, de estas lipoproteínas, HDL está implicada en la eliminación de colesterol acumulado en las células porque recibe colesterol a partir de tejidos que incluyen paredes arteriales, y es un factor de prevención de riesgo para diversas clases de arteriosclerosis, por ejemplo, arteriosclerosis coronaria, y por lo tanto, su nivel en sangre es un índice útil para predecir el comienzo de enfermedades arterioscleróticas.

Los métodos convencionales para la medida de colesterol en HDL (en adelante abreviado como HDL colesterol) consisten en dos etapas de operación, es decir, fraccionamiento por el método de ultracentrifugado, el método inmunoquímico, el método de electroforesis, el método de precipitación, etc. y determinación de colesterol. Sin embargo, las operaciones de fraccionamiento son complicadas y consumidores de tiempo y además tienen un problema respecto a la seguridad. Por lo tanto, los métodos de medida que contienen estas operaciones de separación son extremadamente ineficaces y no están adaptados para el uso práctico.

En años recientes, se han propuesto diversos métodos de medida para resolver los problemas anteriores. Ejemplos de los métodos incluyen: un método para la determinación fraccional de HDL colesterol que comprende hacer reaccionar suero o plasma con colesterol esterasa y colesterol oxidasa en un tampón que comprende las enzimas anteriores, y sal biliar, un derivado de ácido biliar o dioctilsulfosuccinato, para permitir al colesterol en VLDL y LDL reaccionar con las enzimas antes de la reacción de HDL colesterol, midiendo el peróxido de hidrógeno formado, y añadiendo después un tensioactivo no iónico que tiene un grupo de óxido de polioxietileno a la disolución de reacción para permitir al HDL colesterol reaccionar con las enzimas (véase el documento de patente núm. 1); y un método para la medida de HDL colesterol que comprende hacer reaccionar suero con colesterol esterasa derivada del páncreas y colesterol oxidasa en un tampón que comprende las enzimas, un tensioactivo que pertenece al grupo de ácidos biliares y un tensioactivo no iónico a un pH específico y una temperatura específica (véase el documento de patente núm. 2). En el método descrito en el documento de patente núm. 2, la reacción de LDL colesterol con las enzimas procede primero y después la reacción de HDL colesterol con las enzimas procede, lo que permite la medida de HDL colesterol. Sin embargo, estos métodos requieren mucho tiempo para medir y no siempre son específicos para la medida de HDL colesterol.

Ejemplos conocidos de los métodos para la medida de HDL colesterol agregando lipoproteínas distintas de HDL incluyen: un método que usa un reactivo para agregar lipoproteínas distintas de HDL (por ejemplo, sulfato de dextrano), una sal de metal divalente y una enzima químicamente modificada (véase el documento de patente núm. 3); un método que usa un reactivo que forma un complejo con lipoproteínas distintas de HDL (por ejemplo, polianión) y un tensioactivo que no disuelve lipoproteínas (por ejemplo, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno) (véase el documento de patente núm. 4); un método que usa un polianión (por ejemplo, sulfato de dextrano), una sal de metal divalente, un tensioactivo no iónico específico y albúmina que es diferente de la albúmina contenida en una muestra (véase el documento de patente núm. 5); y un método para la medida de HDL colesterol en suero o plasma que comprende tratar suero o plasma con una disolución que contiene un agente fraccionador de lipoproteína (una combinación de un polianión tal como sulfato de dextrano y un catión divalente tal como ión magnesio), hacer reaccionar la mezcla obtenida con colesterol esterasa y colesterol oxidasa en presencia de un tensioactivo aniónico (ácido alquilsulfónico, ácido biliar o su derivado) sin someter la mezcla a separación sólido-líquido, y medir el peróxido de hidrógeno formado (véase el documento de patente núm. 6).

Estos métodos para la medida de HDL colesterol agregando lipoproteínas distintas de HDL tienen una buena correlación con los métodos estándar convencionales. Sin embargo, hay problemas con estos métodos tales como imprecisión debido a la turbidez provocada por agregados formados mediante la reacción, y una carga excesiva a un autoanálizador debido a la deposición de hidróxido metálico formado por la reacción con sal metálica en una disolución de reacción cuando las células de reacción se lavan con una disolución alcalina.

Ejemplos conocidos de los métodos para la medida de HDL colesterol sin agregar lipoproteínas distintas de HDL incluyen: un método para la medida de HDL colesterol en una muestra biológica que comprende hacer reaccionar la muestra biológica con colesterol esterasa derivada del páncreas y colesterol oxidasa en presencia de ácido biliar o su sal y albúmina, y medir un compuesto consumido o formado por la reacción enzimática (véase el documento de patente núm. 7); y un método para la medida de HDL colesterol en una muestra que comprende hacer reaccionar la

muestra con lipoproteína lipasa que actúa preferentemente en la fracción HDL y/o colesterol esterasa y colesterol oxidasa en presencia de un tensioactivo no iónico con un valor HLB de 16 o más que tiene una selectividad de reacción a la fracción HDL (véase el documento de patente núm. 8). También se conoce un método en que el colesterol en lipoproteínas distintas de HDL se convierte preferentemente en peróxido de hidrógeno con acil-polioxietilen-sorbitan-éster, y después de que el peróxido de hidrógeno formado se elimine, el HDL colesterol se mide de forma enzimática añadiendo polioxietilen-alquiléter (véase el documento de patente núm. 9).

Sin embargo, estos métodos para la medida de HDL colesterol sin agregar lipoproteínas distintas de HDL a veces tienen el problema de imprecisión de valores de medida debido a la eliminación incompleta de colesterol en lipoproteínas distintas de HDL y reacción no específica con colesterol en lipoproteínas distintas de HDL.

Ejemplos conocidos adicionales de los métodos para la medida de HDL colesterol sin agregar lipoproteínas distintas de HDL incluyen: un método para la medida de HDL colesterol en una muestra que comprende hacer reaccionar la muestra con i) colesterol esterasa y colesterol oxidasa o ii) colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa en un medio acuoso que comprende un tensioactivo no iónico, un polianión y albúmina, y medir el peróxido de hidrógeno formado o coenzima reducida (véase el documento de patente núm. 10); y un método para la medida de HDL colesterol que comprende hacer reaccionar una muestra con colesterol esterasa y colesterol oxidasa, o colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa en un medio acuoso que comprende un derivado de ácido biliar, y medir el peróxido de hidrógeno formado o coenzima reducida (véase el documento de patente núm. 11).

Documento de patente núm. 1:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 69999/87

Documento de patente núm. 2:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 126498/88

Documento de patente núm. 3:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 131197/96

Documento de patente núm. 4:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 201393/96

Documento de patente núm. 5:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 285298/97

Documento de patente núm. 6:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 116996/96

Documento de patente núm. 7:

Panfleto WO97/40376

Documento de patente núm. 8:

Panfleto WO00/52480

Documento de patente núm. 9:

Solicitud de Patente No Examinada Publicada Japonesa núm. 299/97

Documento de patente núm. 10:

Panfleto WO04/035816

Documento de patente núm. 11:

Panfleto WO04/035817

#### Descripción de la Invención

#### Problemas a ser Resueltos por la Invención

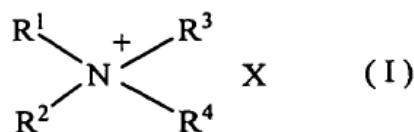
Un objeto de la presente invención es proporcionar un método, un reactivo y un equipo para la medida sencilla y precisa de HDL colesterol.

Medios para Resolver los Problemas

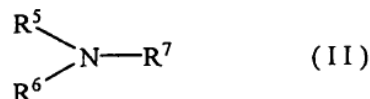
Los actuales inventores hicieron estudios intensivos para resolver el problema anterior, han encontrado que la colesterol esterasa y colesterol oxidasa o colesterol deshidrogenasa actúan de forma específica en HDL en co-presencia de un tensioactivo específico que contiene nitrógeno que tiene la estructura de amina o sal de amonio y un polianión, y han completado la presente invención.

La presente invención se refiere a los siguientes (1) a (13).

- (1) Un método para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad en una muestra, que comprende: hacer reaccionar la muestra con i) colesterol esterasa y colesterol oxidasa o ii) colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa en un medio acuoso que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

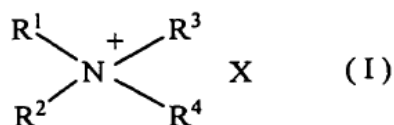


(en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alqueno que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representan cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) y sustancias representadas por la fórmula general (II):

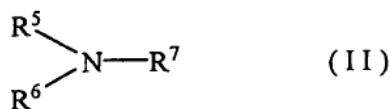


(en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representan cada uno un grupo metilo) y un polianión; y medir el peróxido de hidrógeno o coenzima reducida.

- (2) El método según el (1) anterior, en donde el medio acuoso comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.
- (3) El método según los anteriores (1) o (2), en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.
- (4) Un reactivo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

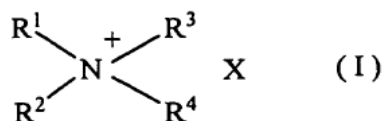


(en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alqueno que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representan cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) y sustancias representadas por la fórmula general (II):

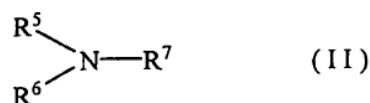


(en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representan cada uno un grupo metilo), un polianión, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

- (5) Un reactivo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste de sustancias representadas por fórmula general (I):

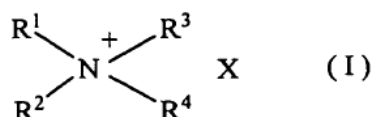


- 5 (en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) y sustancias representadas por la fórmula general (II):

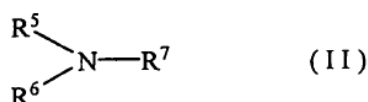


- 10 (en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo), un polianión, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa y coenzima oxidada.

- (6) El reactivo según el (5) anterior, que comprende además un reactivo para la medida de coenzima reducida.
- (7) El reactivo según cualquiera de los anteriores (4) a (6), que comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.
- 15 (8) El reactivo según cualquiera de las anteriores (4) a (7), en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.
- (9) Un equipo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende un primer reactivo y un segundo reactivo, que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

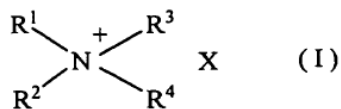


- 20 (en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) y sustancias representadas por la fórmula general (II):

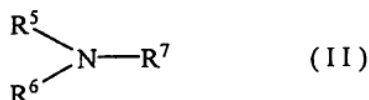


- 25 (en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo) y un polianión en el primer reactivo; colesterol oxidasa en el segundo reactivo; un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo; y colesterol esterasa en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.
- 30

- (10) Un equipo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende un primer reactivo y un segundo reactivo, que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):



(en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) y sustancias representadas por la fórmula general (II):



(en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo) y un polianión en el primer reactivo; colesterol deshidrogenasa en el segundo reactivo; coenzima oxidada en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo; y colesterol esterasa en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

(11) El equipo según el (10) anterior, que comprende además un reactivo para la medida de coenzima reducida en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

(12) El equipo según cualquiera de los anteriores (9) a (11), que comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

(13) El equipo según cualquiera de los anteriores (9) a (12), en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.

#### Efecto de la Invención

La presente invención proporciona un método, un reactivo y un equipo para la medida sencilla y precisa de HDL colesterol.

#### Mejores Modos para Llevar a Cabo la Invención

El método para la medida de HDL colesterol de la presente invención es un método para la medida de HDL colesterol sin eliminar colesterol en lipoproteínas distintas de HDL o agregando colesterol en lipoproteínas distintas que HDL.

Ejemplos de las muestras usadas en el método de la presente invención incluyen sangre completa, plasma, suero, fluido espinal, saliva, fluido amniótico, orina, sudor y jugo pancreático, entre las que se prefieren plasma y suero.

No hay restricción específica en cuanto a la colesterol esterasa usada en la presente invención siempre que sea una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar éster de colesterol. Por ejemplo, pueden usarse colesterol esterasa y lipoproteína lipasa obtenidas de animales, plantas o microorganismos, y las producidas por técnicas de ingeniería genética.

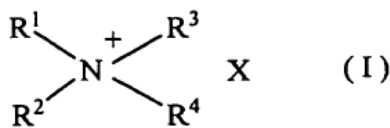
Como la colesterol esterasa, pueden usarse tanto la no modificada como la modificada químicamente, y pueden también usarse las disponibles comercialmente.

Ejemplos de las colesterol esterases disponibles comercialmente incluyen colesterol esterasa "Amano" 2 (CHE2; Amano Enzyme Inc.), colesterol esterasa "Amano" 3 (CHE3; Amano Enzyme Inc.), lipoproteína lipasa (LPL311; Toyobo Co., Ltd.), lipoproteína lipasa "Amano" 3 (LPL3; Amano Enzyme Inc.), esterasa 43 kDa (Amano Enzyme Inc.), esterasa 40 kDa (Amano Enzyme Inc.), EST "Amano" 2 (Amano Enzyme Inc.) y colesterol esterasa [COE313 (colesterol esterasa modificada químicamente); Toyobo Co., Ltd.]. En la presente invención, dos o más clases de colesterol esterases pueden usarse en combinación.

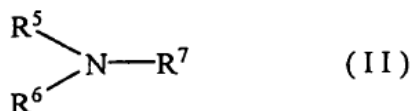
Ejemplos de los grupos que modifican colesterol esterasa (grupos que modifican químicamente) usados en la modificación química de colesterol esterasa incluyen un grupo que comprende polietilenglicol como un componente principal, un grupo que comprende polipropilenglicol como un componente principal, un grupo que tiene un copolímero de polipropilenglicol y polietilenglicol, un grupo que comprende un polisacárido soluble en agua, un grupo sulfopropilo, un grupo sulfobutilo, un grupo poliuretano y un grupo que tiene la función quelante, y se prefiere un grupo que comprende polietilenglicol como un componente principal. Ejemplos de los polisacáridos solubles en agua incluyen dextrano, pululano y almidón soluble.

- Ejemplos de reactivos para modificación química de colesterol esterasa (modificadores químicos) incluyen compuestos que tienen tanto el grupo que modifica químicamente anterior y un grupo funcional o una estructura que puede reaccionar con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo o similares de una enzima. Ejemplos de los grupos funcionales o estructuras que pueden reaccionar con un grupo amino de una enzima incluyen un grupo carboxilo, un grupo éster activado (por ejemplo, grupo N-hidroxisuccinimida), un anhídrido de ácido, un cloruro de ácido, un aldehído, un grupo epóxido, 1,3-propanosultona y 1,4-butanosultona. Un ejemplo del grupo funcional o estructura que puede reaccionar con un grupo carboxilo de una enzima es un grupo amino. Ejemplos de los grupos o estructuras reactivas con un grupo sulfhidrilo de una enzima incluyen un grupo maleimida, un disulfuro y  $\alpha$ -haloéster (por ejemplo,  $\alpha$ -yodoéster).
- Como los modificadores químicos, pueden usarse los disponibles comercialmente. Ejemplos de los modificadores químicos disponibles comercialmente son Sunbright VFM-4101, Sunbright ME-050AS y Sunbright DE-030AS que tienen un grupo que comprende polietilenglicol como un componente principal y un grupo N-hidroxisuccinimida (todos producidos por NOF Corporation), Sunbright AKM series (por ejemplo, Sunbright AKM-1510), Sunbright ADM series y Sunbright ACM series que tienen un grupo que comprende polialquilenglicol como un componente principal y una estructura de anhídrido de ácido (todos producidos por NOF Corporation), EPOX-3400 y M-EPOX-5000 que tienen un grupo que comprende polietilenglicol como un componente principal y un grupo epóxido (ambos producidos por Sheawater Polymers), y dianhídrido de dietilentriamina-N,N,N',N'',N'''-pentaacético que tiene un grupo que tiene la función quelante y una estructura de anhídrido de ácido (anhídrido DTPA, Dojindo Laboratories).
- La modificación química de colesterol esterasa puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el método siguiente, aunque no lo limita. Primero, se disuelve colesterol esterasa en un tampón de pH 8,0 o mayor (por ejemplo, tampón HEPES), y se añade cantidad molar de 0,01 a 500 veces de un modificador químico a 0 a 55°C, seguido por agitación durante 5 minutos a 5 horas. En la reacción enzimática actual, esta mezcla de reacción puede usarse como tal, o si es necesario, después de la eliminación del modificador químico no reaccionado con un ultrafiltro, como la colesterol esterasa químicamente modificada.
- No hay restricción específica en cuanto a la concentración de colesterol esterasa usada en el método de la presente invención, mientras pueda realizarse la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,01 a 400 U/mL, más preferiblemente 0,02 a 200 U/mL.
- No hay restricción específica en cuanto a la colesterol oxidasa usada en la presente invención mientras sea una enzima que tiene la capacidad de oxidar colesterol para formar peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, puede usarse colesterol oxidasa obtenida de animales, plantas o microorganismos, y los producidos por técnicas de ingeniería genética. También pueden usarse los disponibles comercialmente tal como colesterol oxidasa "Amano" 1 (CHOD1; Amano Enzyme Inc.), colesterol oxidasa (CHOPE; Kikkoman Corporation), colesterol oxidasa (COO321; Toyobo Co., Ltd.) y colesterol oxidasa Kyowa (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). En la presente invención, dos o más clases de colesterol oxidasas pueden usarse en combinación.
- La colesterol oxidasa puede ser o bien una no modificada o una modificada químicamente. La colesterol oxidasa modificada químicamente puede prepararse, por ejemplo, mediante el método anterior para modificación química usando el modificador químico anterior.
- No hay restricción específica en cuanto a la concentración de colesterol oxidasa usada en el método de la presente invención, mientras que pueda realizarse la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,01 a 400 U/mL, más preferiblemente 0,02 a 200 U/mL.
- No hay restricción específica en cuanto a la colesterol deshidrogenasa usada en la presente invención mientras que sea una enzima que tiene la capacidad de oxidar colesterol en la presencia de coenzima oxidada para formar coenzima reducida. Por ejemplo, puede usarse colesterol deshidrogenasa obtenida de animales, plantas o microorganismos, y los producidos por técnicas de ingeniería genética. Puede usarse también las disponibles comercialmente tal como colesterol deshidrogenasa "Amano" 5 (CHDH5; Amano Enzyme Inc.). En la presente invención, dos o más clases de colesterol deshidrogenasas pueden usarse en combinación. La colesterol deshidrogenasa puede ser o bien no modificada o una modificada químicamente. La colesterol deshidrogenasa químicamente modificada puede prepararse, por ejemplo, mediante el método anterior por modificación química usando el modificador químico anterior.
- No hay restricción específica en cuanto a la concentración de colesterol deshidrogenasa usada en el método de la presente invención, mientras puede realizarse la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,01 a 400 U/mL, más preferiblemente 0,02 a 200 U/mL.
- En el método que usa colesterol deshidrogenasa de la presente invención, se usa coenzima oxidada. Ejemplos de las coenzimas oxidadas son NAD, NADP, tio-NAD y tio-NADP.

En la presente invención, una sustancia representada mediante la fórmula general (I):



(en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión) [en adelante denominado como Compuesto (I)] o una sustancia representada por la fórmula (II):



(en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo) [en adelante denominado como Compuesto (II)] se usa en combinación con un polianión.

- 10 El grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono en el Compuesto (I) y el Compuesto (II) incluye, por ejemplo, decilo, undecilo, dodecilo (laurilo), tridecilo, tetradecilo (miristilo), pentadecilo, hexadecilo (cetilo), heptadecilo y octadecilo (estearilo).

El grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono en el Compuesto (I) y el Compuesto (II) incluye, por ejemplo, decenilo, citronelilo, undecenilo, dodecenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo y oleilo.

El grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono en el Compuesto (I) y el Compuesto (II) incluye, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, isooctilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo (laurilo), tridecilo, tetradecilo (miristilo), pentadecilo, hexadecilo (cetilo), heptadecilo, octadecilo (estearilo), nonadecilo, icosilo, heneicosilo, docosilo (behenilo), tricosilo, tetracosilo, pentacosilo, hexacosilo, heptacosilo, octacosilo, nonacosilo y triacontilo. Se prefieren grupos alquilo que tienen 1 a 24 átomos de carbono, y se prefieren más grupos alquilo que tienen 1 a 18 átomos de carbono.

El grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 2 a 30 átomos de carbono en el Compuesto (I) incluye, por ejemplo, vinilo, propenilo, alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, citronelilo, undecenilo, dodecenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo, oleilo, nonadecenilo, eicosenilo, heneicosenilo, docosenilo, tricosenilo, tetracosenilo, pentacosenilo, hexacosenilo, heptacosenilo, octacosenilo, nonacosenilo y triacontenilo. Se prefieren grupos alquenilo que tienen 2 a 24 átomos de carbono, y se prefieren más grupos alquenilo que tienen 2 a 18 átomos de carbono.

El anión en el Compuesto (I) incluye ión hidróxido, ión halógeno, anión derivado de ácido inorgánico y anión derivado de ácido orgánico. Ejemplos de los iones halógeno son ión fluoruro, ión cloruro, ión bromuro e ión yoduro. Ejemplos de los aniones derivados de ácido inorgánico son ión nitrato, ión sulfato, ión fosfato e ión carbonato. Ejemplos de los aniones derivados de ácido orgánico son iones carboxilato tales como ión formiato, ión acetato, ión lactato, ión citrato e ión glutamato.

Los compuestos representados por la fórmula general (I) son aquellos en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno metilo; y X representa un anión.

Ejemplos específicos (productos) de los Compuestos (I) son Catión AB, Catión BB, Catión 2ABT, Catión 2DB-500E y Catión 2-OLR (todos producidos por NOF Corporation). Ejemplos específicos (productos) de los Compuestos (II) son Amina BB, Amina AB, Amina 2-OLR, Amina Terciaria BB y Amina Terciaria FB (todas producidas por NOF Corporation).

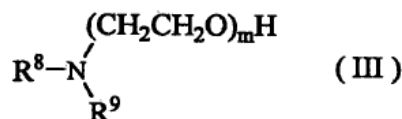
La concentración de Compuesto (I) o Compuesto (II) no está limitada específicamente mientras la medida de HDL colesterol según la presente invención puede llevarse a cabo. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,0001 a 1%, más preferiblemente 0,001 a 0,1%.

No hay restricción específica en cuanto al polianión usado en la presente invención mientras pueda realizarse la medida de HDL colesterol según la presente invención. Ejemplos del polianión incluyen sulfato de dextrano o su sal, heparina o su sal, ácido fosfotúngstico o su sal, ciclodextrina sulfatada o su sal y oligosacárido sulfatado o su sal,

entre los que se prefiere sulfato de dextrano o su sal. Ejemplos del sulfato de dextrano son aquellos con pesos moleculares de 40.000, 80.000, 200.000, 500.000, 1.000.000 y 2.000.000. Ejemplos de los oligosacáridos sulfatados son agarosa sulfatada, trehalosa sulfatada y sulfato de condroitina. Ejemplos de las sales son sal sódica, sal de potasio, sal de litio, sal de amonio y sal de magnesio. En la presente invención, pueden usarse dos o más clases de polianiones. No hay restricción específica en cuanto a la concentración de polianión usada en la medida de HDL colesterol de la presente invención mientras puede llevarse a cabo la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,001 a 10%, más preferiblemente 0,01 a 1%.

No hay restricción específica en cuanto a la albúmina usada en la presente invención mientras puede llevarse a cabo la medida de HDL colesterol según la presente invención. Ejemplos de la albúmina incluyen albúmina obtenida de vaca, caballo, oveja y ser humano, y se prefiere la albúmina de suero bovino (BSA). La albúmina producida por técnicas de ingeniería genética puede usarse también. En la presente invención, pueden usarse dos o más clases de albúmina en combinación. No hay restricción específica en cuanto a la concentración de albúmina usada en la medida de HDL colesterol de la presente invención mientras pueda llevarse a cabo la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,001 a 10%, más preferiblemente 0,01 a 1%.

Ejemplos de la polioxietilentalquilamina o polioxietilentalquenilamina usada en la presente invención incluyen compuestos representados por la fórmula general (III):



(en donde R<sup>8</sup> representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada; R<sup>9</sup> representa un átomo de hidrógeno o (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H; y m y n, que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa un número entero de 1 a 100, y m + n es un número entero de 2 a 200) [denominado en adelante como Compuesto (III)]. Ejemplos del grupo alquilo y grupo alquenilo en el Compuesto (III) incluyen los grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen 6 a 30 átomos de carbono y los grupos alquenilo de cadena lineal o ramificada que tienen 6 a 30 átomos de carbono. Se prefieren grupos alquilo y grupos alquenilo que tienen 8 a 24 átomos de carbono, y son más preferidos grupos alquilo y grupos alquenilo que tienen 10 a 18 átomos de carbono.

Ejemplos específicos (productos) de la polioxietilentalquilamina o polioxietilentalquenilamina son Nymeen L201 (oxietilendodecilamina; NOF Corporation), Nymeen L207 (polioxietilendodecilamina; NOF Corporation), Nymeen S204, Nymeen S210 (polioxietilenoctadecilamina; NOF Corporation), Newcol OD420 (polioxietilenoctadecilamina; Nippon Nyukazai Co., Ltd.), Pionin D3104 (polioxietilen-laurilamina; Takemoto Oil & Fat Co., Ltd.), Pionin D3110 (polioxietilen-laurilamina; Takemoto Oil & Fat Co., Ltd.), Pionin D3605 [polioxietilen-alquil(soja)amina; Takemoto Oil & Fat Co., Ltd.], Pionin D3615T [polioxietilentalquil(sebo de bovino)amina; Takemoto Oil & Fat Co., Ltd.] BLAUNON O209 [polioxietilen-oleilamino-éter; Aoki Oil Industrial Co., Ltd.] y BLAUNON L205 [polioxietilen-laurilamino-éter; Aoki Oil Industrial Co., Ltd.].

El grado de polimerización de la cadena de oxietileno de la polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina es preferiblemente 1 a 100, más preferiblemente 1 a 60. En la presente invención, pueden usarse dos o más clases de polioxietilentalquilaminas y polioxietilentalquenilaminas. No hay restricción específica en cuanto a la concentración de polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina mientras pueda llevarse a cabo la medida de HDL colesterol según la presente invención. Su concentración en una mezcla de reacción es preferiblemente 0,0001 a 1%, más preferiblemente 0,001 a 0,1%.

Ejemplos de los medios acuosos usados en el método para la medida de HDL colesterol de la presente invención incluyen agua desionizada, agua destilada y una disolución tampón, y se prefiere una disolución tampón. Ejemplos de los tampones usados en la disolución tampón son tampón tris(hidroximetil)aminometano, tampón fosfato, tampón borato y tampón de Good.

Ejemplos de tampón de Good incluyen ácido 2-morfolinetanosulfónico (MES), bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano (Bis-Tris), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES), ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico (DIPSO), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico (TAPSO), piperazin-N,N'-bis(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) (POPISO), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-hidroxiopropanosulfónico (HEPPSO), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico [(H)EPPS], N-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricine), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicine), ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico (CAPSO) y ácido N-ciclohexil-3-

aminopropanosulfónico (CAPS). La concentración de la disolución de tampón no está limitada específicamente mientras se ajuste para la medida, aunque es preferiblemente 0,001 a 2,0 mol/L, más preferiblemente 0,005 a 1,0 mol/L.

5 El método, reactivo y equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención se describen específicamente debajo.

(Método para la Medida de HDL Colesterol)

Una realización del método para la medida de HDL colesterol de la presente invención es como sigue.

#### Método para la medida

El HDL colesterol en una muestra puede medirse:

- 10 (1) haciendo reaccionar la muestra con colesterol esterasa y colesterol oxidasa, o colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa en un medio acuoso que comprende Compuesto (I) o Compuesto (II) y un polianión, y según la necesidad, al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina para formar peróxido de hidrógeno o coenzima reducida;
- 15 (2) midiendo el peróxido de hidrógeno formado o coenzima reducida; y
- (3) calculando la concentración de HDL colesterol en la muestra a partir del valor medido en (2) y una curva de calibrado preparada previamente.

En el presente método, la reacción de (1) se lleva a cabo, por ejemplo, a 10 a 50°C, preferiblemente 20 a 40°C durante 1 a 60 minutos, preferiblemente 2 a 30 minutos.

- 20 La cantidad del peróxido de hidrógeno formado puede medirse, por ejemplo, directamente con un electrodo de peróxido de hidrógeno y también usando un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno. El reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno es un reactivo para la conversión del peróxido de hidrógeno formado en una sustancia detectable. Ejemplos de las sustancias detectables son un tinte y luminiscencia, y se prefiere un tinte. Cuando la sustancia detectable es un tinte, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno comprende un
- 25 cromógeno tipo colorante oxidativo y una sustancia peroxidativa tal como peroxidasa. Ejemplos del cromógeno tipo colorante oxidativo son cromógenos tipo colorante oxidativo descritos debajo. Cuando la sustancia detectable es luminiscencia, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno comprende una sustancia quimioluminiscente. Ejemplos de las sustancias quimioluminiscentes son luminol, isoluminol, lucigenina y éster de acridinio.

- 30 Cuando un reactivo que comprende un cromógeno tipo colorante oxidativo y una sustancia peroxidativa tal como peroxidasa se usa como el reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno, el peróxido de hidrógeno puede determinarse sometiendo al peróxido de hidrógeno a reacción con un cromógeno tipo colorante oxidativo en presencia de una sustancia peroxidativa para formar un tinte y determinando el tinte formado. Cuando se usa un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno que comprende una sustancia quimioluminiscente, puede determinarse el peróxido de hidrógeno sometiendo al peróxido de hidrógeno a reacción con la sustancia
- 35 quimioluminiscente para formar fotones y determinando el fotón formado.

Ejemplos de los cromógenos tipo colorante oxidativo son cromógenos tipo leuco y cromógenos tipo acoplamiento oxidativo.

- 40 Un cromógeno tipo leuco es una sustancia que se convierte en un tinte por sí mismo en presencia de peróxido de hidrógeno y una sustancia peroxidativa tal como peroxidasa. Ejemplos de los cromógenos tipo leuco son 10-N-carboximetilcarbamoil-3,7-bis(dimetilamino)-10H-fenotiazina (CCAP), 10-N-metilcarbamoil-3,7-bis(dimetilamino)-10H-fenotiazina (MCDP), sal sódica de N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina (DA-64), 4,4'-bis(dimetilamino)difenilamina y bis[3-bis(4-clorofenil)metil-4-dimetilaminofenil]amina (BCMA).

Un cromógeno tipo acoplamiento oxidativo es una sustancia que forma un tinte por acoplamiento oxidativo de dos compuestos en presencia de peróxido de hidrógeno y una sustancia peroxidativa tal como peroxidasa.

- 45 Ejemplos de las combinaciones de los dos compuestos incluyen combinaciones de un acoplador y una anilina y combinaciones de un acoplador y un fenol. Ejemplos de los acopladores son 4-aminoantipirina (4-AA) e hidracina de 3-metil-2-benzotiazolinona. Ejemplos de la anilina son N-(3-sulfopropil)anilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina (TOOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina (MAOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS), N-etil-N-(3-sulfopropil)-3-metilanilina (TOPS), N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (HDAOS), N,N-dimetil-3-metilanilina, N,N-di(3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, N-etil-N-(3-sulfopropil)-3-metoxianilina, N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina; N-etil-N-(3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, N-(3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, N-etil-N-(3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metoxianilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-anilina, N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-suciniletilendiamina (EMSE), N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-acetiletilendiamina y N-etil-N-
- 50

(2-hidroxi-3-sulfopropil)-4-fluoro-3,5-dimetoxianilina (F-DAOS). Ejemplos del fenol son fenol, 4-clorofenol, 3-metilfenol y ácido 3-hidroxi-2,4,6-triyodobenzoico (HTIB).

En la medida de peróxido de hidrógeno, la concentración de una sustancia peroxidativa no está limitada específicamente mientras se ajuste para la medida. Cuando la peroxidasa se usa como la sustancia peroxidativa, su concentración es preferiblemente 1 a 100 kU/L. La concentración de un cromógeno tipo colorante oxidativo no está limitada específicamente mientras se ajuste para la medida, aunque es preferiblemente 0,01 a 10 g/L.

Ejemplos de los métodos para la medida de coenzima reducida son un método en que se mide la absorbancia de la coenzima reducida formada y un método que usa un reactivo para la medida de coenzima reducida. En el método que comprende la medida de la absorbancia de coenzima reducida, la absorbancia se mide preferiblemente a 300 a 500 nm, más preferiblemente 330 a 400 nm, particularmente preferiblemente alrededor de 340 nm. El reactivo para la medida de coenzima reducida es un reactivo para la conversión de la coenzima reducida formada en una sustancia detectable. Un ejemplo de la sustancia detectable es un tinte. Cuando la sustancia detectable es un tinte, un ejemplo del reactivo para la medida de coenzima reducida es un reactivo que comprende diaforasa, un transporte de electrones y un cromógeno tipo colorante reductor. Un ejemplo del transporte de electrones es metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazío. Cuando un reactivo que comprende diaforasa, un transporte de electrones y un cromógeno tipo colorante reductor se usa como el reactivo para la medida de coenzima reducida, la coenzima reducida puede determinarse midiendo un tinte formado mediante la conversión del cromógeno tipo colorante reductor.

Ejemplos de los cromógenos tipo colorante reductor incluyen bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1) y sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-3).

(Reactivo para la Medida de HDL Colesterol)

En una realización de la presente invención, el reactivo para la medida de HDL colesterol comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), un polianión, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno, y según la necesidad, comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.

Ejemplos preferidos del reactivo son: un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina, un polianión, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno; y un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), un polianión, albúmina, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Un ejemplo particularmente preferido es un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina, un polianión, albúmina, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

En otra realización de la presente invención, el reactivo para la medida de HDL colesterol comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), un polianión, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa y coenzima oxidada, y según la necesidad, comprende además un reactivo para la medida de coenzima reducida, y al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.

Ejemplos preferidos del reactivo son: un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina, un polianión, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida; y un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), un polianión, albúmina, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

Un ejemplo particularmente preferido es un reactivo que comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II), al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina, un polianión, albúmina, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

Ciertas realizaciones del reactivo para la medida de HDL colesterol de la presente invención se ilustran debajo, aunque no se van a construir como limitantes del alcance de la presente invención. Por conveniencia, al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II) se denomina en adelante como Compuesto A, y al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina se denomina en adelante como Compuesto B. El reactivo de la presente invención puede comprender uno o una pluralidad de Compuestos A y uno o una pluralidad de Compuestos B.

Reactivo 1

Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Reactivo 2

- 5 Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, Compuesto B, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Reactivo 3

Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa.

10 Reactivo 4

Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, Compuesto B, colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa.

Reactivo 5

- 15 Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, colesterol esterasa, coenzima oxidada, colesterol deshidrogenasa y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

Reactivo 6

Un reactivo que comprende Compuesto A, un polianión, Compuesto B, colesterol esterasa, coenzima oxidada, colesterol deshidrogenasa y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

(Equipo para la Medida de HDL Colesterol)

- 20 El reactivo para la medida de HDL colesterol de la presente invención puede conservarse, distribuirse y usarse en forma de un equipo. No hay restricción específica en cuanto a la forma de un equipo, y un equipo puede estar compuesto de dos reactivos o tres reactivos. Se prefiere un equipo compuesto de dos reactivos.

- 25 En el equipo para la medida de HDL colesterol compuesto de dos reactivos (un primer reactivo y un segundo reactivo), colesterol esterasa, y colesterol oxidasa o colesterol deshidrogenasa puede estar contenidas de forma separada en el primer reactivo y el segundo reactivo, o contenidas juntas en el segundo reactivo. Cuando están contenidas en reactivos separados, se prefiere que la colesterol esterasa esté contenida en el primer reactivo y colesterol oxidasa o colesterol deshidrogenasa esté contenida en el segundo reactivo. La coenzima oxidada usada en la medida que usa colesterol deshidrogenasa puede estar contenida en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

- 30 Al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Compuesto (I) y Compuesto (II) (Compuesto A) puede estar contenida en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo, aunque está contenida preferiblemente en el primer reactivo. Un polianión puede estar contenido en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo, aunque está contenido preferiblemente en el primer reactivo.

- 35 Al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina (Compuesto B) puede estar contenida en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

- 40 Un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno puede estar contenido en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo. Cuando el reactivo comprende un cromógeno de tipo acoplamiento oxidativo, se prefiere una realización en que los dos compuestos del mismo estén contenidos respectivamente en reactivos separados, esto es, una realización en que el reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno está contenido en ambos del primer reactivo y el segundo reactivo. Un reactivo para la medida de coenzima reducida puede estar contenido en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo, aunque está contenido preferiblemente en ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

- 45 Ciertas realizaciones del equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención se ilustran debajo, aunque no se van a construir como limitantes del alcance de la presente invención.

Equipo 1

Primer reactivo

Compuesto A, un polianión, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol oxidasa.

Equipo 2

Primer reactivo

- 5 Compuesto A, un polianión y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno, colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Equipo 3

Primer reactivo

- 10 Compuesto A, Compuesto B, un polianión, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol oxidasa.

Equipo 4

- 15 Primer reactivo

Compuesto A, Compuesto B, un polianión y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno, colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Equipo 5

- 20 Primer reactivo

Compuesto A, un polianión, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Compuesto B, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y colesterol oxidasa.

Equipo 6

- 25 Primer reactivo

Compuesto A, un polianión y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

Segundo reactivo

Compuesto B, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno, colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Equipo 7

- 30 Primer reactivo

Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Colesterol deshidrogenasa.

Equipo 8

- 35 Primer reactivo

Compuesto A, un polianión y coenzima oxidada.

Segundo reactivo

Colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 9

Primer reactivo

Compuesto A, Compuesto B, un polianión, coenzima oxidada y colesterol esterasa.

5 Segundo reactivo

Colesterol deshidrogenasa.

Equipo 10

Primer reactivo

Compuesto A, Compuesto B, un polianión y coenzima oxidada.

10 Segundo reactivo

Colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 11

Primer reactivo

Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada y colesterol esterasa.

15 Segundo reactivo

Compuesto B y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 12

Primer reactivo

Compuesto A, un polianión y coenzima oxidada.

20 Segundo reactivo

Compuesto B, colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 13

Primer reactivo

25 Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada, un reactivo para la medida de coenzima reducida y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Colesterol deshidrogenasa.

Equipo 14

Primer reactivo

30 Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de coenzima reducida, colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 15

Primer reactivo

35 Compuesto A, Compuesto B, un polianión, coenzima oxidada, un reactivo para la medida de coenzima reducida y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de coenzima reducida y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 16

Primer reactivo

Compuesto A, Compuesto B, un polianión, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

5 Segundo reactivo

Un reactivo para la medida de coenzima reducida, colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 17

Primer reactivo

10 Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada, un reactivo para la medida de coenzima reducida y colesterol esterasa.

Segundo reactivo

Compuesto B, un reactivo para la medida de coenzima reducida y colesterol deshidrogenasa.

Equipo 18

Primer reactivo

15 Compuesto A, un polianión, coenzima oxidada y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

Segundo reactivo

Compuesto B, un reactivo para la medida de coenzima reducida, colesterol esterasa y colesterol deshidrogenasa.

20 En el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención, pueden usarse los siguientes componentes que se describen en la descripción anterior del método para la medida de HDL colesterol de la presente invención: Compuesto (I), Compuesto (II), un polianión, albúmina, polioxietilentalquilamina, polioxietilentalquenilamina, colesterol esterasa, colesterol oxidasa, colesterol deshidrogenasa, coenzima oxidada, un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno y un reactivo para la medida de coenzima reducida.

25 El reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención puede comprender, según la necesidad, un medio acuoso, un estabilizador, un antiséptico, un inhibidor de interferencia, un promotor de reacción, etc. Ejemplos de los medios acuosos son los medios acuosos mencionados anteriormente. Ejemplos de los estabilizadores son ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sacarosa y cloruro de calcio. Ejemplos de los antisépticos son azida sódica y antibióticos. Un ejemplo del inhibidor de interferencia es ascorbato oxidasa para inhibir el efecto del ácido ascórbico. Ejemplos de los promotores de reacción son enzimas tales como colipasa y fosfolipasa, y sales tales como sulfato sódico y cloruro sódico.

30 El reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención pueden estar en forma seca por congelación o en un estado de estar disuelto en un medio acuoso. Cuando el HDL colesterol en una muestra se mide usando el reactivo en forma seca por congelación, el reactivo se usa después de disolverse en un medio acuoso.

35 La colesterol esterasa, colesterol oxidasa y colesterol deshidrogenasa están contenidas en el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención en una cantidad tal que la concentración de la misma en medio acuoso es preferiblemente 0,01 a 1200 U/mL, más preferiblemente 0,02 a 600 U/mL.

40 El Compuesto (I) o Compuesto (II) está contenido en el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención en cantidad tal que la concentración del mismo en un medio acuoso es preferiblemente 0,0001 a 3%, más preferiblemente 0,001 a 0,3%. Un polianión está contenido en el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención en cantidad tal que la concentración del mismo en un medio acuoso es preferiblemente 0,001 a 30%, más preferiblemente 0,01 a 3%.

La albúmina está contenida en el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención en cantidad tal que la concentración de la misma en un medio acuoso es preferiblemente 0,001 a 30%, más preferiblemente 0,01 a 3%.

45 La polioxietilentalquilamina o polioxietilentalquenilamina está contenida en el reactivo y el equipo para la medida de HDL colesterol de la presente invención en cantidad tal que la concentración de la misma en un medio acuoso es preferiblemente 0,0001 a 3%, más preferiblemente 0,001 a 0,3%.

Ciertas realizaciones específicas de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos, que no se van a construir como limitantes del alcance de la presente invención. Los reactivos y enzimas usados en los ejemplos son productos procedentes de los siguientes fabricantes. HEPES (BDH Laboratory), EMSE (Daito Chemix Corporation), sulfato sódico (Kanto Chemical Co., Inc.), Amina BB (dodecilamina; NOF Corporation), Amina Terciaria BB (dodecildimetilamina; NOF Corporation), Cation BB (cloruro de dodeciltrimetilamonio; NOF Corporation), dextrano-sulfato sódico (peso molecular: 500.000; Pharmacia), albúmina de suero bovino (BSA; Proliant Inc.), 4-aminoantipirina (Saikyo Kasei Co., Ltd.), peroxidasa (Toyobo Co., Ltd.), esterasa 43 kDa (colesterol esterasa; Amano Enzyme Inc.), CHOPE (colesterol oxidasa; Kikkoman Corporation) y BLAUNON L205 (polioxietilen-laurilamino-éter; Aoki Oil Industrial Co., Ltd.).

#### 10 Ejemplo 1 (Referencia)

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo A) y segundo reactivo (Reactivo a).

##### Primer reactivo (Reactivo A)

|    |                         |           |
|----|-------------------------|-----------|
|    | HEPES (pH 7,5)          | 10 mmol/L |
| 15 | EMSE                    | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico          | 5,0 g/L   |
|    | Amina BB                | 0,1 g/L   |
|    | Dextrano-sulfato sódico | 1,0 g/L   |

##### Segundo reactivo (Reactivo a)

|    |                   |           |
|----|-------------------|-----------|
| 20 | HEPES (pH 7,0)    | 10 mmol/L |
|    | 4-aminoantipirina | 0,3 g/L   |
|    | Peroxidasa        | 20 kU/L   |
|    | Esterasa 43 kDa   | 100 kU/L  |
|    | CHOPE             | 1,2 kU/L  |

#### 25 Ejemplo 2

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo B) y segundo reactivo (Reactivo a).

##### Primer reactivo (Reactivo B)

|    |                         |           |
|----|-------------------------|-----------|
|    | HEPES (pH 7,5)          | 10 mmol/L |
| 30 | EMSE                    | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico          | 5,0 g/L   |
|    | Amina terciaria BB      | 0,03 g/L  |
|    | Dextrano-sulfato sódico | 1,0 g/L   |

##### Segundo reactivo (Reactivo a)

|    |                   |           |
|----|-------------------|-----------|
| 35 | HEPES (pH 7,0)    | 10 mmol/L |
|    | 4-aminoantipirina | 0,3 g/L   |
|    | Peroxidasa        | 20 kU/L   |
|    | Esterasa 43 kDa   | 100 kU/L  |
|    | CHOPE             | 1,2 kU/L  |

40

### Ejemplo 3

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo C) y segundo reactivo (Reactivo a).

#### Primer reactivo (Reactivo C)

|    |                               |           |
|----|-------------------------------|-----------|
| 5  | HEPES (pH 7,5)                | 10 mmol/L |
|    | EMSE                          | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico                | 5,0 g/L   |
|    | Catión BB                     | 0,14 g/L  |
|    | Dextrano-sulfato sódico       | 1,0 g/L   |
| 10 | Segundo reactivo (Reactivo a) |           |
|    | HEPES (pH 7,0)                | 10 mmol/L |
|    | 4-aminoantipirina             | 0,3 g/L   |
|    | Peroxidasa                    | 20 kU/L   |
|    | Esterasa 43 kDa               | 100 kU/L  |
| 15 | CHOPE                         | 1,2 kU/L  |

### Ejemplo 4

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo D) y segundo reactivo (Reactivo a).

#### Primer reactivo (Reactivo D)

|    |                               |           |
|----|-------------------------------|-----------|
| 20 | HEPES (pH 7,5)                | 10 mmol/L |
|    | EMSE                          | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico                | 5,0 g/L   |
|    | Catión BB                     | 0,14 g/L  |
|    | Dextrano-sulfato sódico       | 1,0 g/L   |
| 25 | BSA                           | 2,0 g/L   |
|    | Segundo reactivo (Reactivo a) |           |
|    | HEPES (pH 7,0)                | 10 mmol/L |
|    | 4-aminoantipirina             | 0,3 g/L   |
|    | Peroxidasa                    | 20 kU/L   |
| 30 | Esterasa 43 kDa               | 100 kU/L  |
|    | CHOPE                         | 1,2 kU/L  |

### Ejemplo 5

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo C) y segundo reactivo (Reactivo b).

|    |                              |           |
|----|------------------------------|-----------|
| 35 | Primer reactivo (Reactivo C) |           |
|    | HEPES (pH 7,5)               | 10 mmol/L |
|    | EMSE                         | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico               | 5,0 g/L   |

|   |                               |           |
|---|-------------------------------|-----------|
|   | Catión BB                     | 0,14 g/L  |
|   | Dextrano-sulfato sódico       | 1,0 g/L   |
|   | Segundo reactivo (Reactivo b) |           |
|   | HEPES (pH 7,0)                | 10 mmol/L |
| 5 | 4-aminoantipirina             | 0,3 g/L   |
|   | Peroxidasa                    | 20 kU/L   |
|   | Esterasa 43 kDa               | 100 kU/L  |
|   | CHOPE                         | 1,2 kU/L  |
|   | BLAUNON L205                  | 0,16 g/L  |

10 Ejemplo 6

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo D) y segundo reactivo (Reactivo b).

Primer reactivo (Reactivo D)

|    |                         |           |
|----|-------------------------|-----------|
|    | HEPES (pH 7,5)          | 10 mmol/L |
| 15 | EMSE                    | 0,3 g/L   |
|    | Sulfato sódico          | 5,0 g/L   |
|    | Catión BB               | 0,14 g/L  |
|    | Dextrano-sulfato sódico | 1,0 g/L   |
|    | BSA                     | 2,0 g/L   |

20 Segundo reactivo (Reactivo b)

|    |                   |           |
|----|-------------------|-----------|
|    | HEPES (pH 7,0)    | 10 mmol/L |
|    | 4-aminoantipirina | 0,3 g/L   |
|    | Peroxidasa        | 20 kU/L   |
|    | Esterasa 43 kDa   | 100 kU/L  |
| 25 | CHOPE             | 1,2 kU/L  |
|    | BLAUNON L205      | 0,16 g/L  |

Ejemplo Comparativo 1

Se preparó un equipo para la medida de HDL colesterol que comprende el siguiente primer reactivo (Reactivo E) y segundo reactivo (Reactivo a).

30 Primer reactivo (Reactivo E)

|  |                         |           |
|--|-------------------------|-----------|
|  | HEPES (pH 7,5)          | 10 mmol/L |
|  | EMSE                    | 0,3 g/L   |
|  | Sulfato sódico          | 5,0 g/L   |
|  | Dextrano-sulfato sódico | 1,0 g/L   |

35 Segundo reactivo (Reactivo a)

|  |                   |           |
|--|-------------------|-----------|
|  | HEPES (pH 7,0)    | 10 mmol/L |
|  | 4-aminoantipirina | 0,3 g/L   |

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Peroxidasa      | 20 kU/L  |
| Esterasa 43 kDa | 100 kU/L |
| CHOPE           | 1,2 kU/L |

#### Ejemplo 7 (Referencia)

5 La medida de HDL colesterol en suero humano (30 muestras) se llevó a cabo usando el equipo del Ejemplo 1.

##### (1) Preparación de una Curva de Calibrado

Una curva de calibrado que muestra la relación entre la concentración de HDL colesterol y “la absorbancia” se preparó usando una solución salina fisiológica (concentración de HDL colesterol: 0,0 mg/dL) y un suero (concentración de HDL colesterol: 80,0 mg/dL) como disoluciones estándar, el equipo del Ejemplo 1, y el autoanalizador Hitachi-7170S.

“La absorbancia” en este documento se refiere al valor obtenido en base a las dos absorbancias (E1 y E2) medidas en la siguiente reacción y restando E1 de E2.

A una célula de reacción se añadieron una disolución estándar (2 µL) y el primer reactivo (0,15 mL), y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. La absorbancia de la mezcla de reacción (E1) se midió a una longitud de onda principal de 600 nm y una sub-longitud de onda de 700 nm. Entonces, se añadió el segundo reactivo (0,05 mL) a la mezcla de reacción, seguido por incubación adicional a 37°C durante 5 minutos, y la absorbancia de la mezcla de reacción (E2) se midió a una longitud de onda principal de 600 nm y una sub-longitud de onda de 700 nm.

(2) Cálculo de “la Absorbancia” de Muestras de Suero Humano Obtenida por la Reacción de las Muestras con el Equipo del Ejemplo 1

“La absorbancia” de las muestras se calculó de la misma manera que en el método de cálculo de “la absorbancia” de (1), excepto en que las muestras de suero humano se usaron en lugar de las disoluciones estándar usadas en la preparación de la curva de calibrado de (1).

##### (3) Medida de la Concentración de HDL Colesterol en Muestras de Suero Humano

25 La concentración de HDL colesterol en cada una de las muestras se midió a partir de “la absorbancia” calculada en (2) y la curva de calibrado preparada en (1).

#### Ejemplo 8

30 El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo del Ejemplo 2 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

#### Ejemplo 9

El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo del Ejemplo 3 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

#### Ejemplo 10

El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo del Ejemplo 4 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

#### Ejemplo 11

40 El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo del Ejemplo 5 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

#### Ejemplo 12

45 El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo del Ejemplo 6 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

Ejemplo Comparativo 2

El HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) se midió en el autoanalizador Hitachi-7170 de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que el equipo de Ejemplo Comparativo 1 se usó en lugar del equipo del Ejemplo 1.

- 5 Entonces, el HDL colesterol en cada una de las muestras de suero humano (30 muestras) usado en la medida de los Ejemplos 7 a 12 y el Ejemplo Comparativo 2 se midió por el método DCM (Método de Comparación Indicada) descrita en Clinical Chemistry, Vol. 45, núm. 10 (1999), y los valores de medida se compararon con los obtenidos en los Ejemplos y el Ejemplo Comparativo. Los coeficientes de correlación entre cada una de las medidas de los Ejemplos y el Ejemplo Comparativo y la medida por el método DCM, se muestran en la Tabla 1.

10 Tabla 1

| método para la medida | Equipo de medida      |                  | Coeficiente de correlación |
|-----------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|
|                       | Primer reactivo       | Segundo reactivo |                            |
| Ejemplo Comparativo 2 | Ejemplo Comparativo 1 |                  | 0,191                      |
|                       | Reactivo E            | Reactivo a       |                            |
| Ejemplo 7             | Ejemplo 1             |                  | 0,792                      |
|                       | Reactivo A            | Reactivo a       |                            |
| Ejemplo 8             | Ejemplo 2             |                  | 0,892                      |
|                       | Reactivo B            | Reactivo a       |                            |
| Ejemplo 9             | Ejemplo 3             |                  | 0,826                      |
|                       | Reactivo C            | Reactivo a       |                            |
| Ejemplo 10            | Ejemplo 4             |                  | 0,973                      |
|                       | Reactivo D            | Reactivo a       |                            |
| Ejemplo 11            | Ejemplo 5             |                  | 0,900                      |
|                       | Reactivo C            | Reactivo b       |                            |
| Ejemplo 12            | Ejemplo 6             |                  | 0,991                      |
|                       | Reactivo D            | Reactivo b       |                            |

- 15 A partir de la comparación del Ejemplo Comparativo 2 y los Ejemplos 7 a 12 mostrados en la Tabla 1, se reveló que una buena correlación con DCM se reconoció en la medida usando los equipos que comprenden Compuesto (I) o Compuesto (II) y un polianión. Se reveló además de la comparación del Ejemplo 9 y los Ejemplos 10 a 12 que el coeficiente de correlación con DCM se mejoró permitiendo a la albúmina o polioxietilentalquilamina estar presentes además del Compuesto (I) o Compuesto (II) y un polianión.

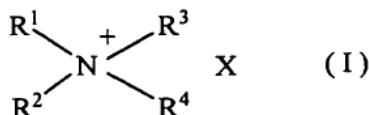
Aplicabilidad Industrial

La presente invención proporciona un método, un reactivo y un equipo para la medida de HDL colesterol que son útiles para la diagnosis de enfermedades tales como arteriosclerosis.

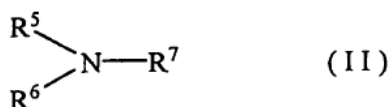
## REIVINDICACIONES

1. Un método para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad en una muestra, que comprende:

hacer reaccionar la muestra con i) colesterol esterasa y colesterol oxidasa o ii) colesterol esterasa, coenzima oxidada y colesterol deshidrogenasa en un medio acuoso que comprende; al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):



en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión, y sustancias representadas por la fórmula general (II):

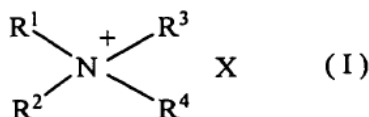


en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo; y un polianión; y medir el peróxido de hidrógeno formado o coenzima reducida.

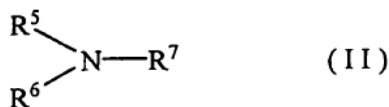
2. El método según la Reivindicación 1, en donde el medio acuoso comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.

3. El método según la Reivindicación 1 o 2, en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.

4. Un reactivo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

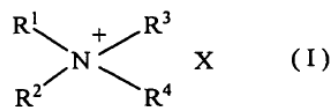


en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión, y sustancias representadas por la fórmula general (II):

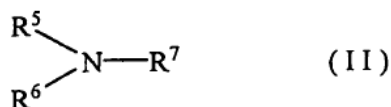


en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo; un polianión; colesterol esterasa; colesterol oxidasa y un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno.

5. Un reactivo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

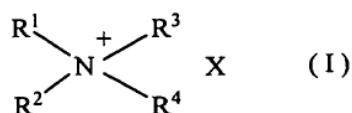


en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión, y sustancias representadas por la fórmula general (II):

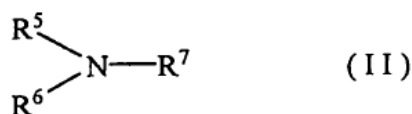


en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo; un polianión; colesterol esterasa; colesterol deshidrogenasa y coenzima oxidada.

6. El reactivo según la Reivindicación 5, que comprende además un reactivo para la medida de coenzima reducida.
7. El reactivo según cualquiera de las Reivindicaciones 4 o 6, que comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquenilamina.
8. El reactivo según cualquiera de las Reivindicaciones 4 o 7, en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.
9. Un equipo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende un primer reactivo y un segundo reactivo, que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):

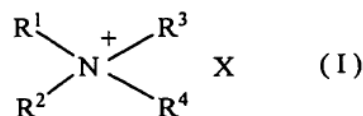


en donde  $\text{R}^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $\text{R}^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquenilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $\text{R}^3$  y  $\text{R}^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión, y sustancias representadas por la fórmula general (II):

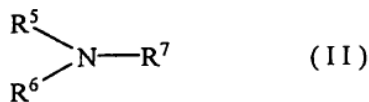


en donde  $\text{R}^5$  representa un grupo alquilo o grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $\text{R}^6$  y  $\text{R}^7$  representa cada uno un grupo metilo; y un polianión en el primer reactivo; colesterol oxidasa en el segundo reactivo; un reactivo para la medida de peróxido de hidrógeno en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo; y colesterol esterasa en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

10. Un equipo para la medida de colesterol en lipoproteína de alta densidad que comprende un primer reactivo y un segundo reactivo, que comprende: al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sustancias representadas por la fórmula general (I):



en donde  $R^1$  representa un grupo alquilo o grupo alquénilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono;  $R^2$  representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 30 átomos de carbono o grupo alquénilo que tiene 2 a 30 átomos de carbono;  $R^3$  y  $R^4$  representa cada uno un grupo metilo; y X representa un anión; y sustancias representadas por la fórmula general (II):



5

en donde  $R^5$  representa grupo alquilo o grupo alquénilo de cadena lineal o ramificada que tiene 10 a 18 átomos de carbono; y  $R^6$  y  $R^7$  representa cada uno un grupo metilo; y un polianión en el primer reactivo; colesterol deshidrogenasa en el segundo reactivo; coenzima oxidada en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo; y colesterol esterasa en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

10 11. El equipo según la Reivindicación 10, que comprende además un reactivo para la medida de coenzima reducida en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

12. El equipo según cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 11, que comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en albúmina, polioxietilentalquilamina y polioxietilentalquénilamina en cualquiera o ambos del primer reactivo y el segundo reactivo.

15 13. El equipo según cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 12, en donde el polianión es sulfato de dextrano o una sal del mismo.