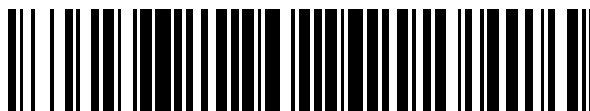


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 236**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/60** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**C12Q 1/28** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05727370 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1739189**

54 Título: **Procedimiento de multiquantificación del colesterol de lipoproteína de baja densidad**

30 Prioridad:

**31.03.2004 JP 2004106006**

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

**20.02.2013**

73 Titular/es:

**DENKA SEIKEN CO., LTD. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi Muromachi 2-chome, Chuo-ku  
Tokyo 103-8338, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMOTO, KEIKO y  
MATSUI, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ MARCHENA, Juan Luis**

**ES 2 396 236 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento de multicuantificación del colesterol de lipoproteína de baja densidad

## 5 Campo Técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir simultáneamente el colesterol de la lipoproteína y el colesterol total como análisis en muestras biológicas, y en particular a un procedimiento que hace posible estabilizar reactivos líquidos utilizados para la medición.

10

Técnica Anterior

15

La lipoproteína de baja densidad (denominada aquí en adelante "LDL") juega un papel principal en el transporte del colesterol en la sangre y, en particular, el colesterol depositado en las paredes de los vasos sanguíneos en la arterioesclerosis se deriva principalmente de la LDL. Un aumento en el colesterol LDL es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades arterioescleróticas, y su medición selectiva es clínicamente útil. La medición del colesterol total incluye la medición del colesterol en todas las lipoproteínas, tales como los quilomicrones (CM), la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), LDL, y la lipoproteína de alta densidad (HDL), y es aún un elemento principal de la prueba de lípidos.

20

Los procedimientos habituales para medir el colesterol LDL incluyen un procedimiento de medición a partir de dos operaciones de fraccionamiento y determinación del colesterol y un procedimiento de medición mediante el cálculo basado en los valores del colesterol total, HDL, colesterol, y triglicéridos, según la ecuación de Friedewald.

25

Para el fraccionamiento, existen procedimientos tales como el ultracentrifugado, la precipitación, y la técnica inmunológica. Estos procedimientos requieren un proceso de tratamiento de una muestra mediante el ultracentrifugado o filtrado, y ha sido difícil su uso generalizado en las instalaciones de ensayos de laboratorio debido a su conveniencia y rentabilidad. El procedimiento de cálculo basado en la ecuación Friedewald tiene un uso limitado, y va asociado a problemas de exactitud debido a que no tienen en cuenta las diferencias individuales.

30

Recientemente se ha informado un procedimiento de medición del colesterol LDL que no requiere el fraccionamiento (Publicación de Patente JP (Kokai) número 11-318496 A (1999)), y actualmente se está utilizando en instalaciones de ensayo como reactivo de ensayo de laboratorio. Este procedimiento comprende un primer paso en el cual se elimina selectivamente en una muestra el colesterol en las lipoproteínas distintas a LDL ("eliminado" significa que se degrada el colesterol tipo éster y el producto de degradación se hace indetectable en un segundo paso), y un segundo paso en el cual se mide el colesterol LDL.

35

40

A pesar del hecho de que el reactivo para la medición de colesterol LDL descrito anteriormente es un reactivo útil clínicamente, la medición habitual del colesterol total se realiza muy a menudo, y el reactivo no ha pasado a tener un amplio uso debido a que los niveles de colesterol LDL pueden determinarse utilizándose la ecuación Friedewald, etc. No obstante, existe un problema en los niveles de colesterol LDL determinados por la ecuación Friedewald tal como se describe anteriormente, y la medición exacta de los niveles de colesterol es clínicamente importante. Así pues, se ha deseado mejorar aún más el reactivo, permitiendo de ese modo que se utilice habitualmente el reactivo para la medición del colesterol LDL de elevada importancia clínica.

45

50

Por otro lado, se describió un procedimiento en el cual se miden secuencialmente mediante una única medición el colesterol HDL y el colesterol total, así como el colesterol LDL y el colesterol total (Publicación de Patente JP 2003-501630 A). En este procedimiento, se coloca en un tubo una muestra, permitiendo que forme un complejo entre el colesterol no HDL de la muestra y un anticuerpo anti-apoB, midiéndose la lipoproteína en la forma no complexada, concretamente, HDL. Después de disocia el complejo con un surfactante, y se mide enzimáticamente el colesterol no HDL restante. Sumando los dos valores de medición, se encuentra el nivel de colesterol total. En el caso del colesterol LDL, se utiliza un procedimiento similar de reacción, en el cual se usa un anticuerpo anti-apoA-I o anti-apoA-II, en lugar del anticuerpo anti-apoB en el momento de formación del complejo. El colesterol HDL, colesterol LDL y el colesterol total se suelen medir normalmente en revisiones médicas y similares, y ha sido importante la medición simultánea del colesterol HDL, colesterol LDL y colesterol total.

55

Descripción de la invención

60

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de estabilización para eliminar el desarrollo espontáneo del color de un reactivo que hace posible medir simultáneamente el colesterol LDL y el colesterol total en una única medición. Este procedimiento es útil como procedimiento múltiple de medición en el cual pueden obtenerse los valores cuantificados de una serie de elementos en una única medición.

A la luz de la importancia que ha tomado recientemente la medición exacta del colesterol LDL, y la importancia conocida habitualmente de la medición del colesterol total, los inventores de la presente estudiaron diligentemente para establecer un sistema de medición simultánea del colesterol LDL y el colesterol total.

5 Los inventores de la presente desarrollaron previamente un procedimiento capaz de medir simultáneamente el colesterol LDL y el colesterol total (Solicitud de Patente Japonesa número 2002-362970, WO 2004/055204). Este procedimiento comprende permitir que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre las lipoproteínas en presencia de un surfactante que actúe sobre lipoproteínas distintas a LDL, midiéndose el colesterol de las lipoproteínas distintas a LDL, convertir el peróxido de hidrógeno generado en un colorante de quinona, añadir posteriormente un surfactante que actúa al menos sobre la LDL, permitir que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre la LDL restante y medir el colesterol LDL, convirtiendo el peróxido de hidrógeno generado en colorante de quinona, donde puede calcularse el valor de colesterol total sumándose los dos valores de medición anteriores. Este procedimiento fue efectivo como procedimiento de medición múltiple en el cual pueden obtenerse en una única medición los valores cuantificados de una serie de elementos. No obstante, en este procedimiento los componentes para producir el colorante de quinona están presentes en un primer reactivo en un estado de reactivo líquido para su uso y, en consecuencia, el reactivo se oxida con el aire, provocando un problema de desarrollo espontáneo de color, por lo cual carece de estabilidad como reactivo líquido.

20 Así pues, los inventores de la presente estudiaron diligentemente la estabilización del reactivo que hace posible medir simultáneamente el colesterol LDL y el colesterol total en una única medición, y encontraron un procedimiento en el cual el colesterol LDL y el colesterol total se miden con exactitud suprimiéndose el desarrollo espontáneo de color en el reactivo para su uso en un procedimiento de medición simultánea del colesterol LDL y el colesterol total, en una única medición.

25 En el procedimiento anterior de medición, los procedimientos de la reacción enzimática de colesterol en lipoproteínas distintas a LDL en una muestra para la detección del colesterol se efectuaban en el primer paso. No obstante, en el presente procedimiento de medición según la reivindicación 1 se mejoraron los procedimientos a fin de permitir la detección de la reacción enzimática del colesterol en las lipoproteínas distintas a LDL, que tiene lugar en el primer paso, en una etapa temprana del segundo paso, y la detección de la reacción enzimática del colesterol LDL después de las siguientes etapas.

35 La Figura 1 describe el principio de la invención. Tal como se ilustra en la Figura 1, el procedimiento de la presente invención comprende dos pasos. En el primer paso, en una muestra se genera el peróxido de hidrógeno mediante una reacción basada en el colesterol de lipoproteínas distintas a LDL. En el segundo paso, tiene lugar un cambio en la absorbancia de la solución de la reacción debido al peróxido de hidrógeno generado en el primer paso, ocurriendo posteriormente una reacción basada en el colesterol en la LDL, y se mide el cambio en la absorbancia de la solución de reacción debido a dicha reacción. La cantidad del cambio total en la absorbancia en el segundo paso corresponde al colesterol total, y la cantidad de cambio en la absorbancia en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso corresponde a la cantidad de colesterol LDL. Cambiando las condiciones analíticas en el momento de medir este cambio en la absorbancia en un analizador automático, puede efectuarse simultáneamente la medición de múltiples elementos en una única medición.

40 En el procedimiento habitual de medición múltiple, en un primer reactivo utilizado en el primer paso de la medición se integraban una serie de compuestos reactivos que intervenían en la formación del colorante de quinona. Por otro lado, en el presente procedimiento, dado que el colorante de quinona se forma únicamente en el segundo paso, la variedad de compuestos reactivos que intervienen en la formación del tinta de quinona pudieron separarse en un primer reactivo utilizado en el primer paso y en un segundo reactivo utilizado en el segundo paso, y pudo eliminarse el desarrollo espontáneo de color provocado por la oxidación del reactivo con el aire. Dado que se hizo posible la eliminación del desarrollo espontáneo de color en el reactivo, pudo estabilizarse el mismo, posibilitándose así la medición precisa del colesterol.

45 Cuando el procedimiento de la presente invención se realiza utilizándose una analizador automático en el cual pueden fijarse varias condiciones de medición, una condición de medición para fijar el analizador en el análisis de múltiples elementos es que el colesterol total se mida a partir de la diferencia de absorbancias entre dos puntos después de la adición del segundo reactivo (en el momento después de un rápido cambio en la absorbancia, después de añadir el segundo reactivo, y en el momento final de la reacción) en el segundo paso.

Así, la descripción es la siguiente:

60 [1] Procedimiento para medir *in vitro* el colesterol en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total en una muestra biológica mediante una única medición, que comprende:

un primer paso de tratamiento de las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad en la muestra biológica para generar peróxido de hidrógeno; y

un segundo paso para convertir el peróxido de hidrógeno obtenido en el primer paso en un colorante de quinona, y tratar la lipoproteína de baja densidad restante, y convertir el peróxido de hidrógeno generado en un colorante de quinona,

5 [2] Procedimiento según [1] en el que los compuestos reactivos que intervienen en la formación del colorante de quinona comprenden 4-aminoantipirina, un compuesto donante de hidrógeno fenólico, y peroxidasa; añadiéndose en el primer paso cualquiera de 4-aminoantipirina o el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico; y añadiéndose en el segundo paso los compuestos reactivos que no se añadieron en el primer paso;

10 [3] Procedimiento según [1] o [2], en el que se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad de la muestra biológica en presencia de un surfactante que actúa sobre las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad para generar peróxido de hidrógeno; y se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre la lipoproteína de baja densidad de la muestra biológica en presencia de un surfactante que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad para generar peróxido de hidrógeno en el segundo paso;

15 [4] Procedimiento según cualquiera de [1] a [2], en el que en el segundo paso, el peróxido de hidrógeno obtenido en el primer paso se convierte en colorante de quinona; se añade al sistema de medición el surfactante que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad; se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre la lipoproteína de baja densidad restante en el sistema de medición; y se mide el peróxido de hidrógeno generado, convirtiéndolo en colorante de quinona;

20 [5] Procedimiento según cualquiera de [1] [2], en el que las cantidades de colesterol presentes en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total presente en la muestra biológica se miden simultáneamente basándose en dos valores, donde la cantidad total de cambio en la absorbancia en el segundo paso sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol total presente, y la cantidad de cambio en la absorbancia en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso, sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol presente en la lipoproteína de baja densidad;

25 [6] Procedimiento según cualquiera de [1] a [5], en el que el cambio en la absorbancia en el segundo paso muestra un aumento bifásico en el que existe un rápido aumento justo después de añadir un segundo reactivo y un aumento moderado posterior; y se mide el colesterol en la lipoproteína de baja densidad a partir de la cantidad del último cambio moderado en la absorbancia;

30 [7] Procedimiento según cualquiera de [1] a [6], en el que se mide el colesterol a partir de la cantidad total de cambio en la absorbancia en el segundo paso;

35 [8] Procedimiento según cualquiera de [1] a [7], en el que el análisis se efectúa mediante medición según diferentes condiciones de medición, utilizándose un analizador automático para el ensayo químico clínico;

40 [9] Procedimiento para estabilizar un reactivo líquido en un procedimiento de medición del colesterol en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total de una muestra biológica mediante una única medición que incluye un primer paso de añadir un primer reactivo para tratar las lipoproteínas distintas de lipoproteína de baja densidad en la muestra biológica para generar peróxido de hidrógeno, y un segundo paso de añadir un segundo reactivo para convertir el peróxido de hidrógeno generado en el primer paso en un colorante de quinona, y tratar la lipoproteína de baja densidad restante a fin de generar peróxido de hidrógeno y convertirlo en colorante de quinona, que comprende:

45 que se contengan en el primer reactivo añadido en el primer paso 4-aminoantipirina o un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico que es un compuesto reactivo que interviene en la formación de un colorante de quinona; y

50 que se contengan en el segundo reactivo compuestos reactivos no contenidos en el primer reactivo, entre 4-aminoantipirina, el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, y peroxidasa;

[10] Procedimiento de estabilización de un reactivo líquido en un procedimiento según cualquiera de [1] a [8], que comprende:

55 que se contengan en el primer reactivo añadido en el primer paso 4-aminoantipirina o un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, que es un compuesto reactivo que interviene en la formación de un colorante de quinona; y

60 que se contengan en el segundo reactivo compuestos reactivos no contenidos en el primer reactivo, entre 4-aminoantipirina, el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, y peroxidasa;

[11] Procedimiento según [9] o [10], en el que en el primer reactivo se contiene también un surfactante que actúa sobre las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad, esterasa de colesterol y oxidasa de colesterol; y en el segundo reactivo se contiene un surfactante que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad;

65

[12] Kit para efectuar un procedimiento de medición del colesterol en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total de una muestra biológica mediante una única medición, que incluye un primer paso de añadir un primer reactivo para tratar lipoproteínas distintas de lipoproteína de baja densidad en la muestra biológica para generar peróxido de hidrógeno, y un segundo paso de añadir un segundo reactivo para convertir el peróxido de hidrógeno generado en el primer paso en un colorante de quinona, y tratar la lipoproteína de baja densidad restante a fin de generar peróxido de hidrógeno y convertirlo en colorante de quinona, que comprende:

que se contengan en el primer reactivo 4-aminoantipirina o un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico que es un compuesto reactivo que interviene en la formación de un colorante de quinona; y

que se contengan en el segundo reactivo compuestos reactivos no contenidos en el primer reactivo, entre 4-aminoantipirina, el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, y peroxidasa;

[13] Kit según [12], en el que en el primer reactivo se contiene también un surfactante que actúa sobre las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad, esterasa de colesterol y oxidasa de colesterol; y en el segundo reactivo se contiene un surfactante que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad;

Mediante el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1, el reactivo utilizado en el procedimiento para medir simultáneamente el colesterol LDL y el colesterol total en una única medición puede mantenerse establemente en estado líquido de modo que no tenga lugar el desarrollo espontáneo de color debido a la oxidación con el aire. Además, el colesterol LDL y el colesterol total pueden medirse con exactitud en una única medición.

#### Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un esquema que muestra el principio de un procedimiento de medición múltiple de la presente invención;

La Figura 2 es un esquema que muestra la correlación entre los niveles de colesterol en la LDL medidos por el procedimiento de medición múltiple de la presente invención y los niveles de colesterol en la LDL medidos independientemente; y

La Figura 3 es un esquema que muestra la correlación entre los niveles de colesterol total medidos por el procedimiento de medición múltiple de la presente invención y los niveles de colesterol total medidos independientemente.

#### Mejor Modo para Desarrollar la Invención

La presente invención es un procedimiento según la reivindicación 1 para medir simultáneamente el colesterol en la LDL y el colesterol total de una muestra biológica en la cual se miden el colesterol en la LDL y el colesterol total de una muestra biológica mediante una única medición utilizando las absorbancias de un colorante formado por tratamiento de las lipoproteínas como indicador. Además, la presente invención es un procedimiento según la reivindicación 1 en el cual se mejora la estabilidad de un reactivo o compuesto reactivo, impidiéndose el desarrollo espontáneo del color del reactivo provocado por oxidación por aire y pueden obtenerse resultados precisos incluso cuando se deja el reactivo un largo periodo de tiempo. En el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1, se genera el peróxido de hidrógeno tratándose las lipoproteínas de una muestra biológica, convirtiéndose después el peróxido de hidrógeno en colorante de quinona, y midiéndose la absorbancia del colorante de quinona, midiéndose así el colesterol que se contiene en las lipoproteínas de la muestra biológica. El procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1 comprende un primer paso en el que las lipoproteínas distintas a LDL de una muestra biológica se tratan para generar peróxido de hidrógeno y un segundo paso en el que el peróxido de hidrógeno obtenido en el primer paso se convierte en colorante de quinona. Así pues, en el procedimiento de la presente invención las lipoproteínas distintas a LDL y la LDL se tratan en diferentes pasos, respectivamente, y la conversión del peróxido de hidrógeno generado por los tratamientos en colorante de quinona y la detección del colorante de quinona formado, se efectúan en un único paso. Aquí, el tratamiento de las lipoproteínas se refiere a lipoproteínas con un surfactante y enzimas. Cuando las lipoproteínas se tratan con un surfactante, se libera el colesterol de las lipoproteínas. Cuando el colesterol se trata con enzimas (esterasa de colesterol y oxidasa de colesterol) se genera peróxido de hidrógeno. Así, el tratamiento de las lipoproteínas incluye una serie de tratamientos en los cuales el colesterol se libera de las lipoproteínas y después se genera el peróxido de hidrógeno a partir del colesterol. Además, el tratamiento del colesterol se refiere a generar peróxido de hidrógeno mediante el tratamiento del colesterol liberado con las enzimas. El peróxido de hidrógeno generado se convierte posteriormente en el colorante de quinona con peroxidasa. En la presente invención, "reactivo" se refiere a un elemento que contiene compuestos reactivos, y "compuestos reactivos" se refiere a sustancias tales como el surfactante y la enzima que constituyen el reactivo.

En el primer paso, se tratan las lipoproteínas distintas a LDL de una muestra biológica con un surfactante y enzimas para generar peróxido de hidrógeno. Dado que un conjunto de compuestos reactivos que intervienen en la generación del colorante de quinona no se contiene en un primer reactivo utilizado en el primer paso, el peróxido de hidrógeno generado no se convierte en el colorante de quinona. En el segundo paso, se trata la LDL con un surfactante y enzimas, y se genera de nuevo el peróxido de hidrógeno nuevamente por la reacción. Cuando se añade al sistema de medición un segundo reactivo utilizado en el segundo paso, el conjunto de compuestos reactivos que intervienen en la generación del colorante de quinona pasan a contenerse en el sistema de medición, con lo cual se trata la lipoproteína de la LDL y, al mismo tiempo, tiene lugar la reacción para convertir en colorante de quinona el peróxido de hidrógeno presente en el sistema de medición. Cuando se inicia el segundo paso, el peróxido de hidrógeno generado del colesterol en las lipoproteínas distinto a LDL que se ha formado en el primer paso está presente en el sistema de medición, y el peróxido de hidrógeno se convierte en el colorante de quinona al mismo tiempo que se inicia el segundo paso. Por otro lado, el peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento de la LDL en el segundo paso se convierte en el colorante de quinona al mismo tiempo que se genera. El peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento de la LDL en el segundo paso aumenta con el tiempo a medida que avanza el tratamiento del colesterol con las enzimas. Dado que el peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento del LDL en el segundo paso se convierte en colorante de quinona, el colorante de quinona aumenta también con el tiempo. El cambio en la absorbancia debido al colorante de quinona justo después del inicio del segundo paso refleja la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el primer paso, es decir, la cantidad de colesterol presente en las lipoproteínas distintas a LDL. El cambio en la absorbancia debido al colorante de quinona cuando finaliza el segundo paso refleja la cantidad de peróxido de hidrógeno generada en el primer paso, y una cantidad adicional de peróxido de hidrógeno generada en el segundo paso, es decir la cantidad de colesterol presente en la LDL. Dicho de otro modo, el cambio en la absorbancia en el segundo paso sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol total presente en una muestra biológica, y un cambio en la absorbancia en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generada en el segundo paso, sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol presente en la LDL. Basándose en estos dos cambios en la absorbancia, es decir, el cambio total en la absorbancia en el segundo paso y el cambio en la absorbancia en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso, puede medirse al mismo tiempo el colesterol LDL y el colesterol total presentes en la muestra biológica. En el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1, se utilizan diferentes reactivos en el primer paso y el segundo paso. Por medio de un complicado agrupamiento de los componentes de los dos reactivos, principalmente los compuestos reactivos que intervienen en la formación del colorante de quinona, puede obtenerse la estabilización de los reactivos propiamente dichos y obtenerse resultados precisos en el procedimiento de medición del colesterol. Los compuestos reactivos se refieren a los componentes de un compuesto reactivo para efectuar una reacción química, tales como reactivos que participan en una reacción química específica o solución tampón, o ambos. En el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1, puede obtenerse la estabilización de un reactivo líquido suministrado en líquido. El peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento del colesterol forma una quinona coloreada (colorante de quinona) en presencia de peroxidasa, 4-aminoantipirina, y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico. Cuando la peroxidasa, 4-aminoantipirina, y el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico están presentes en un reactivo en estado líquido mezclado, el colorante de quinona se forma con el tiempo debido a un efecto de oxidación por el aire, incluso cuando no está presente el peróxido de hidrógeno, dando como resultado el desarrollo espontáneo de color del reactivo. En consecuencia, no puede mantenerse la estabilidad del reactivo o el compuesto reactivo para la medición del colesterol, y tampoco puede garantizarse la exactitud de la medición del colesterol. En la presente invención, no se permite que todos de la peroxidasa, 4-aminoantipirina, y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico estén presentes simultáneamente en uno de los dos reactivos. Únicamente después de que se añadan finalmente los dos reactivos al sistema de medición, se permite que se añadan al sistema tanto la peroxidasa, 4-aminoantipirina, y el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico.

El colesterol que se contiene en las lipoproteínas que es el objetivo de medición del procedimiento de la presente invención incluye colesterol éster (colesterol-éster) y colesterol libre. Cuando en la presente memoria se hace referencia únicamente a "colesterol", el término incluye a ambos.

Las muestras biológicas sometidas al procedimiento de la presente invención son las que pueden contener lipoproteínas tales como HDL, LDL, VLDL, y CM e incluyen, por **ejemplo**, fluidos corporales tales como sangre, suero, y plasma, y fluidos diluidos de los mismos, que se obtienen del cuerpo humano o animal. "Lipoproteínas distintas a LDL" se refiere a HDL, VLDL, CM y similares.

"Valor de medición que refleja la cantidad de colesterol total presente" o "valor de medición que refleja la cantidad de colesterol presente en LDL" indica un valor de medición obtenido cuando se determina la concentración o cantidad absoluta de colesterol presente en las lipoproteínas de una muestra biológica. El procedimiento de medición no se limita en particular, y cuando se obtiene finalmente un valor que corresponde a la concentración o cantidad absoluta de colesterol presente en lipoproteínas de una muestra biológica, por **ejemplo**, un valor proporcional o inversamente proporcional, combinándose una serie de medidas, este valor se denomina valor de medición. Por **ejemplo**, un **ejemplo** de los valores de medición es la absorbancia debida a un compuesto formado por una serie de tratamientos del colesterol en lipoproteínas con agentes específicos. El valor de medición en este caso incluye una cantidad absoluta, así como una cantidad de cambio.

- Por **ejemplo**, el cambio en la absorbancia del segundo paso que se ilustra en la Figura 1 es en el que la absorbancia derivada de la conversión a colorante de quinona del peróxido de hidrógeno, generado por el tratamiento en el segundo paso, se añade a la absorbancia derivada de convertir en colorante de quinona el peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento en el primer paso. En la Figura 1, la absorbancia que refleja la cantidad de colesterol presente en LDL se obtiene de la cantidad de cambio en la absorbancia (la diferencia entre las absorbancias obtenidas por la medición 2 y la medición 1) de la absorbancia obtenida por la medición 2 en el segundo paso, y esta absorbancia es el “valor de medición que refleja la cantidad de colesterol presente en la LDL”. La absorbancia total obtenida por la medición 2 en el segundo paso es un valor en el que la absorbancia correspondiente a la cantidad de colesterol presente en la LDL se añade a la absorbancia que refleja la cantidad de colesterol presente en lipoproteínas distintas a LDL, y esta absorbancia es el “valor de medición que refleja la cantidad de colesterol total presente”. No obstante, a fin de obtener un valor de medición exacto en la práctica, la cantidad de colesterol se calcula basándose en el valor obtenido restandose una absorbancia antes de la adición del segundo reactivo de la absorbancia obtenida por la medición 2.
- “Una única medición” en el caso en el que se obtienen dos tipos de valores de medición por una única medición, incluye una serie de tratamientos continuos hasta que se obtienen una serie de valores de medición necesarios después de someter una muestra biológica a la medición. Durante la única medición, se incluyen una serie de veces de adición de reactivos y obtención de valores de medición, pero no se incluyen la operación de separación por centrifugado y similares ni la operación de separación por formación de complejos. La medición se completa en una sola vez en un único tubo o pocillo para la medición.
- “Las cantidades de colesterol LDL y colesterol total en una muestra biológica se obtienen simultáneamente basándose en dos valores de medición” se refiere a la obtención de las concentraciones o los valores absolutos de colesterol en la LDL y el colesterol total, mediante el cálculo basado en dos valores de medición. Por **ejemplo**, la cantidad de colesterol presente en la LDL puede conocerse por la cantidad de cambio del valor de medición obtenido por la medición 2 de la Figura 1, es decir, la diferencia entre ambos valores de medición de las mediciones 1 y 2, y la cantidad de colesterol total presente puede conocerse a partir del valor de medición obtenido por la medición 2.
- El tratamiento en el primer paso se efectúa degradando el colesterol mediante reacciones enzimáticas en presencia de un surfactante que actúa sobre las lipoproteínas distintas a LDL. El peróxido de hidrógeno generado por el tratamiento se retiene hasta el segundo paso sin que se elimine ni detecte. “Un surfactante que actúa” significa la degradación de lipoproteínas por el surfactante para liberar el colesterol en las lipoproteínas.
- Un procedimiento específico para hacer reaccionar selectivamente el colesterol que se contiene en las lipoproteínas distintas a LDL, es decir, HDL, VLDL, CM y similares, es el siguiente.
- Se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre las lipoproteínas en presencia del surfactante, que actúa sobre las lipoproteínas distintas a LDL para generar peróxido de hidrógeno.
- La concentración de esterasa de colesterol en la solución de reacción del primer paso es preferentemente de 0,2 a 2,0 IU/mL, siendo efectiva la esterasa de colesterol producida originalmente por una bacteria tipo pseudomonas. Además, la concentración de oxidasa de colesterol es preferentemente de 0,1 a 0,7 IU/mL, y se prefiere utilizar oxidasa derivada de una bacteria o una levadura.
- El surfactante utilizado en el primer paso, que actúa sobre lipoproteínas distintas a LDL, son derivados de óxido de polialquileño, que tienen un valor HLB de un mínimo de 13 y un máximo de 15, preferentemente entre 13 y 14. **Ejemplos** de los derivados pueden incluir condensados superiores de alcoholes, condensados superiores de ácidos grasos, condensados superiores de amida de los ácidos grasos, condensados superiores de alquilamina, condensados superiores de alquilmercaptano, condensados de alquilfenol, y similares. Conviene señalar que se conoce bien el procedimiento de cálculo del valor HLB de surfactantes, describiéndose, por **ejemplo**, en “Shin Kaimenkasseizai (en japonés) (Nuevos Surfactantes)”, Hiroshi Horiuchi, 1986, Sankyoku Publishing Co, LTD.
- Los **ejemplos** específicos preferidos de derivados de óxido de polialquileño que tienen un valor HLB de un mínimo de 13 y un máximo de 15 pueden incluir éter laurílico de polioxietileno, éter cetílico de polioxietileno, éter oléico de polioxietileno, éter de alcohol superior de polioxietileno, éter octifenílico de polioxietileno, éter nonilfenílico de polioxietileno, éter benzilfenílico de polioxietileno y similares, que son compuestos que tienen un valor HLB de un mínimo de 13 y un máximo de 15. No obstante, los derivados del óxido de polialquileño no se limitan a estos.
- Como surfactante utilizado en el primer paso, puede nombrarse, por **ejemplo**, Emulgen B66 (producto de Kao Corporation), que es un derivado del polioxietileno y tiene un valor HLB de 13,2.
- La concentración del surfactante utilizado en el primer paso es preferentemente de unos 0,1 a 10 g/L, más preferentemente de unos 0,5 a 5 g/L.

El primer paso se efectúa preferentemente en una solución tampón con un pH de 5 a 9, y se prefiere una solución tampón que contenga una amina tal como tampón Tris, tampón de trietanolamina, o tampón de Good. En particular, se prefieren Bis-Tris, PIPES, MOPSO, BES, HEPES y POPSO, que son tampones de Good, y la concentración de la solución tampón es preferentemente de 10 a 500 mM.

5 La temperatura de reacción del primer paso es idóneamente de unos 30 a 40 grados C, más preferentemente 37 grados C. El tiempo de reacción (tiempo desde la adición del primer reactivo a la adición del segundo reactivo) es de unos 2 a 10 min, y preferentemente 5 min.

10 En el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1, se desea efectuar el primer paso en presencia de albúmina. La albúmina no tiene limitación alguna, en tanto en cuanto sea albumina, y puede utilizarse albumina comercialmente disponible, tal como albumina sérica, prefiriéndose en particular la albumina libre de ácido graso. El origen de la albumina no tiene limitación alguna y puede ser tanto animal como humana, bovina, de cerdo y caballo y, en particular, puede utilizarse preferentemente la albumina sérica bovina, la cual se utiliza generalizadamente. La concentración de la albumina en la solución de reacción del primer paso es preferentemente de 0,1 a 5,0 g/gL, más preferentemente de 0,3 a 3,0 g/dL.

15 Tal como se describe anteriormente, el primer reactivo utilizado en el primer paso incluye al menos un surfactante, esterasa de colesterol, y oxidasa de colesterol. El reactivo puede contener también un tampón apropiado y albumina. El reactivo utilizado en el primer paso no contiene todos los compuestos reactivos que intervienen en la formación del colorante de quinona, sino que contiene 4-aminoantipirina o un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico. Además, el primer reactivo utilizado en el primer paso no contiene peroxidasa.

20 En el primer paso, el peróxido de hidrógeno se genera de modo correspondiente a la cantidad de colesterol en las lipoproteínas distintas a LDL presentes en una muestra biológica, y el peróxido de hidrógeno se lleva al segundo paso sin ser eliminado ni detectado.

25 En el segundo paso subsiguiente, se cuantifica el peróxido de hidrógeno generado a partir del colesterol en lipoproteínas distintas a LDL que han sido tratadas en el primer paso, y se trata y mide el colesterol en la LDL restante al término del primer paso.

30 El tratamiento del colesterol de la LDL se efectúa tratándose la LDL con un surfactante que actúa al menos sobre la LDL. El colesterol de la LDL genera peróxido de hidrógeno por la acción del surfactante, la esterasa de colesterol, y la oxidasa de colesterol. Aquí, la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol se contienen en el primer reactivo utilizado en el primer paso, y pueden utilizarse los añadidos al sistema de medición en el primer paso. Además, la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol pueden también contenerse en el segundo reactivo utilizado en el segundo paso. El surfactante que actúa al menos sobre la LDL puede ser un surfactante que actúa selectivamente solo sobre la LDL o un surfactante que actúa sobre todas las lipoproteínas.

35 Dado que el valor de medición de la LDL se calcula a partir de la cantidad de cambio en la absorbancia después de la adición del segundo reactivo, la precisión del valor de la medición se rige por la velocidad de reacción, es decir la intensidad de reacción del surfactante utilizado. En consecuencia, es preferible seleccionar un surfactante que tenga una intensidad de reacción apropiada.

40 Los **ejemplos** preferidos de surfactante que actúa selectivamente únicamente sobre la LDL o actúa sobre todas las lipoproteínas pueden incluir derivados del óxido de polialquileno no utilizados en el primer reactivo. **Ejemplos** de derivados pueden incluir condensados de alcohol superior, condensados de ácido graso superior, condensados de amida de ácido graso superior, condensados de alquilamida superior, condensados de alquilmercaptano superior y condensados de alquilfenol.

45 Los **ejemplos** preferidos específicos de derivados del óxido de polialquileno pueden incluir éter laurílico de polioxietileno, éter cetílico de polioxietileno, éter oléico de polioxietileno, éter alcohol superior de polioxietileno, éter octifenílico de polioxietileno, éter nonilfenílico de polioxietileno, éter benzilfenílico de polioxietileno y similares, que son compuestos que no se utilizan en el primer reactivo. Como surfactante utilizado en el segundo paso, se nombra por **ejemplo** Polidocanol (Thesit) (producto de Roche Diagnostic Corporation) que es un alcohol laurílico de polioxietileno y tiene un valor HLB de 13,3.

50 La concentración del surfactante utilizado en el segundo paso es preferentemente de unos 0,1 a 100g/L, más preferentemente de cerca de 1 a 50 g/L.

55 Otras condiciones preferidas de reacción en el segundo paso son iguales a las condiciones preferidas de reacción en el primer paso. No obstante, en el segundo paso del procedimiento de la presente invención, el peróxido de hidrógeno que se contiene en el sistema de medición, derivado del colesterol en lipoproteínas distintas a LDL, se convierte en colorante de quinona justo después de que se inicie el segundo paso, mientras que el colesterol en la LDL genera peróxido de hidrógeno a medida que progresa el segundo paso, y el peróxido de hidrógeno se convierte



en colorante de quinona. El aumento en la absorbancia debido al colorante de quinona formado por el tratamiento de lipoproteínas distintas a LDL comienza al mismo tiempo que la adición del segundo reactivo, progresa a una velocidad rápida, y finaliza en un corto tiempo. Por otro lado, dado que la LDL se trata para generar peróxido de hidrógeno después de la adición del segundo reactivo y acto seguido se forma el colorante de quinona, la absorbancia que refleja la cantidad de LDL presente comienza a aumentar con un retraso de tiempo después de la adición del segundo reactivo, y la velocidad de aumento no es tan elevada. Dicho de otro modo, el aumento en la absorbancia en el segundo paso muestra un aumento bifásico que consiste en el rápido aumento justo después de iniciar el segundo paso y el aumento moderado. El aumento rápido inicial es el aumento que refleja la cantidad de lipoproteínas distintas a LDL presentes, y el aumento moderado subsiguiente es el aumento que refleja la cantidad de LDL presente.

En consecuencia, es conveniente terminar la formación del colorante de quinona derivado del colesterol en la LDL en 30 segundos como mínimo y 5 minutos como máximo, después de la adición del segundo reactivo, de modo que el colorante de quinona derivado del colesterol en lipoproteínas distintas a LDL, y el colorante de quinona derivado del colesterol en LDL, podría medirse independientemente para permitir que se cuantifique con exactitud la cantidad de colesterol presente en la LDL.

El colesterol en las lipoproteínas distintas a LDL puede medirse determinándose el peróxido de hidrógeno generado a través de las acciones de la esterasa de colesterol y la oxidasa del colesterol en el primer paso. El colesterol en la LDL puede medirse añadiéndose un surfactante que actúe al menos en la LDL en el segundo paso, y determinándose el peróxido de hidrógeno generado a través de las acciones del surfactante y la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol que se han añadido en el primer paso. La determinación del peróxido de hidrógeno puede efectuarse mediante un procedimiento en el cual el peróxido de hidrógeno generado, en presencia de peroxidasa, se convierte en quinona coloreada provocándose la condensación oxidativa entre 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, y midiéndose a una longitud de onda de 400 a 700 nm. En este momento, cuando el segundo reactivo utilizado en el segundo paso se añade al sistema de medición, todos los compuestos reactivos que participan en la formación del colorante de quinona, es decir, peroxidasa, 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, pasan a contenerse en el sistema de medición. De ese modo, el segundo reactivo utilizado en el segundo paso contiene al menos un surfactante que actúa sobre la LDL y contiene los compuestos reactivos que no se contienen en el primer reactivo utilizado en el primer paso entre, peroxidasa, 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno (fenólico o anilínico). Además, el segundo reactivo utilizado en el segundo paso pueden contener cualquier solución tampón, albumina, esterasa de colesterol y oxidasa de colesterol.

El valor de medición de la absorbancia del colorante de quinona formado en la reacción del segundo paso es el valor en el cual la absorbancia derivada del peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso se añade a la absorbancia derivada del peróxido de hidrógeno generado por la reacción en el primer paso, e indica la cantidad de colesterol presente en todas las lipoproteínas en una muestra biológica. La absorbancia obtenida restandose la absorbancia debida al peróxido de hidrógeno derivado del primer paso de la absorbancia total, es decir, la determinación del peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso, indica la cantidad de colesterol presente en la LDL.

De los compuestos donantes de hidrógeno, **ejemplos** de compuestos donantes de hidrógeno anilínico incluyen N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3, 5-dimetoxianilina (HDAOS), N-etil-N-sulfopropil-3-metoxianilina (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-3, 5-dimetilanilina (MAPS), N-etil-N-sulfopropil-3-metil-anilina (TOPS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ADOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina (ALOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina (MAOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metil-anilina (TOOS), N-sulfopropil-anilina (HALPS), y similares.

La concentración de peroxidasa cuando el peróxido de hidrógeno se convierte en colorante de quinona en la solución de reacción del segundo paso es preferentemente de 0,1 a 3,0 IU/mL, la concentración de 4-aminoantipirina es preferentemente de 0,3 a 3,0 mmol/L, y la concentración de compuestos donantes de hidrógeno fenólico o anilínico es preferentemente de 0,5 a 2,0 mmol/L.

Dado que todos los compuestos reactivos que participan en la formación del colorante de quinona pasan a contenerse en el sistema cuando se añade el segundo reactivo en el segundo paso, el peróxido de hidrógeno generado en el primer paso se convierte en colorante de quinona en una etapa temprana del segundo paso. Al mismo tiempo, el colesterol en la LDL se somete a tratamiento con el surfactante que se contiene en el segundo reactivo y actúa sobre la LDL y la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol que se contienen en el sistema de medición, para generar peróxido de hidrógeno. Dado que el peróxido de hidrógeno derivado del colesterol en la LDL se convierte, al mismo tiempo que se forma, en colorante de quinona por la acción de los compuestos reactivos que participan en la formación del colorante de quinona, y que se contienen en el sistema de medición, la cantidad del colorante de quinona aumenta con el tiempo. En consecuencia, en el segundo paso, la absorbancia aumenta rápidamente al mismo tiempo que el inicio del segundo paso, y continúa aumentando con el tiempo tal como se ilustra

en la Figura 1. En una primera medida, se mide la absorbancia que aumentó rápidamente. En una segunda medida, se mide la absorbancia que aumentó con el tiempo. El valor de medición de la segunda medición refleja la cantidad de colesterol total presente, y la diferencia entre el valor de medición de la segunda medición y el valor de medición de la primera medición, refleja la cantidad de colesterol presente en LDL.

El tiempo después de la adición del segundo reactivo y antes de la primera medición, es decir, el tiempo necesario para la conversión a colorante de quinona del peróxido de hidrógeno generado en el primer paso, es de 0 a 60 segundos, preferentemente dentro de los 30 segundos. Además, el tiempo antes de efectuar la primera medición, es decir, el tiempo necesario para generar peróxido de hidrógeno de todo el colesterol presente en LDL por las acciones enzimáticas del segundo paso, y convertir el peróxido de hidrógeno generado en colorante de quinona, es de 1 a 15 minutos. Cuando la medición se efectúa en dos puntos de la primera medición y la segunda medición, y se obtienen dos valores de medición, se pueden cuantificar las cantidades de colesterol total y colesterol LDL pueden cuantificarse mediante el cálculo de acuerdo con el proceso de cálculo de estos dos valores de medición.

A continuación se ilustran las fórmulas de cálculo.

$$\text{Total cholesterol} : \frac{\Delta A T_{\text{sample}} - \Delta A T_{\text{BLK}}}{\Delta A T_{\text{STD}} - \Delta A T_{\text{BLK}}} \times CT_{\text{STD}}$$

$$\text{LDL cholesterol} : \frac{\Delta A L_{\text{sample}} - \Delta A L_{\text{BLK}}}{\Delta A L_{\text{STD}} - \Delta A L_{\text{BLK}}} \times CL_{\text{STD}}$$

$\Delta A T_{\text{muestra}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia debida a únicamente una muestra y el primer reactivo de la absorbancia obtenida por la medición 2 de la muestra.

$\Delta A T_{\text{STD}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia debida a únicamente una muestra estándar y el primer reactivo de la absorbancia obtenida por la medición 2 de la muestra estándar.

$\Delta A T_{\text{BLK}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia debida a únicamente una muestra y el primer reactivo de la absorbancia obtenida por la medición 2, cuando se utiliza como muestra agua salina o purificada.

$CT_{\text{STD}}$ : Valor del colesterol total de la muestra estándar.

$\Delta A L_{\text{muestra}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia obtenida por la medición 1 de la muestra de la absorbancia obtenida por la medición 2 de la muestra.

$\Delta A L_{\text{STD}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia obtenida por la medición 1 de la muestra estándar de la absorbancia obtenida por la medición 2 de la muestra estándar.

$\Delta A L_{\text{BLK}}$ : Cantidad de cambio en la absorbancia determinada restándose la absorbancia obtenida por la medición 1 de la absorbancia obtenida por la medición 2, cuando se utiliza como muestra agua salina o purificada.

$CL_{\text{STD}}$ : Valor del colesterol de la LDL de la muestra estándar.

En el procedimiento de la presente invención, el recorrido en el cual se trata cada lipoproteína para formar el colorante de quinona se resume del modo siguiente. Conviene señalar que lo que aparece a continuación resume el proceso (tratamiento) para formar el colorante de quinona, pero no muestra los compuestos reactivos.

Tratamiento de lipoproteínas distintas a LDL

Lipoproteínas distintas a LDL	→	Tratamiento 1A	de	→	Tratamiento 1B	de
		Peróxido de hidrógeno			Colorante de quinona	
		Surfactante				
		Esterasa C				
		Oxidasa C				

Tratamiento de la LDL

LDL	→	Tratamiento 2A	de	→	Tratamiento 2B	de
		Peróxido de hidrógeno			Colorante de quinona	
		Surfactante				

Esterasa C  
Oxidasa C

Peroxidasa  
4-aminoantipirina  
Donante de hidrógeno

Los compuestos reactivos bajo cada flecha son compuestos reactivos necesarios para cada tratamiento (reacción), donde esterasa C indica esterasa de colesterol y oxidasa C indica oxidasa de colesterol.

5 Entre los tratamientos anteriores, el tratamiento 1A se efectúa en el primer paso del procedimiento de la presente invención, y el tratamiento 1B, el tratamiento 2A, y el tratamiento 2B se efectúan en el segundo paso. En el segundo paso, el tratamiento 1B se completa en una etapa temprana del segundo paso, y el tratamiento 2A y el tratamiento 2B se efectúan durante el segundo paso.

10 El primer paso y el segundo paso se efectúan de modo continuo en un recipiente de reacción, y un analizador automático mide automáticamente la cantidad de cambio en la absorbancia en el segundo paso y la absorbancia en el momento de finalización del segundo paso.

15 El analizador para su uso en el procedimiento de la presente invención es un analizador automático que tiene la función de efectuar un procedimiento de análisis simultáneo para múltiples elementos, en el cual pueden medirse simultáneamente varios elementos. El analizador automático incluye TBA-30R (Toshiba Corporation), BM1250, 1650, y 2250 (JEOL Ltd.) y similares.

20 Como función del analizador para ejecutar un procedimiento de análisis simultáneo de varios elementos, puede añadirse de un primer reactivo a un cuarto reactivo en un recipiente de reacción, y también el tiempo de reacción puede fijarse de 3 a 20 minutos. Además, dado que las mediciones fotométricas se efectúan varias veces durante el tiempo de reacción, es posible fijar diferentes tiempos de medición, permitiendo así diferentes configuraciones de tiempo para colorimetría y análisis de velocidad, así como una combinación del procedimiento de colorimetría y el procedimiento de velocidad. De igual modo, pueden efectuarse también mediciones simultáneas a diferentes longitudes de onda. La medición simultánea de varios elementos de la presente invención puede realizarse fijando apropiadamente estas condiciones de medición para el análisis.

25 Para que el analizador automático tenga la función de efectuar un procedimiento de análisis simultáneo para varios elementos, puede utilizarse un analizador disponible comercialmente.

30 A continuación se describirá un kit para medir el colesterol y el colesterol total en una muestra biológica al mismo tiempo. El kit incluye el primer reactivo y el segundo reactivo. El primer reactivo contiene el surfactante que actúa al menos sobre lipoproteínas distintas a LDL, esterasa de colesterol, y oxidasa de colesterol. El primer reactivo puede contener también los compuestos reactivos que intervienen en la formación del colorante de quinona, incluidos peroxidasa, 4-aminoantipirina y el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, pero no se contienen al mismo tiempo todos los de peroxidasa, 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico. Más aún, no se contiene peroxidasa, y se contiene cualquiera de 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico. De igual modo, el primer reactivo puede contener una solución tampón apropiada, albumina y similares. El segundo reactivo contiene el surfactante que actúa al menos sobre la LDL, y adicionalmente compuestos reactivos que no se contienen en el primer reactivo entre los compuestos reactivos que participan en la formación del colorante de quinona, incluidos peroxidasa, 4-aminoantipirina y un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico. El segundo reactivo puede contener también una solución tampón apropiada, albumina y similares. Es posible medir la absorbancia de la quinona coloreada formada por la reacción de los compuestos reactivos. El kit contiene también una solución lipoproteína estándar de concentración conocida, una solución tampón, y similares.

#### 45 Ejemplos

Aquí en adelante se explica la presente invención más específicamente basándose en **ejemplos**. No obstante, la presente invención no se limita a los **ejemplos** descritos a continuación.

50 Se prepararon los compuestos reactivos utilizados en el primer paso y el segundo paso (primeros compuestos reactivos y segundos compuestos reactivos, respectivamente) a fin de tener las composiciones siguientes, respectivamente. Se prepararon los compuestos reactivos correspondientes a dos sistemas de medición que tienen diferentes composiciones para el primer reactivo y el segundo reactivo, respectivamente.

55 Sistema de medición 1

Primer compuesto reactivo

PIPES solución tampón, pH 7,0	50 mmol/L
4-aminoantipirina	1,4 mmol/L
Esterasa de colesterol	0,6 IU/mL
Oxidasa de colesterol	0,5 IU/mL
Surfactante, Emulgen B66 (Kao Corp.)	0,27%

60

Segundo compuesto reactivo

PIPES solución tampón, pH 7,0	50 mmol/L
Surfactante, Polidocanol (Thesit( (Roche Diagnostic Corp.)	1%
TOOS	6 mmol/L
POD (peroxidasa)	6,5 IU/mL

Sistema de medición 2

5

Primer compuesto reactivo

PIPES solución tampón, pH 7,0	50 mmol/L
TOOS	2 mmol/L
Esterasa de colesterol	0,6 IU/mL
Oxidasa de colesterol	0,5 IU/mL
Surfactante, Emulgen B66 (Kao Corp.)	0,27%

Segundo compuesto reactivo

10

PIPES solución tampón, pH 7,0	50 mmol/L
Surfactante, Polidocanol (Thesit) (Roche Diagnostic Corp).	1%
4-Aminoantipirina	4 mmol/L
POD	6,5 IU/mL

Como productos de control para la evaluación, se utilizaron un reactivo comercialmente disponible, LDL-EX N (producto de Denka Seiken Co., Ltd.) y reactivo para el análisis automático T-CHO (S)N (producto de Denka Seiken Co., Ltd.)

15

(Muestra)

Se prepararon cincuenta y ocho muestras de suero humano.

20

Como analizador automático, se utilizó TBA-30R (producto de Toshiba Corporation).

(Reactivo para el análisis simultáneo de LDL-C y T-CHO (multi-reactivo).

25

Condiciones de medición: análisis automático de múltiples elementos.

30

Después de 300 µL del primer reactivo precalentado a 37 grados C, se mezcló con cada muestra de 4µL y se hizo reaccionar durante 5 minutos a 37 grados C, se añadieron 100µL del segundo reactivo y se hizo reaccionar otros 5 minutos. Después de la adición del segundo reactivo, se midió la absorbancia a 600 nm, 30 segundos más tarde, y 5 minutos después. Se calculó el nivel de colesterol LDL (LDL-C) a partir de la cantidad de cambio en la absorbancia entre 30 segundos y 5 minutos después de la adición del segundo reactivo, y se calculó el nivel de colesterol total (T-CHO) a partir de la cantidad de cambio en la absorbancia después de la adición del segundo reactivo. En este momento, se midió anticipadamente la cantidad de cambio en la absorbancia debido a la solución salina (denominado aquí en adelante "blanco"), y la cantidad de cambio en la absorbancia cuando se utilizó como muestra estándar una muestra de concentración conocida, y se calculó "la cantidad de cambio en la absorbancia por mg/gL" a partir de la diferencia de estos dos valores para cada uno de LDL-C y T-CHO. Después, se midió la muestra, y se comparó la cantidad de cambio en la absorbancia obtenida restandose el blanco de la cantidad medida de cambio en la absorbancia con "la cantidad de cambio en la absorbancia por mg/dL" para calcular las concentraciones de LDL-C y T-CHO, respectivamente.

40

En la Figura 2 se ilustra la correlación entre el valor de medición del colesterol en la LDL medida con LDL-EX N, que es un producto de control para la evaluación, y el valor de medición medido por el procedimiento de la presente invención. En la Figura 3 se ilustra la correlación entre el valor de medición del colesterol total medido con T-CHO(S)N, que es producto de control para la evaluación y el valor de medición medido por el procedimiento de la presente invención. Como se ilustra en las Figuras 2 y 3, mediante la cuantificación simultánea del presente procedimiento se han obtenido resultados de medición similares a cuando LDL-C y T-CHO se midieron cada una de ellos separadamente.

45

REFERENCIAS CITADAS EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector solamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado en cumplir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patentes citados en la memoria descriptiva**

- JP 11318496 A [0005]
- JP 2003501630 A [0007]
- JP 2002362970 A [0010]
- WO 2004055204 A [0010]

Literatura citada en la descripción que no es una patente:

- 10 • **Hiroshi Horiuchi**. Shin Kaimenkasseizai. Sankyō  
Publishig Col. LTD. 1986 [0031]

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para cuantificar *in vitro* el colesterol en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total en una muestra biológica mediante una única medición que incluye una serie de tratamientos continuos hasta que se obtiene una serie de valores de medición, y que comprende:
- 10 un primer paso de tratamiento de las lipoproteínas distintas de lipoproteínas de baja densidad en la muestra biológica, en el que se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre lipoproteínas distintas a la lipoproteína de baja densidad de la muestra biológica en presencia de un surfactante derivado del óxido de polialquileno con un valor HLB de un mínimo de 13 y un máximo de 15, que actúa sobre lipoproteínas distintas de lipoproteína de baja densidad para generar peróxido de hidrógeno que no se convierte en un colorante de quinona en el primer paso y se retiene hasta un segundo paso; y
- 15 un segundo paso para convertir el peróxido de hidrógeno obtenido en el primer paso en un colorante de quinona y tratar la lipoproteína de baja densidad restante con el uso de un surfactante derivado del óxido de polialquileno, que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad y no se utiliza en el primer paso, y convertir el peróxido de hidrógeno generado en un colorante de quinona,
- 20 caracterizado porque se permite que la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol actúen sobre la lipoproteína de baja densidad de la muestra biológica en presencia de un surfactante derivado del óxido de polialquileno que actúa al menos sobre la lipoproteína de baja densidad y no se utiliza en el primer paso para generar peróxido de hidrógeno, midiéndose el peróxido de hidrógeno generado,
- 25 y caracterizado porque se miden simultáneamente las cantidades de colesterol presentes en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total presentes en la muestra biológica basándose en dos valores en los que la cantidad total de cambio en la absorbancia en el segundo paso sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol total presente y la cantidad de cambio de absorbancia en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el segundo paso, sirve como valor de medición que refleja la cantidad de colesterol presente en la lipoproteína de baja densidad,
- 30 en el que un primer reactivo utilizado para el primer paso contiene 4-aminoantipirina o un compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico, que es un compuesto reactivo que participa en la formación del colorante de quinona, y un segundo reactivo utilizado para el segundo paso, que tiene compuestos reactivos no contenidos en el primer reactivo entre la 4-amonioantipirona, el compuesto donante de hidrógeno fenólico o anilínico y la peroxidasa, de modo que el colorante de quinona no se forma en el primer paso, y se cuantifica el colesterol en la lipoproteína de baja densidad y el colesterol total a partir de la cantidad de colorante de quinona formado en el segundo paso, mediante una única medición que incluye
- 35 una serie de tratamientos continuos hasta que se obtiene una serie de valores de medición.
- 40 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el cambio en la absorbancia del segundo paso muestra un aumento bifásico en el cual existe un rápido aumento después de añadir un segundo reactivo y un aumento moderado posterior; y se mide el colesterol en la lipoproteína de baja densidad a partir de la cantidad del último cambio moderado en la absorbancia.
- 45 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque se mide el colesterol total a partir de la cantidad total de cambio en la absorbancia del segundo paso.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el análisis se efectúa mediante una única medición que incluye una serie de tratamientos continuos hasta que se obtiene una serie de valores de medición según diferentes condiciones de medición, utilizándose un analizador automático para el ensayo químico clínico.

Fig. 1

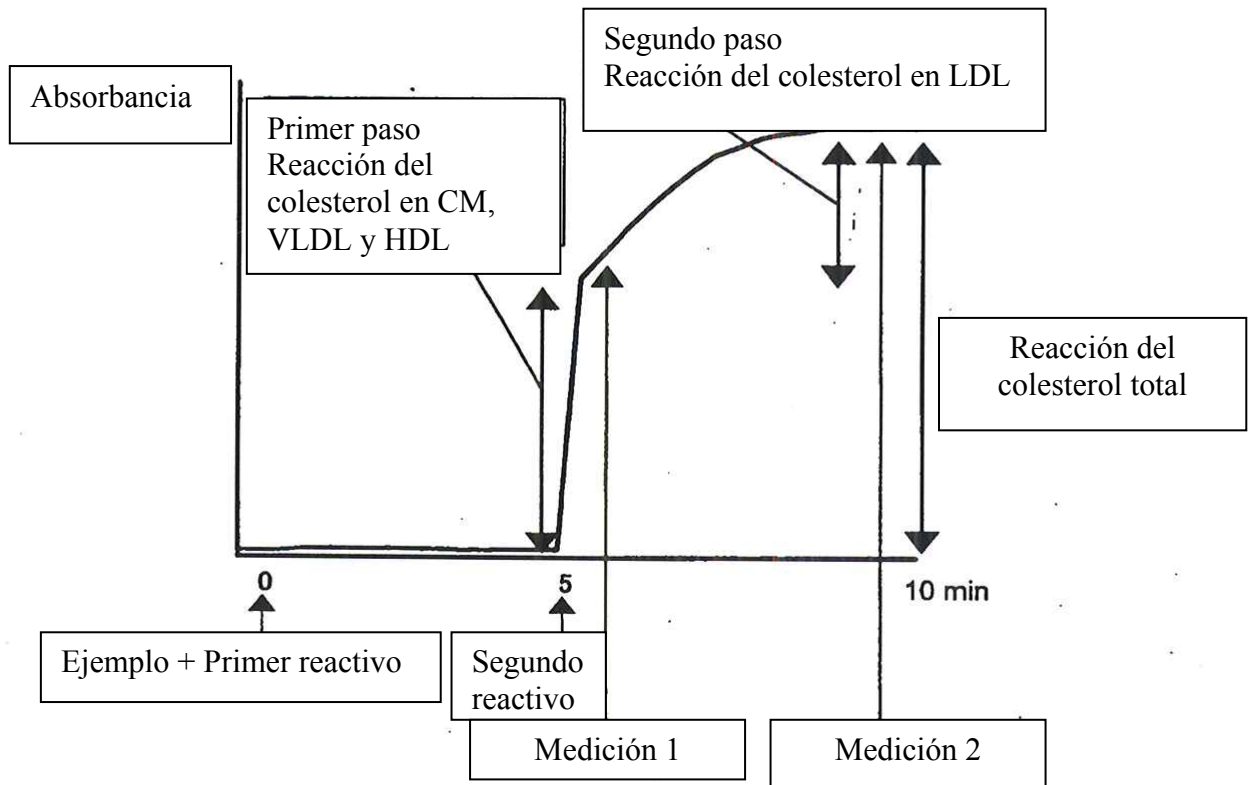


Fig. 2

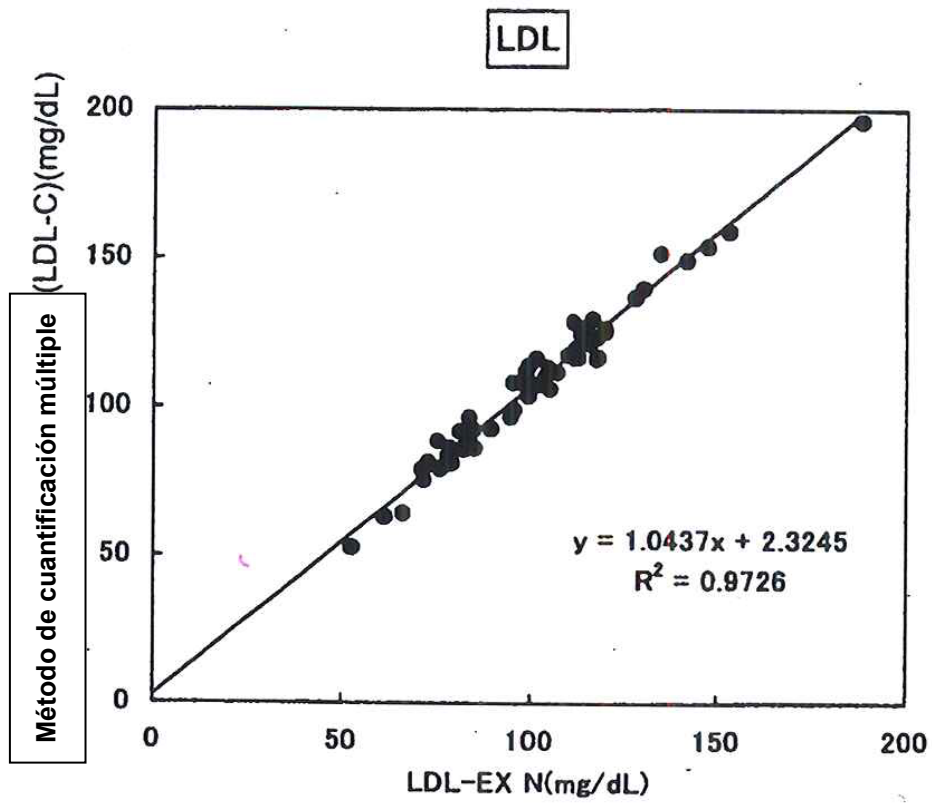




Fig. 3

