

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 437**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2014 PCT/JP2014/060900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14171505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2014 E 14784863 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2987867**

54 Título: **Método de medición de la actividad de la lipasa pancreática humana**

30 Prioridad:

18.04.2013 JP 2013087665

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)
1-105, Kanda Jinbocho Chiyoda-ku
Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**UEDA, SHIGERU y
SAKASEGAWA, SHINICHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 437 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 de medición de la actividad de la lipasa pancreática humana

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit de medición de la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra en el campo de ensayos de laboratorio.

Antecedentes de la técnica

10 Una lipasa pancreática humana es significativa como marcador de diagnóstico para una enfermedad pancreática, tal como pancreatitis aguda, y un reactivo de medición de la actividad enzimática en suero está disponible comercialmente como reactivo de ensayo de laboratorio. El exponente de iones hidrógeno óptimo (pH) en el momento de la medición de la actividad enzimática depende de un sustrato o una condición de reacción a emplear, pero se notifica que se encuentra en un intervalo de aproximadamente 7,5 a 10 (véase, por ejemplo, la literatura no patente 1). Las características enzimáticas de la lipasa pancreática humana incluyen que la reacción se produce en una interfase de una emulsión o una micela que contiene un sustrato, y que un ácido biliar y una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 11 kDa designada como colipasa son necesarios para la activación de la enzima. En caso de que un ácido biliar y una colipasa estén ausentes, el centro activo de la lipasa pancreática se cubre con un dominio designado como tapa que significa una cubierta y por ende no puede entrar en contacto con un sustrato. El ácido biliar influye en la formación de una emulsión o una micela. Además, la conformación de la lipasa pancreática humana se cambia en caso de que la colipasa esté presente adicionalmente, y el centro activo de la lipasa pancreática humana puede unirse a un sustrato, que puede activar la lipasa pancreática humana. De este modo, se sabe que una lipasa pancreática humana actúa en una interfase de un complejo que contiene un sustrato hidrófobo, una sal biliar y una colipasa.

25 En la medición de la actividad de una lipasa pancreática humana en una muestra, un triglicérido se utiliza convencionalmente como el sustrato. El triglicérido se utiliza en la forma de lo que se denomina una emulsión que se emulsiona y dispersa en una solución tampón por medio de una fuerza de agitación junto con goma arábica, alcohol polivinílico o similares. En la medición de la actividad de la lipasa mediante el uso de un sustrato de triglicéridos, por ejemplo, un ácido graso producido por una reacción de la lipasa se determina cuantitativamente por alcalimetría. Alternativamente, se ha intentado medir un ácido graso liberado de un sustrato de triglicéridos por una reacción de la lipasa mediante un método enzimático, pero es difícil de medir de forma espectroscópica la actividad de la lipasa mediante el uso de un sistema conjugado a enzimas debido a que el sustrato de triglicéridos muestra una fuerte turbidez debido a la emulsión. Además, un sustrato de emulsión tiene la desventaja de que la separación de fases se produce con facilidad durante el almacenamiento, y es difícil medir la actividad de la lipasa con una alta reproducibilidad. Con el fin de resolver estos problemas de los métodos que utilizan un sustrato de triglicéridos, se han desarrollado un método en el que se utiliza un diglicérido como sustrato (véase, por ejemplo, las literaturas de patente 1 y 2) y un método en el que se utiliza un sustrato sintético (véase, por ejemplo, la literatura no patente 2), y estos métodos son actualmente empleados en un ensayo rutinario de laboratorio.

35 Como una ventaja de utilizar un diglicérido como sustrato, puesto que un diglicérido es más hidrófilo que un triglicérido, el sustrato puede volverse transparente cuando se utiliza en combinación con un agente tensioactivo, y por ende dicho sustrato se puede utilizar convenientemente en un analizador automático con fin general.

40 Como sustrato de diglicéridos, se utiliza principalmente 1,2-diglicérido. Se sabe que 1,2-diglicérido se convierte en 1,3-diglicérido en una molécula por una reacción de transferencia de un enlace éster, y por ende se utiliza con este cambio suprimido tanto como sea posible. Además, se ha propuesto que una parte de 1,2-diglicérido se convierta en 1,3-diglicérido, y la mezcla resultante se establece en forma de un líquido a utilizar como un sustrato para la medición de una lipasa pancreática humana (véase, por ejemplo, la literatura de patente 3). En este caso, se ha notificado que un método de medición que utiliza un sustrato de diglicéridos se ve influenciado por una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica o una lipasa hepática. También se ha notificado que el método de medición que utiliza un sustrato de diglicéridos tiene un efecto perjudicial en que la especificidad correspondiente a una lipasa pancreática disminuye con facilidad ya que este método se ve influenciado por una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica, o una esterasa contenida en sangre (véase, por ejemplo, la literatura de patente 4). Una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica humana o una lipasa hepática se libera en la sangre por heparina. Por lo tanto, la actividad de la lipasa pancreática en sangre no puede medirse con precisión en una muestra a la que se ha administrado heparina. Por otra parte, se considera que un reactivo de ensayo rutinario que mide la actividad de la lipasa pancreática humana utilizando un sustrato sintético no se ve influenciado por una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica o una lipasa hepática (véase, por ejemplo, la literatura no patente 2), pero existe un problema en la estabilidad del sustrato sintético en una región alcalina débil correspondiente al pH óptimo de la lipasa.

55 Como un método para evitar la influencia de una lipasa no pancreática, se ha notificado que la influencia de una lipasa no pancreática se reduce, al utilizar un kit disponible comercialmente para medir la actividad de la lipasa utilizando 1,2-dilinoil glicerol, es decir, un diglicérido, como el sustrato, mediante el reemplazo de desoxicolato de

sodio utilizado como una sal biliar con glicocolato de sodio (véase, por ejemplo, la literatura no patente 3), pero los detalles son desconocidos. Además, no sólo el método de medición de la actividad de la lipasa utiliza un diglicérido como sustrato, sino que también un método de medición de la actividad de la lipasa que utiliza un triglicérido como sustrato se ve influenciado por una lipasa no pancreática, y se ha notificado también con respecto a este caso que la influencia de una lipasa no pancreática se puede evitar mediante el reemplazo de ácido desoxicólico con ácido glicocólico (véase, por ejemplo, la literatura no patente 4). Sin embargo, aún es difícil medir la actividad de la lipasa con una alta reproducibilidad ya que un sustrato de triglicéridos tiene desventajas en que no se puede medir espectroscópicamente y la separación de fases se produce con facilidad durante el almacenamiento como se ha descrito anteriormente.

10 **Listado de referencias**

Literatura de Patente

Literatura de patente 1: Patente Japonesa abierta a inspección pública n.º 59-91898 (Patente Japonesa n.º 1607890)

Literatura de patente 2: Patente Japonesa abierta a inspección pública n.º 63-245672

Literatura de patente 3: Patente Japonesa n.º 4836196

15 Literatura de patente 4: Patente Japonesa abierta a inspección pública n.º 2008-307048

Literatura no patente

Literatura no patente 1: Clinical Chemistry, 39: pp. 746-756, 1993

Literatura no patente 2: Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science, Vol. 41, No. 3, pp. 489-496, 1999

20 Literatura no patente 3: Clinical Chemistry, 38: 288-292, 1992

Literatura no patente 4: Clinical Chemistry, 35: pp 1688-1693, 1989.

Literatura no patente 5: Agricultural Biology and Chemistry, 44 (2), 399-406, 1980

Compendio de la invención

Problema técnico

25 Un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra que utiliza un diglicérido como sustrato es mejor en la reproducibilidad que un método de medición que utiliza un triglicérido, pero se ve influenciado con relativa facilidad por una lipasa lipoproteica o una lipasa hepática. Por consiguiente, existe una demanda de un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana que pueda alcanzar una mayor especificidad para la lipasa pancreática durante el uso de un diglicérido como sustrato, y evite la influencia.

Solución al problema

30 Como se ha descrito anteriormente, el pH óptimo en la medición de actividad de la lipasa pancreática humana depende en general de un sustrato y una condición de reacción a emplear, pero se notifica que cae en un intervalo de aproximadamente 7,5 a 10. Los presentes inventores han hallado, como resultado de los exámenes serios, que la influencia de una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica o una lipasa hepática, que puede mezclarse en una muestra debido a la administración de heparina o similares, se puede reducir de forma inesperada, en la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra utilizando un diglicérido como sustrato, moviendo un pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana correspondiente al lado ácido, y realizando una reacción de la lipasa pancreática humana bajo la coexistencia de un ácido biliar y una colipasa en una condición de pH inferior a la notificada convencionalmente.

40 Específicamente, la presente invención proporciona un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana con influencia reducida de una lipasa no pancreática en la que un ácido biliar conjugado específico se utiliza en forma individual o se utiliza en combinación con otro ácido biliar para hacer que un pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, y la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra se mide a un pH 7,4 o inferior.

45 Se notifica que "ácido biliar conjugado" se refiere a un ácido biliar conjugado con un aminoácido tal como glicina o taurina, y un "ácido biliar no conjugado" significa un ácido biliar con exclusión de ácidos biliares conjugados. Además, el "pH óptimo" significa un pH de medición en el que la actividad de la lipasa pancreática se encuentra en el máximo.

50 Un aspecto de la presente invención es un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que incluye 1) una etapa de contacto para llevar un ácido biliar que hace que un pH proporcione un

valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, un diglicérido y una colipasa en contacto con la muestra a un pH 7,4 o inferior; y 2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra, en la que el ácido biliar que hace que el pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7 sea un ácido biliar que contiene: a) uno o dos o más ácidos biliares de tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA), y sales de los mismos; y/o b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido taoursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

En el trazado de la actividad de la lipasa pancreática humana frente al pH, por ejemplo, si se dibuja una curva convexa ascendente, un valor máximo de la actividad significa el pico de la actividad. Además, mientras que el "pH óptimo" significa el pH de medición en el cual la actividad de la lipasa pancreática humana se encuentra en el máximo en condiciones habituales, un pH de medición en el cual la actividad de la lipasa pancreática humana se encuentra en el máximo en presencia del ácido biliar anteriormente descrito se designará como un "pH óptimo aparente" en algunos casos.

Por ejemplo, si el ácido o ácidos biliares tipo a se utilizan en la etapa de contacto, un índice de adición del ácido o ácidos biliares tipo a es 40 % o más, en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.

Un agente tensioactivo no iónico puede estar presente junto con el diglicérido. El agente tensioactivo no iónico es, por ejemplo, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno, y éter de alcohol secundario de polioxietileno.

En la etapa de detección, por ejemplo, se emplea un método colorimétrico. Además, en la etapa de contacto, por ejemplo, la concentración de todos los ácidos biliares es diez veces tan alta como la del glicérido o más en términos de una relación molar. Es más, en la etapa de contacto, por ejemplo, el pH es 7,2 o inferior.

Las características ejemplificadas de la presente invención son:

(1) Un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que comprende:

1) una etapa de contacto para llevar un ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, un diglicérido y una colipasa en contacto con la muestra a un pH 7,4 o inferior;

y

2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra,

en donde el ácido biliar es un ácido biliar que contiene:

a) uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos; y/o

b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido taoursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

(2) El método de medición según (1), en el que la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana, o una muestra que puede contener una lipasa no pancreática humana.

(3) El método de medición según (1) o (2), en donde el ácido o ácidos biliares de a) se utilizan en la etapa de contacto.

(4) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (3), en donde cuando se utiliza el ácido o ácidos biliares de a), un índice de adición del ácido o ácidos biliares tipo a es 40 % o más en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.

(5) El método de medición según (1) o (2), en donde el ácido o ácidos biliares de b) se utilizan en la etapa de contacto.

- (6) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (4), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados de ácido glicodesoxicólico (GDCA) y sales de los mismos.
- 5 (7) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (4), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
- (8) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (4), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados del ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
- (9) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (8), en donde un agente tensioactivo no iónico está presente junto con el diglicérido.
- 10 (10) El método de medición según (9), en donde el agente tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno y éter de alcohol secundario de polioxietileno.
- (11) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (10), en donde un método colorimétrico se emplea en la etapa de detección.
- 15 (12) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (11), en donde una concentración de todos los ácidos biliares es diez veces tan alta como una concentración de diglicéridos o más en términos de una relación molar en la etapa de contacto.
- (13) El método de medición según uno cualquiera de (1) a (12), en donde el pH es 7,2 o inferior en la etapa de contacto.
- 20 (14) Un kit para medir la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que comprende al menos un ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, un diglicérido y una colipasa, en donde un pH en el momento de la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana se ajusta a 7,4 o menos, y el ácido biliar es un ácido biliar que contiene:
- 25 a) uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos; y/o
- b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que
- 30 consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.
- (15) El kit según (14), en donde la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana, o una muestra que puede contener una lipasa no pancreática humana.
- (16) El kit según (14) o (15), que comprende además un cromógeno.
- (17) El kit según (14) a (16), en donde el pH en el momento de la medición de la actividad se ajusta a 7,2 o menos.
- 35 (18) El kit según uno cualquiera de (14) a (17), en donde los contenidos se almacenan de forma separada en una pluralidad de recipientes.
- (19) Un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que comprende:
- 1) una etapa de contacto para llevar un ácido biliar, un diglicérido y una colipasa en contacto con la muestra a un pH 7,4 o menos; y
- 40 2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra,
- en donde una concentración del diglicérido es 0,35 a 2,5 mmol/l, y una concentración del ácido biliar es diez a veinte veces tan alta como la concentración del diglicérido en términos de una relación molar, y
- el ácido biliar es:
- 45 a) un ácido biliar que contiene uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos, siendo una relación molar del ácido o ácidos biliares tipo a de 40 % o más en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos; o

- 5 b) un ácido biliar que contiene una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos, siendo una relación molar del ácido o ácidos biliares tipo 1 b del 30 a 70 %, en base a la cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.
- (20) El método de medición según (19), en donde la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana, o una muestra que puede contener una lipasa no pancreática humana.
- 10 (21) El método de medición según (19) o (20), en donde el ácido o ácidos biliares de a) se utilizan en la etapa de contacto.
- (22) El método de medición según (19) o (20), en donde el ácido o ácidos biliares de b) se utilizan en la etapa de contacto.
- (23) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (21), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados del ácido glicodesoxicólico (GDCA) y sales de los mismos.
- 15 (24) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (21), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
- (25) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (21), en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados del ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
- 20 (26) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (25), en donde un agente tensioactivo no iónico está presente junto con el diglicérido.
- (27) El método de medición según (26), en donde el agente tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno, y éter de alcohol secundario de polioxietileno.
- 25 (28) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (27), en donde un método colorimétrico se emplea en la etapa de detección.
- (29) El método de medición según uno cualquiera de (19) a (28), en donde el pH es 7,2 o menos en la etapa de contacto.
- 30 (30) Un kit para medir la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que comprende al menos un ácido biliar, un diglicérido y una colipasa,
- en donde un pH en el momento de la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana se ajusta a 7,4 o menos, una concentración del diglicérido en una solución de reacción en la que al menos el ácido biliar, el glicérido y la colipasa que se ponen en contacto con la muestra es de 0,35 a 2,5 mmol/l, y una concentración del ácido biliar se ajusta a diez a veinte veces tan alta como la concentración del diglicérido en términos de una relación molar, y
- 35 el ácido biliar es:
- a) un ácido biliar que contiene uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos, siendo una relación molar del ácido o ácidos biliares tipo a del 40 % o más en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos;
- 40 o
- b) un ácido biliar que contiene una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos, siendo una relación molar del ácido o ácidos biliares tipo 1 b del 30 al 70 % en base a la cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.
- 45 (31) El método de medición según (30), en donde la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana, o una muestra que puede contener una lipasa no pancreática humana.
- (32) El kit según (30) o (31), que comprende además un cromógeno.
- 50 (33) El kit según uno cualquiera de (30) a (32), en donde un pH en el momento de la medición de la actividad se ajusta a 7,2 o menos.

(34) El kit según uno cualquiera de (30) a (33), en donde los contenidos se almacenan de forma separada en una pluralidad de recipientes.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para medir la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra que contiene al menos un ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, un diglicérido y una colipasa, en el que un pH en el momento de la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana se ajusta a 7,4 o menos, y el ácido biliar que hace que el pH proporcione el valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7 es un ácido biliar que contiene: a) uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos; y/o b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

El kit puede contener además un cromógeno. En el kit, un pH en el momento de la medición de la actividad se ajusta a un pH 7,2 o menos. En el kit, los contenidos se pueden almacenar de forma separada en una pluralidad de recipientes.

Alternativamente, otro aspecto de la presente invención es un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que incluye:

1) una etapa de contacto, realizada a continuación al menos en condiciones i), de poner ii) un diglicérido y iii) una colipasa en contacto con la muestra en contacto a un pH de 7,4 o menos, las condiciones i) que incluyen lo siguiente a) y/o b):

a) se involucran uno o dos o más ácidos biliares conjugados (ácidos biliares tipo a) seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA), y sales de los mismos, se puede medir un pH óptimo aparente en la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana, y el ácido o ácidos biliares están presentes en la etapa de contacto en una condición para hacer que el pH óptimo aparente sea inferior a 7,7; y

b) un ácido biliar conjugado (un ácido biliar tipo 1 b) descrito a continuación en b-1) y un ácido biliar no conjugado (un ácido biliar tipo 2 b) descrito a continuación en b-2) están ambos presentes al menos en el momento de la medición en la etapa de contacto en una condición en la que una proporción de presencia (una proporción molar) del ácido biliar tipo 1 b para todos los ácidos biliares (incluyendo sus sales) es 30 % o más y 70 % o menos:

b-1) uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos; y

b-2) uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos; y

2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra.

Por ejemplo, i) descrito anteriormente es a) descrito anteriormente. Además, por ejemplo, en a) descrito anteriormente, un índice de adición del ácido biliar tipo a es 40 % o más en base a una cantidad total de ácidos biliares y/o sales de los mismos. Alternativamente, i) descrito anteriormente es b) descrito anteriormente.

Por ejemplo, el ácido o ácidos biliares tipo a es ácido glicodesoxicólico (GDCA). Alternativamente, el ácido o ácidos biliares tipo a es ácido glicodesoxicólico (GDCA) y ácido taurodesoxicólico (TDCA).

Por ejemplo, ii) descrito anteriormente es una mezcla con un agente tensioactivo no iónico. Ejemplos del agente tensioactivo no iónico incluyen éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno y éter de alcohol secundario de polioxietileno.

Por ejemplo, 2) descrito anteriormente se realiza mediante un método colorimétrico.

Por ejemplo, una concentración de i) descrito anteriormente es diez veces tan alta como la del diglicérido o más en términos de una relación molar.

Por ejemplo, la muestra se pone en contacto con un pH de 7,2 o inferior.

Alternativamente, otro aspecto de la presente invención es una composición para la medición de actividad de la lipasa humana en una muestra que contiene al menos i) descrito a continuación, ii) un diglicérido y iii) una colipasa, y es preparada para tener un pH 7,4 o inferior en el momento de la medición de la actividad, i) que incluyen lo

siguiente a) y/o b):

5 a) un ácido biliar que contiene uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos, y que tiene un pH óptimo aparente medible en la medición de la actividad de la lipasa pancreática inferior a 7,7; y

b) un ácido biliar que contiene tanto un ácido biliar tipo 1 b descrito a continuación en b-1) como un ácido biliar tipo 2 b descrito a continuación en b-2), y que tiene una proporción de presencia (una proporción molar) del ácido biliar tipo 1 b para todos los ácidos biliares (incluyendo sales de los mismos) de 30 % o más y 70 % o menos:

10 b-1) uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos; y

b-2) uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

15 Por ejemplo, la composición contiene un cromógeno. Además, por ejemplo, la composición se prepara para tener un pH de 7,2 o inferior en el momento de la medición de la actividad. La composición puede encontrarse en forma de un kit dividido en una pluralidad de elementos.

Efectos ventajosos de la invención

20 La presente invención puede proporcionar un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra utilizando un diglicérido como sustrato, en el que la influencia de una lipasa no pancreática tal como la lipasa lipoproteica o una lipasa hepática se reduce y se exhibe una alta reproducibilidad.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que ilustra la dependencia de pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en presencia de una sal de sodio de un ácido biliar conjugado según el ejemplo 1.

25 [Figura 2] La figura 2 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en presencia de una sal de sodio de un ácido biliar no conjugado según un ejemplo comparativo del ejemplo 1.

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en presencia de sales de sodio de un ácido biliar tipo 1 b y un ácido biliar tipo 2 b según el ejemplo 2.

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en presencia de un ácido biliar tipo 1 a según el ejemplo 2 con un ácido biliar tipo 1 b añadido.

30 [Figura 5] La figura 5 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana alcanzada al variar una proporción de mezcla (relación molar) entre taurodesoxicolato de sodio (NaTDCA) y desoxicolato de sodio (NaDCA) según el ejemplo 3.

[Figura 6] La figura 6 es un gráfico que ilustra la relación entre la proporción de mezcla entre NaTDCA y NaDCA según el ejemplo 3 y un pH activo de la lipasa pancreática humana.

35 [Figura 7] La figura 7 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática alcanzada al variar una proporción de mezcla (relación molar) entre glicocolato de sodio (NaGCA) y desoxicolato de sodio (NaDCA) según el ejemplo 4.

[Figura 8] La figura 8 es un gráfico que ilustra la relación entre la proporción de mezcla entre NaGCA y NaDCA según el ejemplo 4 y el pH activo de la lipasa pancreática humana.

40 [Figura 9] La figura 9 es un gráfico que ilustra la correlación entre un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana según el ejemplo 5 y un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana obtenida por "Liquitech Lipase Color II".

[Figura 10] La figura 10 es una tabla que muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 8.

[Figura 11] La figura 11 es una tabla que muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 9.

45 [Figura 12] La figura 12 es una tabla que muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 10.

[Figura 13] La figura 13 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra con o sin la administración de heparina al utilizar NaGDCA según el ejemplo 12.

[Figura 14] La figura 14 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa en una muestra

con o sin la administración de heparina al utilizar NaGCA/NaDCA según el ejemplo 12.

[Figura 15] La figura 15 es un gráfico que ilustra la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra con o sin la administración de heparina al utilizar NaDCA según un ejemplo comparativo del ejemplo 12.

5 [Figura 16] La figura 16 es un diagrama de relación entre una relación (relación molar) entre un ácido biliar y un diglicérido, y la actividad de la lipasa pancreática humana según el ejemplo 13.

[Figura 17] La figura 17 es un diagrama de correlación entre un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana obtenido mediante un ejemplo comparativo del ejemplo 16 y un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana obtenido por "Liquitech Lipase Color II".

10 [Figura 18] La figura 18 es un diagrama de correlación entre un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana según el ejemplo 16-3 y un valor medido de la actividad de la lipasa pancreática humana obtenido por "Liquitech Lipase Color II".

15 [Figura 19] La figura 19 es un gráfico que ilustra que una diferencia entre un ácido biliar no conjugado y una sal de sodio del mismo no influye en la dependencia del pH de la actividad de la lipasa pancreática humana según el ejemplo 19.

Descripción de las realizaciones

Ahora se describirá una realización de la presente invención. Sin embargo, cabe destacar que la siguiente realización de la presente invención no tiene por objeto limitar la invención. Varias formas alternativas, ejemplos y técnicas de operación resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la presente descripción. Queda entendido que la presente invención abarca realizaciones modificadas de diversas maneras y similares no descritos en la presente memoria.

20 Un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra según la realización es un método que incluye: 1) una etapa de contacto para llevar a un ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, y preferiblemente 7,4 o menos, un diglicérido y una colipasa en contacto con la muestra a pH 7,4 o menos; y 2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra.

30 En este caso, el ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, y preferiblemente 7,4 o menos es un ácido biliar que contiene: a) uno o dos o más ácidos biliares conjugados, es decir, ácidos biliares tipo a, seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos.

35 Alternativamente, el ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, y preferiblemente 7,4 o menos es un ácido biliar que contiene: b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b, ácidos biliares conjugados, seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b, ácidos biliares no conjugados, seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

40 Alternativamente, el ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, y preferiblemente 7,4 o menos es un ácido biliar que contiene un ácido biliar tipo a y una combinación de ácido biliar tipo 1 b y un ácido biliar tipo 2 b.

A medida que la muestra se mide para la actividad de la lipasa pancreática humana, cualquier muestra se puede utilizar siempre que contenga una lipasa pancreática humana, y es preferiblemente sangre humana, y más preferiblemente suero humano.

45 El ácido biliar tipo a es preferiblemente uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos. Alternativamente, el ácido biliar tipo a es preferiblemente uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos.

50 Además, como alternativa, el ácido biliar tipo a es preferiblemente uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos. Además, como alternativa, el ácido biliar tipo a es preferiblemente uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos.

El ácido biliar tipo a es más preferiblemente uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos. Por consiguiente, un ácido biliar tipo a más preferible es una combinación de ácido glicodesoxicólico (GDCA) o una sal del mismo y ácido taurodesoxicólico (TDCA) o una sal del mismo; ácido glicodesoxicólico (GDCA) o una sal del mismo; o ácido taurodesoxicólico (TDCA) o una sal del mismo. Además, preferiblemente, el ácido biliar tipo a es uno o dos seleccionados del ácido glicodesoxicólico (GDCA) y sales de los mismos, o uno o dos seleccionados del ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.

El ácido biliar tipo a se puede utilizar junto con otro ácido biliar. En este caso, la proporción de presencia (relación molar) del ácido biliar tipo a es preferiblemente 40 % o más en base a la cantidad total de los ácidos biliares y/o sales de los mismos. Si la proporción de presencia (proporción molar) del ácido biliar tipo a es inferior a 40 %, un efecto para mover el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana en el lado ácido tiende a reducirse.

Si se emplea la combinación de ácido biliar tipo 1 b y ácido biliar tipo 2 b, la proporción de presencia (proporción molar) del ácido biliar tipo 1 b para todos los ácidos biliares (incluyendo sales de los mismos) es preferiblemente 30 % o más y 70 % o menos. Si la proporción de presencia (relación molar) del ácido biliar tipo 1 b es inferior a 30 %, una proporción de activación de la lipasa pancreática alcanzada mediante la adición de la colipasa tiende a disminuir, y si supera el 70 %, la sensibilidad en la medición de activación tiende a disminuir.

En la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, la cantidad total de ácidos biliares en una solución de reacción es, por ejemplo, 8 mmol/l o más. Además, la concentración de todos los ácidos biliares, incluyendo las sales de los mismos es, en términos de una relación molar, preferiblemente diez veces tan alta como la concentración del diglicérido o más y veinte veces tan alta como la concentración del diglicérido o menos, y más preferiblemente doce veces tan alta como la concentración del diglicérido o más y veinte veces tan alta como la concentración del diglicérido o menos. Si la concentración es inferior a diez veces tan alta como la del diglicérido, la intensidad de la actividad de la lipasa tiende a ser insuficiente. Si la concentración es más de veinte veces tan alta como la del diglicérido, la concentración total de sales biliares y la sensibilidad están en una relación que corresponde a una curva de saturación a una concentración dada del diglicérido, y por ende, la sensibilidad tiende a disminuir gradualmente. El ácido biliar tipo a, el ácido biliar tipo 1 b y el ácido biliar tipo 2 b están disponibles, por ejemplo, en Sigma-Aldrich y similares. Cabe destacar que la concentración del diglicérido es preferiblemente una concentración que se describe más adelante.

El pH en el momento de la medición de la actividad de lipasa es 7,4 o menos, y preferiblemente 7,2 o menos. Si el pH es superior a 7,4, la medición tiende a ser fácilmente influenciada por una lipasa no pancreática. Además, el pH es preferiblemente 6,0 o superior. Si el pH es inferior a 6,0, se produce una tendencia cuya intensidad suficiente de la actividad de la lipasa no puede ser alcanzada. El pH es más preferiblemente 6,0 o superior y 7,2 o inferior.

Un residuo de ácido graso superior en el diglicérido puede ser cualquiera de los ácidos grasos superiores que tienen 12 o más átomos de carbono. Además, uno de tales ácidos grasos superiores puede utilizarse individualmente o puede utilizarse una combinación de dos de estos diferentes. Por ejemplo, se utilizan preferiblemente un ácido graso superior saturado tal como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido araquídico, y un ácido graso superior insaturado tal como ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico o ácido araquidónico debido a que una solución preparada mediante el uso de un diglicérido, tal como un sustrato tiene una alta transparencia.

Ejemplos de un diglicérido de ácido graso preferibles incluyen, pero no se limitan a, 1,2-dioleil glicerol, 1-palmitoil-2-oleil glicerol, y un diglicérido derivado de lecitina de yema purificada o lecitina de soja purificada.

Un producto comercialmente disponible se puede utilizar como el sustrato de diglicéridos. Alternativamente, el sustrato de diglicéridos puede obtenerse mediante la preparación realizada precedentemente de un fosfátido, tal como 1,2-dioleil gliceril colina, 1-palmitoil-2-oleil gliceril colina, lecitina de yema purificada o lecitina de soja purificada, y permitiendo que la fosfolipasa C actúe en tal fosfátido. Alternativamente, un diglicérido obtenido mediante la conversión de una parte de 1,2-diglicérido en 1,3-diglicérido a través de un tratamiento alcalino realizado en presencia de un agente tensioactivo no iónico (a saber, una mezcla de 1,2-diglicérido y 1,3-diglicérido) se puede utilizar como sustrato de la reacción de la lipasa pancreática humana.

La concentración del diglicérido óptima para la reacción de la lipasa pancreática humana se encuentra, pero no se limita a, un intervalo de preferiblemente 0,35 a 2,5 mmol/l, y más preferiblemente 0,5 a 1,5 mmol/l.

En la etapa de contacto, un agente tensioactivo no iónico está presente preferiblemente junto con el diglicérido. Los ejemplos específicos del agente tensioactivo no iónico incluyen, pero no se limitan a, éter de alcohol superior de polioxi-etileno (POE), etoxilato de alcohol secundario POE, alquil fenil éter POE, éter alquílico POE, éster de ácido graso POE, y éster de ácido graso sorbitán POE. El agente tensioactivo no iónico es preferiblemente un agente tensioactivo no iónico a base de alquil fenil éter POE o un agente tensioactivo no iónico a base de éter alquílico POE. Un ejemplo específico de agente tensioactivo no iónico a base de alquil fenil éter POE incluye nonil fenil éter POE. Además, un ejemplo específico de agente tensioactivo no iónico a base de éter alquílico POE incluye éter

tridecílico POE.

La concentración del agente tensioactivo no iónico a emplear no está especialmente limitada, pero se utiliza preferiblemente en un intervalo de concentración en el que la actividad de una lipasa derivada de páncreas se exprese adecuadamente y no se inhiba, y específicamente, en un intervalo, en términos de una relación molar, de preferiblemente 1,1 a 2,5 veces, y más preferiblemente 1,2 a 2,0 veces tan alta como la del sustrato de diglicéridos. Si la concentración del agente activo de superficie no iónico es superior a 2,5 veces tan alta como la del sustrato de diglicéridos en términos de una relación molar, se produce una tendencia en que la actividad de la lipasa pancreática humana disminuye y la actividad contra una lipasa no pancreática aumenta (véase, por ejemplo, la literatura de patente 3).

El sustrato de diglicéridos y el agente tensioactivo no iónico se pueden preparar como una solución de diglicéridos, es decir, una mezcla de éstos. La solución de diglicéridos se puede obtener, por ejemplo, mediante la adición de una solución tampón que contiene el agente tensioactivo no iónico con el diglicérido, seguido de agitación de 35 °C a 46 °C, preferiblemente de 37 °C a 44 °C, durante 1 a 7 horas, preferiblemente de 1,5 a 4 horas, o seguido de la realización de un tratamiento con ultrasónicos a la temperatura descrita anteriormente durante aproximadamente 30 minutos. El método para obtener la solución de diglicéridos está, sin embargo, no limitado a este método. La solución tampón para disolver el diglicérido puede ser adecuadamente seleccionada de las soluciones tampón que tienen capacidad de tamponamiento en un intervalo de pH de 5 a 9,5.

Un ejemplo específico de la colipasa incluye, pero no se limita a, una colipasa derivada de páncreas de cerdo. Se sabe que la concentración de la colipasa está generalmente en una relación correspondiente a una curva de saturación con la actividad de la enzima lipasa y que la actividad de la lipasa llegar a ser constante a una concentración dada o superior. Por consiguiente, la concentración apropiada de la colipasa en la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana se puede determinar fácilmente de modo experimental. Por ejemplo, si se utiliza una colipasa fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation, la concentración de la colipasa es, pero no se limita a, por ejemplo, 8 a 250 U/l, preferiblemente 10 a 150 U/l, y aún más preferiblemente 10 a 120 U/l.

En la etapa de contacto, una solución tampón se utiliza preferiblemente para mantener el pH a 7,4 o menos. Esto, sin embargo, no limita la realización, pero un ácido tal como ácido clorhídrico o una base tal como hidróxido de sodio se puede utilizar para ajustar el pH. Si se utiliza una solución tampón, se puede utilizar una solución tampón que tiene capacidad de tamponamiento a un pH 7,4 o inferior, por ejemplo, un tampón de Good tal como TES, HEPES, TAPSO, POPSO, tricina, bicina o BES.

En el método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra según la presente realización, los procedimientos tales como el orden de sustancias de mezcla no están especialmente limitados, pero, por ejemplo, desde el punto de vista práctico, las sustancias se pueden dividir en dos reactivos constituyentes que se van a combinar para causar una reacción. En este caso, no hay necesidad de que los dos reactivos tengan el mismo pH siempre que el pH en el momento de la medición de la actividad de lipasa, a saber, en el momento de la mezcla de los dos reactivos, sea 7,4 o inferior. La concentración de la solución tampón no está especialmente limitada, pero se encuentra preferentemente en un intervalo de 10 mmol/l o más a 250 mmol/l.

Además, en este caso, por ejemplo, 1) el diglicérido puede estar contenido en un reactivo con la sal biliar contenida en el otro reactivo, o 2) el diglicérido puede estar contenido en un reactivo con la colipasa contenida en el otro reactivo. En el caso 1), la colipasa se puede añadir a cualquiera o ambos de los reactivos. En el caso 2), el ácido biliar puede estar contenido en cualquiera o ambos de los reactivos.

Al igual que el método empleado en la etapa de detección, por ejemplo, se puede emplear el método colorimétrico u otro método, y un producto producido mediante la reacción de la lipasa pancreática humana se mide adecuadamente mediante la combinación de los sistemas de reacción conocidos. Por ejemplo, al igual que el método colorimétrico, si un monoglicérido producido a partir de un sustrato de diglicéridos se va a convertir mediante el uso de una monoglicérido lipasa en ácido graso y glicerol, el glicerol liberado se detecta mediante la combinación de peróxido de hidrógeno producido en última instancia mediante el uso de glicerol quinasa, glicero-3-fosfato oxidasa o peroxidasa con un donante de hidrógeno en presencia de un acoplador tal como 4-aminoantipirina, a fin de detectar espectroscópicamente el tinte de color. Alternativamente, como un método diferente del método colorimétrico, por ejemplo, se puede emplear un método ultravioleta (UV) en el que el glicerol liberado se combina con glicerol quinasa, ADP-hexoquinasa o glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para detectar el cambio de absorbancia en base a NAD (P) reducido a 340 nm. Por consiguiente, el método empleado en la etapa de detección puede ser adecuadamente seleccionado de dicho método colorimétrico y otros métodos.

Al igual que la monoglicérido lipasa utilizada en el método colorimétrico, el origen no está especialmente limitado siempre que se trate de una enzima que no actúa sobre el diglicérido pero que actúa específicamente sobre el monoglicérido, y desde el punto de vista de un suministro estable, se utiliza preferiblemente una enzima derivada de microorganismos, y se utiliza más preferiblemente una enzima derivada de *Bacillus*. El valor límite inferior de su concentración cuando se utiliza como una enzima acoplada en la reacción de lipasa es preferiblemente 0,5 U/ml o más, y el valor límite superior es preferiblemente 5 U/ml o menos, lo cual no limita la presente realización.

El origen de la gliceroquinasa no está especialmente limitado, pero se utiliza preferiblemente una enzima excelente en estabilidad, y se utiliza más preferiblemente una enzima derivada de *Flavobacterium*. El origen de la glicero-3-fosfato oxidasa no está especialmente limitado, pero desde el punto de vista del suministro estable, se utiliza preferiblemente una enzima derivada de microorganismos, y se utiliza más preferiblemente una enzima derivada de bacterias lácticas.

El peróxido de hidrógeno producido por la reacción de la glicero-3-fosfato oxidasa produce un tinte por medio de condensación oxidativa con peroxidasa, un cromógeno de un reactivo de Trinder y un acoplador. El origen de la peroxidasa no está especialmente limitado, pero se utiliza preferiblemente una enzima derivada de un rábano picante ya suministrada de manera estable. Además, al igual que el donante de hidrógeno, es preferido un derivado de fenol, un derivado de anilina, un derivado de toluidina o similares. Los ejemplos específicos del donante de hidrógeno incluyen N,N-dimetilanilina, N,N-dietilanilina, 2,4-diclorofenol, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS), N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetilanilina (MAPS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina (MAOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS), N-etil-N-sulfopropil-m-anisidina (ADPS), N-etil-N-sulfopropilanilina (ALPS), N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina (DAPS), N-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina (HDAPS), N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina (TOPS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-anisidina (ADOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina (ALOS), N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (HDAOS), N-sulfopropil-anilina (HALPS) y N,N-bis(4-sulfobutil)-3-metil-anilina disodio (TODB) (todos fabricados por Dojindo Laboratories).

La presencia del peróxido de hidrógeno se puede verificar mediante el desarrollo del color de un reactivo de tipo leuco en presencia de peroxidasa. Los ejemplos específicos de dicho reactivo incluyen o-dianisidina, o-tridina, 3,3'-diaminobenzidina y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, todos fabricados por Dojindo Laboratories, y N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)bifenilamina (DA64) y 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)fenotiazina (DA67) ambos fabricados por Wako Pure Chemical Industries Ltd. Además, la detección y la determinación cuantitativa del peróxido de hidrógeno pueden realizarse no sólo mediante un método espectroscópico sino también mediante, por ejemplo, un método de fluorescencia, un método de quimioluminiscencia, un método con electrodos o similares.

Además, ADP, es decir, uno de los productos de glicerol quinasa utilizados en el método UV, se puede convertir en ácido glucosa-6-fosfórico por la hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HK) en presencia de glucosa. El origen de la ADP-HK no está especialmente limitado, pero desde el punto de vista del suministro estable, se utiliza preferiblemente una enzima derivada de microorganismos, y una enzima derivada de *Pyrococcus* extremadamente termófila o se utiliza más preferiblemente una bacteria *Thermococcus* excelente en la estabilidad durante el almacenamiento. La glucosa correspondiente al sustrato de la ADP-HK se puede utilizar en una concentración de 2 a 50 mmol/l. El ácido glucosa-6-fosfórico que corresponde al producto de la ADP-HK se puede convertir en NAD o NADP reducido por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NAD o NADP oxidado. El origen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no está especialmente limitado, pero desde el punto de vista del suministro estable, se utiliza preferiblemente una enzima derivada de microorganismos. En particular, se prefiere una enzima derivada de *Leuconostoc*.

Por ejemplo, puede presentar un glicerol libre en un componente biológico tal como suero utilizado como muestra. Por lo tanto, no importa el método colorimétrico y el método UV que se empleen, el glicerol libre puede provocar un error positivo en la medición de la actividad de la lipasa pancreática. Por consecuencia, es preferible eliminar un glicerol libre presente en una muestra antes de la reacción de la lipasa pancreática.

Si se emplea el método colorimétrico, se prepara un primer reactivo del método colorimétrico que contiene gliceroquinasa, glicero-3-fosfato oxidasa, catalasa o peroxidasa, y un cromógeno de un reactivo de Trinder, tal como un derivado de fenol, un derivado de anilina o un derivado de toluidina, se añade un líquido de ensayo al primer reactivo del método colorimétrico, y la mezcla resultante se calienta precedentemente, de modo que un glicerol libre presente en el líquido de ensayo puede ser eliminado, pero la presente realización no se limita a este método. Ejemplos de cromógeno de un reactivo de Trinder incluyen, pero no se limitan a, los cromógenos antes mencionados. Además, si se emplea el método colorimétrico, se prepara un segundo reactivo del método colorimétrico que contiene un componente de un acoplador tal como 4-aminoantipirina o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). En este caso, si la catalasa se utiliza en el primer reactivo del método colorimétrico, un inhibidor de catalasa, tal como nitrato de sodio puede estar contenido en el segundo reactivo del método colorimétrico. Al mismo tiempo cuando el primer reactivo del método colorimétrico y el segundo reactivo del método colorimétrico se mezclan entre sí, el peróxido de hidrógeno producido por una reacción de glicero-3-fosfato oxidasa produce un tinte por medio de la condensación oxidativa con el cromógeno de un reactivo de Trinder y el acoplador, y por lo tanto, el índice creciente de este tinte se puede medir espectroscópicamente.

Si se emplea el método UV, como un método para evitar la influencia de un glicerol libre, se prepara un primer reactivo del método UV que contiene glicerol quinasa, ADP-hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa y NAD (P), y se añade un líquido de ensayo al primer reactivo del método UV con el fin de convertir precedentemente el glicerol libre en NAD (P) reducido. Además, cuando se añade una oxidasa que actúa sobre glicerol (glicerol oxidasa) al primer reactivo del método UV para convertir el glicerol libre en aldehído, la influencia del glicerol libre puede evitarse. En este caso, sin embargo, glicerol quinasa y/o ATP se añaden a un segundo reactivo del método UV de manera que una reacción de glicerol quinasa no puede ocurrir en el primer reactivo del método

UV. Al igual que la glicerol oxidasa, se puede utilizar cualquier glicerol oxidasa conocida, tal como glicerol oxidasas derivadas de *Aspergillus*, derivadas de *Neurospora* y derivadas de *Penicillium*, lo cual no limita la presente realización (véase, por ejemplo, la literatura no patente 5).

5 Si el cambio de absorbancia basado en NAD (P) reducido se mide por el método UV, la turbidez es provocada al mezclar el reactivo con un tipo dado de muestras, y la turbidez puede influir en la absorbancia en la medición de la longitud de onda de 340 nm en algunos casos. En tal caso, la influencia de la turbidez se puede evitar mediante la medición de un blanco de muestra para cada muestra. Con el fin de aumentar la sensibilidad de la medición, se utiliza preferentemente un sistema de detección que tiene un alto coeficiente de extinción molecular. En este caso, la sensibilidad superior a la alcanzada en la detección que utiliza NAD (P) reducido se puede lograr mediante el uso selectivo de un tinte que tiene un coeficiente de extinción molecular superior al de NAD (P) reducido, tal como tio-NAD (P).

15 El método empleado en la etapa de detección no se limita al método colorimétrico y al método UV, pero se puede emplear cualquier otro método existente o una combinación de estos métodos, y desde el punto de vista de complicación de la medición, la precisión de medición y la sensibilidad de medición, se puede seleccionar apropiadamente un método práctico.

La presente invención se describirá ahora específicamente con referencia a los ejemplos, y cabe destacar que la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

(Ejemplo 1) Tipo de ácido biliar y pH activo de la lipasa pancreática

- Preparación de líquido original de diglicéridos

20 Tras pesar 1,2-dioleoil glicerol (DODG) (fabricado por Nippon Fine Chemical Co., Ltd.) para alcanzar una concentración de 9,32 mmol/l cuando se disuelve, se añadió al mismo 1 % de nonil fenil éter de polioxietileno (10) (NPE) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) que contiene 1,66 mmol/l de MES (fabricado por Dojindo Laboratories) para disolverse en el mismo por agitación a 37 °C durante 2 horas, y el resultante se dejó reposar en hielo durante 2 horas o más. La solución así obtenida se utilizó como un líquido original de sustrato.

25 - Preparación de soluciones de reacción

El líquido original de diglicéridos descrito anteriormente se utilizó para preparar una "solución madre de sustrato" que tiene la siguiente composición:

5,6 mol/l	1,2-dioleoil glicerol
0,6 %	NPE
30 1 mmol/l	MES
3,2 mmol/l	sulfato de magnesio

Se preparó una "primera solución de reacción (R-1)" que tiene la siguiente composición:

75 mmol/l	solución tampón	
4 mmol/l	cloruro de calcio	
35 una concentración descrita más adelante	sal biliar	
3 mmol/l	ATP	
3 mmol/l	NADP	
3.000 U/l	glicerol quinasa (GKZ) (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation)	
40 7.500 U/l	hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HKPII) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)	
3.000 U/l	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (fabricado por Toyobo Co., Ltd.)	
3 mmol/l	glucosa	
3 mmol/l	cloruro de magnesio	

Se preparó una "segunda solución de reacción (R-2)" que tiene la siguiente composición:

45 50 mmol/l	solución tampón
--------------	-----------------

10.000 U/l monoglicérido lipasa (MGLPII) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

60.000 U/l colipasa (COLP) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

Se preparó una "segunda solución de reacción (R-2) para el blanco de la muestra" que tiene la siguiente composición:

5 50 mmol/l solución tampón

60.000 U/l colipasa (COLP) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

- Operación de medición

10 Una mezcla de la solución madre de sustrato y R-1 en una proporción de 1:2 se utilizó como un primer reactivo. R-2 se utilizó directamente como un segundo reactivo. Como una muestra, se utilizó una mezcla de sueros o una muestra de control (un control que contiene una lipasa pancreática). Una proporción en una cantidad entre la muestra, el primer reactivo y el segundo reactivo se establece como muestra: primer reactivo: segundo reactivo de 0,01 ml: 0,18 ml: 0,06 ml. La muestra se añadió al primer reactivo, la mezcla resultante se calentó a 37 °C durante 5 minutos, se añadió el segundo reactivo a la misma, y se obtuvo un índice de cambio de una absorbancia a 340 nm en base a NADP reducido a 37 °C a partir de 3 minutos después de la adición del segundo reactivo hasta 4 minutos

15 después de la adición y, a continuación, la actividad de la lipasa se calculó utilizando un coeficiente de extinción molecular de 6.300 l/mol·cm de NADP reducido. Además, como un blanco de muestra, se utilizó solución salina en lugar de una muestra, se midió una absorbancia utilizando el reactivo para el blanco de la muestra obtenido mediante la eliminación de MGLPII del segundo reactivo, y una diferencia entre los dos valores así medidos se definió como un valor de la actividad enzimática. Para la medición, se utilizó un analizador automático Hitachi Modelo H7170 o H7080.

20

- Medición

25 Al igual que un ácido biliar conjugado que se añade a R-1, se seleccionaron taurodesoxicolato de sodio (NaTDCA), glicodesoxicolato de sodio (NaGDCA), glicoquenodesoxicolato de sodio (NaGCDCA), tauroquenodesoxicolato de sodio (NaTCDCA), glicolato de sodio (NaGCA), taurocolato de sodio (NaTCA) y tauroursodesoxicolato de sodio (NaTUDCA), todo en una concentración de 40 mmol/l, se ajustó R-1, mediante el uso de BES (fabricado por Dojindo Laboratories), respectivamente, a un pH 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,8, y 8,0 y la actividad de la lipasa pancreática humana se midió mediante el uso de estos. El pH de R-2 se ajustó para que sea igual al de R-1.

30 Los resultados de la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana de la mezcla de sueros se muestran en la figura 1. Al utilizar NaTDCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad era de aproximadamente 7, al utilizar NaGDCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad era de aproximadamente 7,2 a 7,4, y al utilizar NaGCDCA o NaTCDCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad era inferior a 6,8. Por lo tanto, en cualquier caso, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana (es decir, el pH óptimo aparente) era inferior a 7,5. Al utilizar NaGCA, NaTCA y NaTUDCA, el grado de la activación era extremadamente bajo y se encontraba por debajo del límite de detección.

35 Como ejemplos comparativos, los ácidos biliares no conjugados de colato de sodio (NaCA), desoxicolato de sodio (NaDCA), quenodesoxicolato de sodio (NaCDCA) y ursodesoxicolato de sodio (NaUDCA) se utilizaron para realizar operaciones similares en diversos pHs. Cabe destacar que la concentración de cada ácido biliar no conjugado se estableció para que fuese de 24 mmol/l en R-1. Además, BES se utilizó para ajustar el pH a 7,2, 7,6, 7,8 y 8,0 y bicina se utilizó para ajustar el pH a 8,2 y 8,5.

40 Los resultados de la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana en una mezcla de sueros según los ejemplos comparativos se muestran en la figura 2. Al utilizar NaDCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad (es decir, el pH óptimo aparente) fue de aproximadamente 8,2, y al utilizar NaCDCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad (es decir, el pH óptimo aparente) era de aproximadamente 7,7. Al utilizar NaUDCA, la medición no pudo realizarse debido a que se originó turbidez en la solución de reacción R-1. Además, al utilizar

45 NaCA, se podría obtener meramente una ligera señal en comparación con el caso en que se utilizó NaDCA.

(Ejemplo 2) Efecto de la combinación de NaTUDCA, NaGCA y NaTCA

- Preparación de soluciones de reacción

Se preparó una "solución madre de sustrato" que tiene la siguiente composición:

50 5,6 mol/l 1,2-dioleoil glicerol

0,6 % NPE

1 mmol/l MES

3,2 mmol/l sulfato de magnesio

Se preparó una "primera solución de reacción (R-1)" que tiene la siguiente composición:

75 mmol/l solución tampón

4 mmol/l cloruro de calcio

5 una concentración descrita más delante una sal biliar

4 mmol/l ATP

3 mmol/l NADP

3.000 U/l GKZ

8.000 U/l ADP-HKPII

10 3.000 U/l G6PD

3 mmol/l glucosa

3 mmol/l cloruro de magnesio

Se preparó una "segunda solución de reacción (R-2)" que tiene la siguiente composición:

50 mmol/l solución tampón

15 10.000 U/l MGLPII

60.000 U/l CoLP

- Operación de medición

De manera similar al ejemplo 1, una mezcla de la solución madre de sustrato y R-1 en una proporción de 1:2 se utilizó como primer reactivo. A excepción de esto, la medición se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1.

20 - Medición

Cada uno de NaGCA, NaTCA y NaTUDCA, es decir, la sal biliar conjugada que no activó suficientemente por separado la lipasa pancreática humana en el ejemplo 1, se combinó con un ácido biliar no conjugado, NaDCA, para examinar el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana (el pH óptimo aparente). Además, NaTCA también se combinó con un ácido biliar conjugado, NaTDCA, para examinar el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana (el pH óptimo aparente). Cabe destacar que un tampón BES se utilizó para ajustar el pH a 6,9, 7,2 y 7,7, y un tampón bicina se utilizó para ajustar el pH a 7,95 y 8,2. En cada una de las combinaciones de NaGCA/NaDCA, NaTCA/NaDCA, NaTUDCA/NaDCA y NaTCA/NaTDCA, la concentración de cada ácido biliar se fijó a 20 mmol/l en R-1. Con respecto a la combinación de NaTCA y NaTDCA, se utilizó como control una concentración de 40 mmol/l de NaTDCA.

30 La figura 3 muestra los resultados obtenidos por las combinaciones de NaGCA/NaDCA, NaTCA/NaDCA y NaTUDCA/NaDCA. Aunque el pH óptimo obtenido mediante el uso de sólo NaDCA en el ejemplo comparativo del ejemplo 1 fue de aproximadamente 8,2, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana (el pH óptimo aparente) se cambió a aproximadamente 7,2 en combinación con NaGCA, aproximadamente 6,9 en combinación con NaTCA, y aproximadamente 7,4 en combinación con NaTUDCA. Además, como se ilustra en la figura 4, de manera similar a los resultados del ejemplo 1, aunque el pH óptimo obtenido mediante el uso de NaTDCA era aproximadamente 7,1, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana (el pH óptimo aparente) se movió más hacia el lado ácido, cuando se utilizó en combinación con TCA. Se entiende lo siguiente a partir de estos resultados: Si bien NaGCA, NaTCA y NaTUDCA eran insuficientes para la activación de la lipasa pancreática humana cuando se utilizan individualmente, si se utilizan en combinación con un ácido biliar específico, la activación de la lipasa pancreática humana puede conseguirse suficientemente, y puede exhibirse un efecto de movimiento, al lado ácido, del pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana.

(Ejemplo 3) Proporción de mezcla entre NaTDCA y NaDCA, y pH activo

45 Las composiciones de los reactivos y la operación de medición fueron las mismas que las del ejemplo 2. Con respecto al ácido biliar conjugado, se examinó NaTDCA que alcanza individualmente el pH óptimo de la lipasa pancreática humana de aproximadamente 7 y el ácido biliar no conjugado NaDCA que alcanza individualmente el pH óptimo de la lipasa pancreática humana de aproximadamente 8,2, mediante el uso de una mezcla de sueros, cómo el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se cambió cuando la

proporción de mezcla (relación molar) se cambió entre los mismos. El tampón BES se utilizó para ajustar el pH a 6,9, 7,1, 7,55 y 7,75, y se utilizó el tampón bicina para ajustar el pH a 7,95, 8,15 y 8,4.

5 Como se ilustra en la figura 5, si el contenido de NaTDCA era del 67 %, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana era de aproximadamente 7,55, y si el contenido era del 33 %, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana era de aproximadamente 8. Además, sobre la base de estos resultados, cuando una proporción de NaTDCA con respecto a todos los ácidos biliares y el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se representan respectivamente en el eje de abscisas y ordenadas, se representan esencialmente de forma lineal como se ilustra en la figura 6. De este modo, se reveló que el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se puede predecir sobre la base de una proporción de mezcla de ácidos biliares.

(Ejemplo 4) Proporción de mezcla de NaGCA y NaDCA, y pH activo

15 Las composiciones de los reactivos y la operación de medición fueron las mismas que las del ejemplo 2. NaGCA fue seleccionado de los ácidos biliares conjugados que no activaron suficientemente por separado la lipasa pancreática humana, y un ácido biliar no conjugado de NaDCA, que alcanza individualmente el pH óptimo de la lipasa pancreática humana de aproximadamente 8,2, se utilizó para cambiar la proporción de mezcla (relación molar) NaDCA/NaGCA, en términos de una concentración final, para que sea 24 mmol/l/0, 16 mmol/l/8 mmol/l, 12 mmol/l/12 mmol/l, 8 mmol/l/16 mmol/l, y 6 mmol/l/18 mmol/l, y se examinó, mediante el uso de una muestra de control (un control que contiene una lipasa pancreática), cómo se cambió el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana. El tampón BES se utilizó para ajustar el pH a 7,2 y 7,6, y se utilizó el tampón bicina para ajustar el pH a 8,0 y 8,5.

20 Los resultados se muestran en la figura 7. A medida que se aumenta la cantidad de NaGCA, el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se mueve hacia el lado ácido, y la sensibilidad se redujo de forma simultánea. Sobre la base de estos resultados, cuando una proporción de NaGCA respecto a todos los ácidos biliares añadidos y el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se representan respectivamente en el eje de abscisas y ordenadas como se ilustra en la figura 8, se representan de forma esencialmente lineal, y de este modo, se reveló que el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana se puede predecir sobre la base de una relación de mezcla entre los ácidos biliares.

(Ejemplo 5) Uso individual del ácido biliar conjugado y reducción de la influencia de una lipasa no pancreática

30 Las composiciones de los reactivos y la operación de medición fueron las mismas que las del ejemplo 2.

- Medición

35 Un reactivo disponible comercialmente para un método colorimétrico de resorufina, "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics utilizando ácido 1,2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutámico-(6-metilresorufina)éster (DGGR), que se considera que no se ve influenciado por una lipasa no pancreática, tal como una lipasa lipoproteica o una lipasa hepática, que aparece en la sangre debido a la administración de heparina, se utilizó para verificar el efecto del presente ejemplo. "Liquitech Lipase Color II" se utilizó según el prospecto, y se utilizó un calibrador especial para el cálculo de la actividad enzimática. Como ejemplo comparativo, un reactivo en el que NaDCA (en una concentración de 40 mmol/l en R-1) se utilizó como ácido biliar y se preparó la solución de reacción que tenía un pH de 8,15 (tampón bicina), y como composiciones del reactivo del presente ejemplo, se prepararon respectivamente (1) un reactivo en el que MOPS (pH 7,0) se utilizó como la solución tampón de R-1 y R-2 y NaTDCA se utilizó como el ácido biliar, (2) un reactivo en el que MOPS (pH 7,0) se utilizó como la solución tampón de R-1 y R-2 y NaGDCA se utilizó como el ácido biliar, y (3) un reactivo en el que BES (pH 7,0) se utilizó como la solución tampón de R-1 y R-2 y NaGCDCA se utilizó como el ácido biliar. La concentración de cada ácido biliar utilizado en el presente ejemplo se ajustó para que fuese la misma que en el ejemplo comparativo.

45 Como muestras, se utilizaron un control, muestras administradas sin heparina (muestras normales), y muestras administradas de heparina. Los resultados se muestran en la tabla 1. En primer lugar, al utilizar NaTDCA, los valores medidos obtenidos en el control y las muestras normales fueron, en comparación con las obtenidos por el ejemplo comparativo, de 77 a 112 %, y los obtenidos en las muestras administradas de heparina fueron del 28 al 52 %, al utilizar NaGDCA, los valores medidos fueron, respectivamente, 76 al 121 % y 32 a 55 %, y al utilizar NaGCDCA, los valores medidos fueron, respectivamente, 70 a 98 % y 26 a 48 %. De este modo, al utilizar cualquiera de los ácidos biliares, la actividad en las muestras administradas de heparina fue notablemente baja en comparación con las obtenidas utilizando el ejemplo comparativo, que revela que la influencia de una lipasa no pancreática, principalmente de una lipasa lipoproteica y una hepática lipasa, se redujo. La figura 9 ilustra la correlación entre los resultados obtenidos por Liquitech Lipase Color II y los resultados obtenidos por el presente ejemplo utilizando NaTDCA como el ácido biliar. Los resultados de las muestras administradas de heparina se distribuyen en esencialmente la misma línea que la de las muestras administradas sin heparina (muestras normales), y de este modo, se verificó el efecto del presente ejemplo.

[Tabla 1]

	(1)	(2)	(3)	(4)	(2)/(1)	(3)/(1)	(4)/(1)	
	Liquitech	Ejemplo comparativo NaDCA Bicina (pH 8,15)	NaTDCA MOPS (7,0)	NaGDCA MOPS (7,0)	NaGCDCA BES (7,0)	NaTDCA	NaGDCA	NaGCDCA
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	%	%	%
Precipath	110,1	128,0	134,6	124,6	109,9	105,2	97,4	85,9
Precinorm	38,8	51,0	52,1	52,2	42,3	102,1	102,4	82,9
Muestra normal 1	27,1	39,1	43,4	47,1	38,1	111,1	120,6	97,5
Muestra normal 2	72,5	95,0	96,4	91,5	75,6	101,4	96,3	79,5
Muestra normal 3	37,4	46,6	50,7	49,7	41,2	108,7	106,5	88,4
Muestra normal 4	34,4	43,5	44,5	32,9	31,7	102,3	75,8	73,0
Muestra normal 5	29,6	40,7	31,7	36,2	28,8	77,8	89,0	70,8
Heparina 1	20,4	76,8	30,1	39,1	30,8	39,2	50,9	40,1
Heparina 2	36,7	86,7	44,2	47,5	41,3	50,9	54,8	47,6
Heparina 3	27,2	112,9	37,9	36,9	29,8	33,6	32,7	26,4
Heparina 4	20,9	101,4	28,9	28,2	31,6	28,5	27,8	31,2
Heparina 5	22,4	68,5	30,1	23,8	17,8	44,0	34,8	26,0
Heparina 6	23,9	69,2	30,1	28,9	22,5	43,4	41,8	32,5
Heparina 7	37,2	138,3	50,4	58,0	51,0	36,4	42,0	36,9
Heparina 8	30,7	126,0	54,7	43,9	36,6	43,4	34,8	29,0
Heparina 9	57,4	168,8	82,4	81,0	75,4	48,8	48,0	44,7

(Ejemplo 6) Combinación de ácidos biliares y reducción de la influencia de una lipasa no pancreática

- 5 Las composiciones de los reactivos fueron las mismas que las del ejemplo 2. Como ejemplo comparativo, NaDCA (en una concentración de 40 mmol/l en R-1) se utilizó como el ácido biliar y la solución de reacción se ajustó a pH 8,15 (por el tampón bicina) para medir una muestra administrada de heparina. Además, al igual que los ácidos biliares conjugados del presente ejemplo, NaGCA, NaTCA y NaTCDCA, que no pudieron demostrar individualmente un efecto de activación suficiente, se utilizaron respectivamente, en combinación con un ácido biliar no conjugado de NaDCA o NaCDCA, y NaGCDCA y NaTCDCA, que mostraron individualmente una activación suficiente, se utilizaron para la medición de una muestra administrada de heparina (BES (pH 7,1), con el ácido biliar contenido en una concentración de 40 mmol/l en R-1 (mientras se mezcla en cantidades idénticas en el empleo de una combinación)).

15 Cabe destacar que se utilizó CRM-001b que contiene una lipasa recombinante pancreática humana disuelta no en agua destilada, sino en una mezcla de sueros como calibrador para calcular la actividad de la lipasa. Como resultado, como se muestra en la tabla 2, los valores de actividad de las muestras administradas de heparina se redujeron en gran medida en el presente ejemplo en comparación con el ejemplo comparativo. Por consiguiente, se reveló que la influencia de la lipasa no pancreática se puede reducir en el presente ejemplo.

[Tabla 2]

	Ejemplo comparativo	Presente ejemplo							
		NaDCA	NaDCA	NaDCA	NaCDCA	NaCDCA	NaCDCA	-	-
Sal biliar libre		NaDCA	NaDCA	NaDCA	NaCDCA	NaCDCA	NaCDCA	-	-
Sal biliar conjugada	-	NaGCA	NaTCA	NaTUDCA	NaGCA	NaTCA	NaTUDCA	NaGCDCA	NaTCDCA
pH	8,15	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
Heparina 1 (U/l)	141,3	44,8	45,5	56,1	42,8	47,7	52,7	47,8	54,5
Heparina 2 (U/l)	58,5	18,6	23,4	29,6	18,5	34,6	36,1	25,9	31,7
Heparina 3 (U/l)	127,3	42,5	42,6	48,6	45,1	63,7	50,0	44,0	48,1

(Ejemplo 7) Evaluación cuantitativa de la influencia de la lipasa no pancreática (dependencia de pH): NaTDCA

5 Al igual que un ácido biliar del presente ejemplo y un ejemplo de referencia, se seleccionó NaTDCA, y se examinó la dependencia del pH con el pH de una solución de reacción cambiado en un intervalo de 6,2 a 7,6. Cabe señalar que un caso de pH 7,6 se utilizó como ejemplo de referencia. Un tampón MES se utilizó para ajustar el pH a 6,2 y 6,4, y se utilizó el tampón BES para el ajuste de los otros pHs. Como muestras, se utilizaron (seis) muestras de control (controles que contienen cada uno una lipasa pancreática) y (nueve) muestras administradas de heparina. Como ejemplo comparativo, NaDCA (en una concentración de 40 mmol/l en R-1) se utilizó como el ácido biliar, y se utilizó una solución de reacción que tiene un pH 8,15 (tampón bicina). Además, se utilizó "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics para verificar el efecto del presente ejemplo. "Liquitech Lipase Color II" se utilizó según el prospecto, y se utilizó un calibrador especial para el cálculo de la actividad de la enzima. Los resultados se muestran en la tabla 3.

15 A continuación, se obtuvo la influencia de la actividad de la lipasa no pancreática según se indica en el supuesto de que el reactivo Liquitech no esté influenciado por la lipasa no pancreática. En primer lugar, con respecto a los valores medidos de la actividad enzimática obtenida en muestras distintas de las muestras administradas de heparina, se obtuvo una ecuación de regresión (una variable independiente X: actividad enzimática alcanzada por Liquitech, una variable dependiente Y: actividad enzimática alcanzada por el ejemplo comparativo o el presente ejemplo). A continuación, con respecto a cada muestra administrada de heparina, la variable Y se calculó como un valor teórico mediante la sustitución del valor medido de la actividad de la enzima obtenida por Liquitech para la variable X de la ecuación de regresión. Posteriormente, con respecto a cada muestra administrada de heparina, el valor realmente medido de la actividad de la enzima obtenida mediante el ejemplo comparativo o el presente ejemplo se dividió por el valor teórico de la variable Y para calcular un porcentaje relativo (%). Los resultados se muestran en la tabla 4. Cabe señalar que el intervalo aceptable de la influencia se fijó provisionalmente en $\pm 20\%$ en referencia al prospecto de "Liquitech Lipase Color II", que describe que la precisión está dentro de $\pm 15\%$ de actividad conocida.

30 Los resultados se muestran en la tabla 4. Como es evidente a partir de la tabla 4, a un pH de 7,4 o inferior, los valores medidos realmente eran más pequeños a 120,0 % de los valores teóricos en promedio, que están dentro del intervalo aceptable, pero a un pH 7,6, los valores realmente medidos fueron 212,1 % en promedio, que es dos veces o más del valor teórico. Por consiguiente, se reveló que la influencia de la lipasa no pancreática se puede reducir a un pH de 7,4 o inferior.

[Tabla 3]

	Liquitech	Ejemplo comparativo	Ejemplo de referencia	Presente ejemplo					
	U/l	pH 8,15	pH 7,6	pH 7,4	pH 7,2	pH 6,9	pH 6,6	pH 6,4	pH 6,2
		U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l
Suero que contiene lp pancreática recombinante	168,2	227,2	168,8	217,3	229,8	233,1	211,9	184,7	180,8
Precipath	110,1	153,3	110,7	152,7	159,2	157,3	140,3	109,5	110,7
Precinorm	38,8	56,7	52,0	57,1	59,5	67,1	52,6	50,0	46,8
Grupo 1	36,6	48,0	39,1	45,4	52,4	53,0	45,2	44,6	42,1
Grupo 2	22,3	24,2	18,3	27,0	28,2	28,0	23,6	24,8	22,8
Suero transparente	26,0	26,8	20,2	31,4	33,8	31,7	28,6	25,4	23,7
Heparina 21	33,6	42,9	34,7	44,5	47,6	48,6	40,9	37,9	35,9
22	37,2	47,9	38,3	49,2	52,6	53,6	45,5	41,7	39,7
23	57,4	76,0	58,6	75,8	80,5	81,7	71,4	63,0	61,0
24	42,1	54,7	43,2	55,7	59,4	60,4	51,8	46,9	44,9
25	35,6	45,7	36,7	47,1	50,4	51,4	43,5	40,0	38,0

[Tabla 4]

	Ejemplo comparativo	Ejemplo de referencia	Presente ejemplo					
	pH 8,15	pH 7,6	pH 7,4	pH 7,2	pH 6,9	pH 6,6	pH 6,4	pH 6,2
	%	%	%	%	%	%	%	%
Heparina 21	150,8	167,2	118,3	99,1	99,9	109,4	110,6	118,4
22	179,7	162,0	107,8	98,5	86,0	93,6	100,8	100,6
23	284,1	281,9	129,2	110,5	114,9	111,4	115,8	112,9
24	259,1	215,2	113,2	96,0	84,4	83,0	91,7	95,4
25	273,6	234,4	127,4	100,2	89,5	91,7	94,7	93,1
Promedio	229,5	212,1	119,2	100,9	94,9	97,8	102,7	104,1

5 (Ejemplo 8) Evaluación cuantitativa del efecto de reducir la influencia de una lipasa no pancreática (pH 7,1, 7,4, 7,6): NaGDCA/NaDCA

En el presente ejemplo, NaGDCA fue seleccionado como el ácido biliar conjugado y se combinó con un ácido biliar no conjugado, NaDCA, (mezclado en cantidades iguales) para examinar el comportamiento de una muestra administrada de heparina con el pH de una solución de reacción cambiado a 7,1, 7,4 y 7,6. Al igual que la solución tampón, se utilizó el tampón BES. Como muestras, se utilizaron (cuatro) muestras de control (controles que contienen cada uno una lipasa pancreática), (diez) muestras normales y (nueve) muestras administradas de heparina. Como ejemplo comparativo, NaDCA (en una concentración de 30 mmol/l en R-1) y NaTDCA (en una concentración de 10 mmol/l en R-1) se utilizaron como el ácido biliar, y la solución de reacción se ajustó a pH 7,95 (tampón bicina). Además, se utilizó "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics para verificar el efecto del presente ejemplo. "Liquitech Lipase Color II" se utilizó según el prospecto, y se utilizó un calibrador especial para el cálculo de la actividad de la enzima. Posteriormente, de la misma manera que en el Ejemplo 7, con

respecto a cada muestra administrada de heparina, el valor realmente medido de la actividad de la enzima obtenida mediante el ejemplo comparativo o el presente ejemplo se dividió por el valor teórico para calcular un porcentaje relativo (%). La influencia de la actividad de la lipasa no pancreática y el intervalo aceptable de la influencia fueron los mismos que los del ejemplo 7.

5 Los resultados se muestran en la figura 10. Como resulta obvio a partir de la figura 10, a un pH 7,4 y 7,1, los valores medidos realmente obtenidos en las muestras administradas de heparina eran más pequeños que 120 % de los valores teóricos en promedio, que están dentro del intervalo aceptable. Por el contrario, como ejemplo de referencia, a un pH 7,6, los valores realmente medidos fueron 194,7 %, y al utilizar el ejemplo comparativo, el valor realmente medido fue de 198 %, que es esencialmente el doble del valor teórico.

10 Por consiguiente, se reveló que si NaGDCA y NaDCA se utilizan en combinación y el pH 7,4 o inferior, la influencia de la lipasa no pancreática puede ser reducida.

(Ejemplo 9) Evaluación cuantitativa del efecto de reducir la influencia de una lipasa no pancreática mediante la combinación de ácidos biliares

15 A modo de ejemplo comparativo, NaDCA y NaTDCA (respectivamente en concentraciones de 30 mmol/l y 10 mmol/l en R-1) se utilizaron como los ácidos biliares, y la solución de reacción se ajustó a pH 7,95 mediante el uso del tampón bicina para medir una muestra administrada de heparina. Además, como el presente ejemplo, NaTDCA, NaGDCA, NaGCA y NaTCA se utilizaron como los ácidos biliares conjugados, NaDCA se utilizó como el ácido biliar no conjugado, y mediante el uso de cada una de las combinaciones de los ácidos biliares no conjugados y conjugados, combinaciones de ácidos biliares conjugados, y combinaciones de dos ácidos biliares conjugados y el ácido biliar no conjugado, como se muestra en la tabla 6, se midió una muestra administrada de heparina (BES (pH 6,9)). Los ácidos biliares se utilizaron en una concentración total en R-1 de 40 mmol/l (cada uno en 20 mmol/l al utilizar dos de ellos, y cada uno en 13,3 mmol/l al utilizar tres de ellos). Además, se utilizó "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics para verificar el efecto del presente ejemplo. "Liquitech Lipase Color II" se utilizó según el prospecto, y se utilizó un calibrador especial para el cálculo de la actividad de la enzima. En cada uno de los ejemplos comparativos y el presente ejemplo, la actividad de la lipasa se calculó utilizando un coeficiente de extinción molecular de 6.300 l/mol cm de NADP reducido. Posteriormente, de la misma manera que en el ejemplo 7, con respecto a cada muestra administrada de heparina, el valor realmente medido de la actividad de la enzima obtenida mediante el ejemplo comparativo o el presente ejemplo se dividió por el valor teórico para calcular un porcentaje relativo (%). La influencia de la actividad de la lipasa no pancreática y el intervalo aceptable de la influencia se calcularon de la misma manera que en el ejemplo 7.

Como resultado, como se ilustra en la figura 11, al usar el ejemplo comparativo, los valores medidos realmente de las cuatro muestras administradas de heparina fueron 204,5 %, en promedio, del valor teórico, pero al utilizar cualquier combinación del presente ejemplo, el valor realmente medido estaba dentro de 100 ± 15 %, que está dentro del intervalo aceptable, y de este modo, la influencia de la lipasa no pancreática se redujo notablemente.

35 (Ejemplo 10) Tipo de agente tensioactivo y evaluación cuantitativa del efecto de reducir la influencia de la lipasa no pancreática

40 En la preparación del líquido original de diglicéridos descrito en el ejemplo 1, se utilizó éter tridecílico de polioxi-etileno (ADEKA TOL TN-100) (fabricado por ADEKA Corporation) como el agente tensioactivo en lugar de nonil fenil éter de polioxi-etileno (10) (NPE) para que sea comparado con el que se prepara utilizando NPE. Cabe señalar que la concentración del agente tensioactivo era la misma. Al igual que el ácido biliar conjugado del presente ejemplo, se seleccionaron NaGDCA y NaTDCA (mezclados en cantidades iguales), y una solución de reacción de pH 7,2 y una solución de reacción de pH 7,4 se prepararon mediante el uso de cada uno de los agentes tensioactivos. Además, como ejemplo comparativo, NaDCA (en 30 mmol/l en R-1) y NaTDCA (en 10 mmol/l en R-1) se utilizaron como los ácidos biliares, y la solución de reacción se ajustó a pH 7,95 mediante el uso del tampón bicina. Además, "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics se utilizó para examinar la influencia de la actividad de la lipasa no pancreática de la misma manera que en el ejemplo 7.

45 Los resultados obtenidos en las muestras administradas de heparina sólo se muestran en la figura 12. Queda entendido a partir de los resultados que los valores medidos realmente estaban dentro de ± 120 % del valor teórico al utilizar cualquiera de los dos agentes tensioactivos, y de este modo no se vieron influenciados por la lipasa no pancreática, pero los valores medidos realmente del ejemplo comparativo utilizando NPE fueron 150 % y 210 %, y de este modo, el ejemplo comparativo se vio influenciado por la lipasa no pancreática.

(Ejemplo 11) Comparación entre pH 7,5 o superior y pH 7,5 o inferior

55 Como ejemplo comparativo, NaDCA y NaTDCA (respectivamente en concentraciones de 30 mmol/l y 10 mmol/l en R-1) se utilizaron como los ácidos biliares, y la solución de reacción se ajustó a pH 7,95 mediante el uso del tampón bicina. Además, NaGDCA (en 40 mmol/l en R-1) se seleccionó como el ácido biliar conjugado, y el efecto se examinó en dos muestras administradas de heparina a un pH de 7,0 en el presente ejemplo y a pH 7,95 en un ejemplo de referencia. En primer lugar, la calibración se llevó a cabo mediante el uso de un suero que contiene LP no pancreática recombinante, y una proporción de mezcla de una lipasa no pancreática en el conjunto de lipasas se

calculó en base a la suposición de que un valor medido de una muestra administrada de heparina obtenida mediante el ejemplo comparativo corresponde a la actividad total de la lipasa pancreática humana y la lipasa no pancreática, y que el valor medido del presente ejemplo corresponde a la actividad de sólo la lipasa pancreática humana.

5 Con respecto a cada uno del presente ejemplo y el ejemplo de referencia, un valor Y teórico de la actividad de la lipasa pancreática humana se calculó según se indica, basándose en el valor medido del ejemplo comparativo obtenido utilizando un coeficiente de extinción molecular, según una ecuación de correlación obtenida sin el uso de una muestra administrada de heparina. Cabe señalar que X representa una variable a sustituir por un valor medido del ejemplo comparativo, a representa una pendiente, y b representa una ordenada en el origen.

$$\text{Actividad de la lipasa pancreática (valor teórico)} = (1 - \text{proporción de mezcla de una lipasa no pancreática}) \times (aX + b)$$

10 Los resultados se muestran en la tabla 5. En primer lugar, la sensibilidad se redujo a aproximadamente 40 % en el ejemplo de referencia empleando pH 7,95 en comparación con el presente ejemplo que emplea un pH 7,0. Además, ya que el pH óptimo de la lipasa no pancreática contenido en la muestra administrada heparina está más cerca del pH 7,95 que del pH 7,0, los valores medidos de la actividad enzimática fueron tan altos como 311,8 % y 492,8 % del valor teórico de la lipasa pancreática. Por el contrario, en el presente ejemplo que emplea un pH 7,0, los valores medidos fueron 98,4 % y 98,5 % del valor teórico de la lipasa pancreática, y de este modo, se reveló que la influencia de la lipasa no pancreática podría evitarse en gran medida.

[Tabla 5]

				Valor medido/valor teórico	
	NaGCDCA			NaGCDCA	
	Ejemplo comparativo	Ejemplo de referencia	Presente ejemplo	Ejemplo de referencia	Presente ejemplo
	pH 7,95	7,95	7,0	7,95	7,0
	U/l	U/l	U/l	%	%
Suero que contiene lp pancreática humana	206,9	72,4	166,1	94,7	99,9
Precipath	134,5	57,3	109,9	111,6	100,9
Precinorm	50,8	24,0	42,3	107,6	99,3
Grupo 1	42,9	19,4	36,9	99,4	101,8
Grupo 2	21,6	15,4	17,5	126,2	89,8
LP de sueros transparentes	22,4	7,5	17,5	60,4	87,0
Heparina 1	99,2	60,7	40,7	311,8	98,4
Heparina 2	104,8	77,0	32,7	492,8	98,5

(Ejemplo 12) Comparación de pH activo entre lipasa pancreática y lipasa no pancreática

20 Con el pH de una solución de reacción cambiado entre 7,4 y 8,4, se midió la actividad de la lipasa en una mezcla de sueros humanos y un suero administrado de heparina. El tampón BES se utilizó para ajustar el pH a 7,4 y 7,55, y se utilizó el tampón bicina para el ajuste de los otros pHs. En el presente ejemplo, NaGDCA y NaGCA (que se combinaron con un ácido biliar no conjugado de NaDCA (mezclados en cantidades iguales para tener una concentración total de 40 mmol/l en R-1)) se utilizaron como los ácidos biliares conjugados. En un ejemplo comparativo, se utilizó NaDCA (bicina, pH 8,15). Los resultados se muestran en las figuras 13, 14 y 15. Mientras que el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana fue de aproximadamente 8,2 al utilizar el ejemplo comparativo como se ilustra en la figura 15, el pH era aproximadamente ligeramente inferior a 7,4 al utilizar el presente ejemplo como se ilustra en las figuras 13 y 14. Por otra parte, con respecto a la muestra administrada de heparina, se incrementó la actividad a medida que el pH se incrementó tanto en los métodos del presente ejemplo como del ejemplo comparativo. Estos resultados revelan que los ácidos biliares del presente ejemplo mueven el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana al lado

ácido, pero no cambia el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa no pancreática. Cabe destacar que se utilizaron diferentes muestras administradas de heparina en este experimento.

(Ejemplo 13) Proporción entre un ácido biliar y un sustrato

5 Al igual que un ácido biliar conjugado del presente ejemplo, NaTDCA se utilizó para examinar la influencia de la concentración del ácido biliar a pH 7,2 (tampón BES). Al igual que un sustrato de diglicéridos, se utilizó 1,2-dioleoil glicerol, y como agente tensioactivo no iónico para disolver el sustrato, se utilizó nonil fenil éter fenil de polioxietileno (10) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en una relación molar de 1,74 respecto al diglicérido. Además, la concentración de sustrato se fijó a una concentración final de 1,40 mmol/l y 1,63 mmol/l. Los resultados se ilustran en la figura 16. Una proporción del ácido biliar al sustrato para la consecución de la actividad máxima de la lipasa fue de aproximadamente 17 cuando la concentración del sustrato fue de 1,40 mmol/l y fue de aproximadamente 15 cuando la concentración fue de 1,63 mmol/l. Además, si la proporción supera 20, la sensibilidad tiende a disminuir.

(Ejemplo 14) Verificación del efecto al utilizar un reactivo del método colorimétrico disponible comercialmente (diglicérido derivado de lecitina de yema)

15 Se utilizó un reactivo disponible comercialmente "Lipase Color Auto Test Wako" (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) utilizando, como sustrato, 1,2-diglicérido preparado a partir de lecitina de yema para verificar el efecto. "Lipase Color Auto Test Wako" está compuesto por un agente de sustrato enzimático (vial liofilizado), un líquido de disolución (un tampón de Good) y una solución activadora (un tampón de Good pH 8,7, 4-aminoantipirina, ácido desoxicólico) y un líquido de sustrato enzimático obtenido disolviendo el agente de sustrato enzimático en el líquido de disolución se utiliza como primer reactivo, y la solución de activación se utiliza como segundo reactivo.

20 Con el fin de examinar el efecto, NaTDCA y NaGDCA en forma de un polvo se añadieron al líquido de disolución en una concentración en el líquido de disolución de 12 mmol/l, y el resultante se ajustó a pH 7,0 con hidróxido de sodio. Además, un tampón BES de 150 mmol/l (pH 7,0) que contenía 6 mmol/l de 4-aminoantipirina se preparó para ser utilizado en lugar de la solución activadora. Específicamente, se excluyó el ácido desoxicólico, es decir, un ácido biliar, contenido en la solución de activación del kit, y se utilizaron NaTDCA y NaGDCA en su lugar. La solución de reacción así obtenida se utilizó para la comparación de un resultado de medición con un resultado obtenido por el reactivo inicial no modificado como se ha descrito anteriormente. Como muestras, se utilizaron nueve muestras administradas de heparina y cinco muestras sin administrar.

25 Los resultados se muestran en la tabla 6. En las muestras administradas sin heparina, el presente ejemplo en el que el tipo de ácido biliar se ha modificado (es decir, el reactivo modificado) alcanzó valores de medición de la actividad del 94 a 108 % de aquellos alcanzados por el reactivo disponible comercialmente sin modificar. En las muestras administradas de heparina, el presente ejemplo alcanzó valores de medición de la actividad de 40 % a 62 % de los alcanzados por el reactivo comercialmente disponible no modificado. Por consiguiente, se reveló que el presente ejemplo puede reducir la influencia de la lipasa no pancreática en una muestra administrada de heparina.

35 [Tabla 6]

	(1)	(2)	(2)/(1)(%)
	reactivo disponible comercialmente	Reactivo modificado	
	U/l	U/l	
Muestra normal 43	38,0	37,0	97,4
44	70,4	70,4	100,0
45	43,5	41,4	95,2
46	36,9	39,6	107,5
47	34,7	32,6	94,0
Heparina 41	88,6	54,6	61,6
Heparina 42	94,6	47,5	50,2
Heparina 43	118,8	47,5	40,0
Heparina 44	101,8	46,6	45,8
Heparina 45	75,4	44,0	58,4

Heparina 46	67,7	39,6	58,5
Heparina 47	141,4	59,0	41,7
Heparina 48	137,5	56,3	41,0
Heparina 49	187,0	97,7	52,2

(Ejemplo 15)

5 Al igual que el ejemplo comparativo, el pH de R-1 y R-2 del Ejemplo 2 se cambiaron al tampón bicina (pH 8,0), y 27 mmol/l de desoxicolato de sodio (NaDCA) y 13 mmol/l de taurodesoxicolato de sodio (NaTDCA) se utilizaron como el ácido biliar en R-1 (en el que la proporción de NaTDCA en todos los ácidos biliares fue del 33 %). Al igual que una composición de reactivo del presente ejemplo, (1) el tampón BES (pH 7,2) se utilizó como las soluciones tampón de R-1 y R-2, y 20 mmol/l de taurodesoxicolato de sodio (NaTDCA) y 20 mmol/l de glicodesoxicolato de sodio (NaGDCA) se añadieron como los ácidos biliares. Además, al igual que otra composición de reactivo del presente ejemplo, se utilizó (2) el tampón BES (pH 7,2) como la solución tampón y no se añadió ácido biliar en R-1, el tampón BES (pH 7,2) se utilizó como la solución tampón y 40 mmol/l de NaTDCA y 40 mmol/l de NaGDCA se añadieron como los ácidos biliares en R-2. De esta manera, se añadieron los ácidos biliares a R-2 en el reactivo (2). Cabe destacar que la concentración final de los ácidos biliares era la misma que en el reactivo (1).

- Operación de medición

15 La misma operación se realizó al igual que en el ejemplo 2, excepto para el cálculo de la actividad. En el presente ejemplo y el ejemplo comparativo, CRM-001b que contiene una lipasa recombinante pancreática humana disuelta no en agua destilada sino en una mezcla de sueros se utilizó como calibrador para calcular la actividad de la lipasa.

- Muestras

Se utilizaron Precipath, Precinorm, diez muestras administradas sin heparina y cinco muestras administradas de heparina.

20 - Medición

25 Los resultados se muestran en la tabla 7. Como es evidente a partir de esta tabla, los reactivos (1) y (2) del presente ejemplo mostraron actividad de la lipasa de 90 a 110 % de la del ejemplo comparativo medido en las muestras administradas sin heparina, pero los valores de actividad de 52 al 69 % de la actividad de la lipasa del ejemplo comparativo se obtuvieron en las muestras administradas de heparina. El presente ejemplo revela que el efecto se puede lograr sin importar cuál de R-1 y R-2 se añada al ácido biliar.

[Tabla 7]

	(A)	(B)	(C)	(B)/(A)	(C)/(A)
	Ejemplo comparativo	Presente Ejemplo (1)	Presente Ejemplo (2)	%	%
	U/l	U/l	U/l		
Precipath	83,3	49,4	59,6	59,2	71,5
Precinorm	82,1	45,7	54,5	55,6	66,3
Muestra normal 41	75,8	79,1	81,3	104,3	107,3
42	129,8	127,7	125,3	98,4	96,5
43	39,7	42,7	41,1	107,6	103,5
44	99,6	95,0	96,8	95,4	97,2
45	47,2	49,7	46,0	105,3	97,3
46	43,7	44,5	41,5	102,0	95,0
47	38,0	40,1	39,5	105,5	103,8
48	26,8	24,1	28,1	90,0	104,7

ES 2 654 437 T3

	49	32,9	33,4	29,7	101,4	90,1
	50	39,5	42,7	42,3	108,1	107,1
Heparina 51		76,6	46,8	51,2	61,1	66,9
Heparina 52		109,5	65,7	67,5	60,0	61,6
Heparina 53		93,3	60,5	64,0	64,9	68,6
Heparina 54		73,4	38,2	44,3	52,1	60,4
Heparina 55		82,1	49,3	54,5	60,0	66,3

(Ejemplo 16) Método colorimétrico

- Preparación del sustrato

5 Tras pesar 1,2-dioleoil glicerol (DODG) (fabricado por Nippon Fine Chemical Co., Ltd.) para alcanzar una concentración de 13,95 mmol/l cuando se disuelve, se añadió 1,2 % de nonil fenil éter de polioxietileno (10) (NPE) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.) que contiene 2,5 mmol/l de MES (fabricado por Dojindo Laboratories) a la misma para disolverse en la misma por agitación a 37 °C durante 4 horas, y el resultante se dejó reposar en hielo durante 2 horas o más.

- Composición del reactivo

10 Ejemplo controlado

(R-1)

1,5 mmol/l MES (pH 6,05)

1,5 mmol/l cloruro de calcio

3 mmol/l sulfato de magnesio

15 3 mmol/l ATP

1,05 mmol/l 1,2-dioleoil glicerol

0,09 % NPE

0,045 % N,N-bis (4-sulfobutilo)-3-metilnilina disodio (TODB) (fabricado por Dojindo Laboratories)

20 90 U/l gliceroquinasa (GKZ) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

90 U/l monoglicérido lipasa (MGLPII) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

3.200 U/l glicerol-3-fosfato oxidasa (GPOM) (fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

25 2.250 U/l peroxidasa (fabricado por Sigma)

(R-2)

150 mmol/l TAPS (pH 8,1)

3 mmol/l 4-aminoantipirina

30 mmol/l desoxicolato de sodio

30 36.000 U/l colipasa

Al igual que el presente ejemplo, se prepararon tres tipos de reactivos. Se describirán según se indica meras diferencias con el ejemplo comparativo antes mencionado:

Ejemplo 16-1

(R-1)

Los siguientes componentes se añadieron además a los componentes de (R-1) descrita anteriormente del ejemplo comparativo:

	12 mmol/l	taurodesoxicolato de sodio
5	12 mmol/l	glicodesoxicolato de sodio

(R-2)

	150 mmol/l	BES (pH 7,0)
	3 mmol/l	4-aminoantipirina
	36.000 U/l	colipasa
10	Ejemplo 16-2	

(R-1) Se utilizaron los mismos componentes que los del ejemplo comparativo.

(R-2)

	150 mmol/l	BES (pH 7,0)
	3 mmol/l	4-aminoantipirina
15	36.000 U/l	colipasa
	15 mmol/l	taurodesoxicolato de sodio
	15 mmol/l	glicodesoxicolato de sodio

Ejemplo 16-3

(R-1)

20 El siguiente componente se añadió adicionalmente a los componentes de (R-1) anteriormente descrita del ejemplo comparativo:

	18.000 U/l	colipasa
--	------------	----------

(R-2)

	150 mmol/l	BES (pH 7,0)
25	3 mmol/l	4-aminoantipirina
	15 mmol/l	taurodesoxicolato de sodio
	15 mmol/l	glicodesoxicolato de sodio

- Muestras

30 Se utilizaron Precipath, Precinorm, Seronorm LIPID, cinco muestras administrados sin heparina y nueve muestras administradas de heparina.

- Medición

La tabla 8 muestra una tabla de comparación sencilla de la composición (1) del ejemplo 16-1, la composición (2) del ejemplo 16-2 y la composición (3) del ejemplo 16-3. Cabe destacar que una relación de mezcla entre la muestra, R-1 y R-2 era de 3:160:80.

35

[Tabla 8]

	(1)	(2)	(3)
R-1	Sustrato Ácido biliar	Sustrato	Sustrato Colipasa
R-2	Colipasa	Ácido biliar Colipasa	Ácido biliar

5 Un reactivo disponible comercialmente para un método colorimétrico de resorufina, "Liquitech Lipase Color II" fabricado por Roche Diagnostics utilizando ácido 1,2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutárico-(6-metilresorufina)éster (DGGR) se utilizó para verificar el efecto. Cabe destacar que para los reactivos del presente ejemplo y el ejemplo comparativo, la actividad se calculó mediante el uso de un calibrador provisional. Los resultados se muestran en la tabla 9. En las muestras administradas sin heparina, la actividad de la lipasa pancreática humana medida al usar el presente ejemplo fue de 87 a 108 %, a saber, esencialmente equivalente a, la actividad medida al usar el ejemplo comparativo, pero en las muestras administradas de heparina, la actividad se redujo en un intervalo del 47 al 68 %, lo que revela que la influencia de la lipasa no pancreática se redujo. Según el presente ejemplo, si el diglicérido y la colipasa están contenidos en diferentes reactivos, el ácido biliar se puede añadir a cualquiera del primer reactivo y segundo reactivo como se entiende a partir de los resultados obtenidos por las composiciones (1) y (2). Alternativamente, si el diglicérido y el ácido biliar están contenidos en diferentes reactivos, la colipasa se puede añadir a cualquiera de los reactivos (tal como se entiende a partir de los resultados obtenidos por las composiciones (2) y (3)).

[Tabla 9]

	Liquitech	Ejemplo comparativo	Presente ejemplo			Presente ejemplo/ejemplo comparativo		
			(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
	U/I		U/I			%	%	%
Precipath	110,1	122,0	119,5	129,9	130,4	97,9	106,4	106,9
Precinorm	38,8	44,9	44,0	45,1	44,9	98,1	100,6	100,1
Mezcla de sueros 1	36,6	39,4	36,4	39,6	39,6	92,3	100,4	100,4
Mezcla de sueros 2	22,3	16,9	15,4	17,9	16,8	91,6	106,0	99,4
Seronorm	6,8	-1,2	-2,0	-2,4	-2,4	168,6	203,3	204,6
LIPID								
Sin heparina	25,8	23,5	23,2	25,1	24,8	98,5	106,8	105,4
administrada 4								
49	26,5	26,8	26,0	29,0	26,2	96,9	108,0	97,8
51	49,5	55,8	55,2	56,5	54,9	98,9	101,2	98,4
53	22,1	21,6	19,7	21,2	20,9	91,2	98,3	96,7
54	28,5	24,0	20,9	25,6	24,3	87,0	106,7	101,3
55	35,5	39,2	36,9	40,1	38,9	94,1	102,3	99,2
56	15,4	14,0	12,9	13,5	12,6	92,1	96,5	90,1
57	38,0	42,5	38,6	42,0	41,8	90,8	98,8	98,3
58	32,0	34,9	33,6	33,8	34,0	96,3	96,8	97,4

Heparina 61	33,9	76,7	47,7	43,0	41,8	62,2	56,0	54,5
Heparina 62	23,1	58,2	31,2	29,9	28,7	53,6	51,5	49,3
Heparina 63	26,2	63,4	42,0	35,2	35,9	66,3	55,6	56,7
Heparina 64	22,4	34,0	20,3	18,8	17,5	59,8	55,5	51,5
Heparina 65	23,9	45,4	21,4	27,0	25,3	47,3	59,6	55,7
Heparina 66	30,7	70,5	38,0	36,7	35,9	53,9	52,0	51,0
Heparina 67	57,4	115,2	77,5	74,3	72,9	67,3	64,6	63,3

Además, la correlación entre “Liquitech Lipase Color II” y el ejemplo comparativo se ilustra en la figura 17. Queda entendido que los valores medidos de las muestras administradas de heparina se desvían en gran medida de la línea de regresión de las muestras administradas sin heparina en comparación con los obtenidos mediante el uso de Liquitech. Por el contrario, en la correlación entre “Liquitech Lipase Color II” y el presente ejemplo como se ilustra en la figura 18, tal desviación se mejora, y los valores medidos de las muestras administradas de heparina se encuentran en su mayoría en la línea de regresión de las muestras administradas sin heparina. Por consiguiente, se reveló que el presente ejemplo puede reducir la influencia de la lipasa no pancreática en una muestra administrada de heparina.

5

(Ejemplo 17) Relación entre el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana y el pH en el momento de la medición de la actividad

10

NaGDCA fue seleccionado como el ácido biliar conjugado, NaCDCA fue seleccionado como el ácido biliar no conjugado, y soluciones de reacción similares a las del ejemplo 2 fueron utilizadas. Las concentraciones de NaGDCA y NaCDCA en R-1 se establecieron, respectivamente, a 16 mmol/l y 24 mmol/l, y el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana a estas concentraciones se descubrió que era aproximadamente 7,6.

15

A continuación, se utilizó esta composición, con pH ajustado a 7,1 y 7,6, para llevar a cabo la medición en muestras de control (controles que contienen cada uno una lipasa pancreática), incluyendo dos muestras administradas de heparina. Al mismo tiempo, la medición se llevó a cabo mediante el uso de la composición del presente ejemplo que contiene NaGDCA y NaTDCA (en 20 mmol/l en R-1) (tampón MES, pH 6,2). El coeficiente de extinción molecular de NADP reducido se utilizó para calcular la actividad enzimática. La sensibilidad en una mezcla de sueros que contiene una LP recombinante pancreática humana lograda por la combinación de NaGDCA y NaCDCA fue de aproximadamente 80 % a un pH 7,1 en el supuesto de que la sensibilidad lograda a un pH 7,6, es decir, el pH óptimo, fuese del 100 %. Se supuso que un valor medido obtenido en un suero administrado de heparina al usar la combinación de NaGDCA y NaTDCA y al utilizar la solución de reacción de pH 6,2 refleje un valor de la actividad de la lipasa pancreática humana no influenciado por la actividad de la lipasa no pancreática, y los valores medidos al utilizar la composición que contiene la combinación de NaGDCA y NaCDCA a pHs 7,1 y 7,6 eran respectivamente reducidos al utilizar un calibrador para evaluar la influencia de la lipasa no pancreática.

20

25

Los resultados se muestran en la tabla 10. Los valores medidos de la lipasa en las muestras administradas de heparina fueron 182 % y 137 % en términos de un valor relativo a pH 7,6, pero eran 118 % y 100 % a pH 7,1, y de este modo, la influencia de la lipasa no pancreática se redujo. Estos resultados revelan que, incluso si el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana no concuerda con el pH en el momento de la medición de la actividad lipasa, el efecto del presente ejemplo puede ser exhibido siempre que el pH en el momento de la medición de la actividad de lipasa sea 7,4 o inferior. Además, si el pH en el momento de la medición de la actividad de la lipasa fue de 7,6, el valor relativo (%) superó el 120 %, y por lo tanto, se reveló que esta medición fue influenciada por la lipasa no pancreática en un 20% o más.

30

35

[Tabla 10]

	Valor de referencia	Valor medido			Valor reducido		Valor reducido/valor de referencia (%)	
Ácido biliar conjugado	NaGDCA	NaGDCA			NaGDCA		NaGDCA	
	NaTDCA							
Ácido biliar no conjugado		NaCDCA			NaCDCA		NaCDCA	
	pH 6,2	pH 7,1	pH 7,6	pH 7,1	pH 7,6	pH 7,1	pH 7,6	
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	%	%	
Suero que contiene lp recombinante pancreática humana	180,8	130,8	163,1	180,8	180,8	100,0	100,0	
Precipath	110,7	78,2	97,2	108,1	107,7	97,6	97,3	
Precinorm	46,8	33,5	40,3	46,4	44,6	99,0	95,3	
Mezcla de sueros 1	42,1	29,4	35,9	40,6	39,8	96,5	94,6	
Mezcla de sueros 2	22,8	14,9	17,7	20,6	19,6	90,2	85,8	
Heparina 71	31,3	26,8	51,4	37,0	57,0	118,3	182,0	
Heparina 72	50,8	37,1	62,9	51,3	69,7	101,0	137,2	

5 (Ejemplo 18) Relación entre el pH que proporciona un valor máximo de la actividad lipasa pancreática humana y el pH en el momento de la medición de la actividad

10 En el presente ejemplo, NaTDCA fue seleccionado como el ácido biliar conjugado, NaDCA fue seleccionado como el ácido biliar no conjugado, y se utilizaron las soluciones de reacción similares a las del ejemplo 2. Las concentraciones de NaTDCA y NaDCA en R-1 se establecieron, respectivamente, a 27 mmol/l y 13 mmol/l, y el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana a estas concentraciones se descubrió que era aproximadamente un pH 7,55.

15 A continuación, se utilizó esta composición, con pH ajustado a 7,1, 7,55 y 7,75, para llevar a cabo la medición en muestras de control (controles que contiene cada uno una lipasa pancreática), incluyendo dos muestras administradas de heparina. De la misma manera que en el ejemplo 17, la composición del presente ejemplo contiene NaGDCA y NaTDCA (en 20 mmol/l en R-1) (tampón MES, pH 6,2) se sometió a la medición para evaluar la sensibilidad y la influencia de la misma manera que en el ejemplo 17.

20 Los resultados se muestran en la tabla 11. La sensibilidad en una mezcla de sueros que contiene una LP recombinante pancreática humana lograda por una mezcla 2:1 de NaTDCA y NaDCA fue de aproximadamente 83 % a pH 7,1 en el supuesto de que la sensibilidad alcanzara un pH 7,55, es decir, el pH óptimo, era 100 %. Por otra parte, los valores medidos de la lipasa en muestras administradas de heparina fueron, en términos de un valor relativo, 258,9 % y 244,5 %, y 156,3 % y 168,2 %, respectivamente, a pH 7,75 y 7,55, pero fueron 109,4 % y 103,0 % en pH 7,1, y de este modo, se redujo la influencia de la lipasa no pancreática.

25 De manera similar a los resultados del ejemplo 17, estos resultados revelan que, incluso si el pH que proporciona un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana no concuerda con el pH en el momento de la medición de la actividad lipasa, el efecto del presente ejemplo puede ser exhibido siempre que el pH en el momento de la medición de la actividad de lipasa sea 7,4 o inferior. Además, si el pH en el momento de la medición de la actividad de la lipasa era 7,55, el valor relativo (%) superó el 120 %, y por lo tanto, se reveló que esta medición fue influenciada por la lipasa no pancreática en un 20 % o más.

[Tabla 11]

	Valor de referencia	Valor medido				Valor reducido			Valor reducido/valor de referencia (%)		
		pH 6,2	pH 7,1	pH 7,55	pH 7,75	pH 7,1	pH 7,55	pH 7,75	pH 7,1	pH 7,55	pH 7,75
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	%	%	%	
Ácido biliar conjugado	NaGDCA										
	NaTDCA		NaTDCA		NaTDCA			NaTDCA			
Ácido biliar no conjugado			NaDCA		NaDCA			NaDCA			
Suero que contiene lp recombinante pancreática humana	180,8	204,8	247,5	238,7	180,8	180,8	180,8	100,0	100,0	100,0	
Precipath	110,7	122,5	147,5	142,7	108,1	107,7	108,1	97,6	97,3	97,6	
Precinorm	46,8	52,5	61,1	61,2	46,4	44,6	46,4	99,0	95,3	99,0	
Mezcla de sueros 1	42,1	46,0	54,5	53,6	40,6	39,8	40,6	96,5	94,6	96,5	
Mezcla de sueros 2	22,8	23,3	26,8	27,2	20,6	19,6	20,6	90,2	85,8	90,2	
Heparina 71	31,3	38,8	67,0	107,0	34,2	48,9	81,0	109,4	156,3	258,9	
Heparina 72	50,8	59,3	117,0	164,0	52,3	85,4	124,2	103,0	168,2	244,5	

(Ejemplo 19) Comparación de ácido biliar no conjugado y sal del mismo

- 5 Con respecto a una combinación de ácido taurodeoxicólico y un ácido desoxicólico, un reactivo se preparó utilizando ácido desoxicólico (DCA), es decir, un ácido biliar no conjugado, en lugar de desoxicolato de sodio utilizado en el ejemplo 3. El ácido taurodeoxicólico se fijó en forma de una sal de sodio. Como se ilustra en la figura 19, si la proporción entre el ácido taurodesoxicólico y el ácido desoxicólico se fijó a 24/12 mmol/l y 0/36 mmol/l, no había ninguna diferencia en los resultados obtenidos entre un caso en que se utilizó la sal de sodio y un caso en que se utilizó el ácido no conjugado. Por consiguiente, se reveló que la medición de la actividad de la lipasa pancreática humana del presente ejemplo no se vio afectada si un ácido biliar utilizado está en forma o no de una sal.

Aplicabilidad industrial

- 15 La presente invención puede proporcionar un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra en la que se reduce la influencia de una lipasa no pancreática y se exhibe una alta reproducibilidad, y puede ser utilizado para la medición de una lipasa pancreática humana como un marcador de diagnóstico para una enfermedad pancreática, tal como pancreatitis aguda.

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición para la actividad de la lipasa pancreática humana en una muestra, que comprende:

5 1) una etapa de contacto para poner un ácido biliar que hace que un pH proporcione un valor máximo de la actividad de la lipasa pancreática humana inferior a 7,7, un diglicérido y una colipasa en contacto con la muestra a un pH 7,4 o inferior; y

2) una etapa de detección para detectar una cantidad de señal que varía según la actividad de la lipasa pancreática humana en la muestra,

en donde el ácido biliar es un ácido biliar que contiene:

10 a) uno o dos o más ácidos biliares tipo a seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoenodesoxicólico (GCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido tauroenodesoxicólico (TCDCA) y sales de los mismos; y/o

15 b) una combinación de uno o dos o más ácidos biliares tipo 1 b seleccionados del grupo que consiste en ácido glicocólico (GCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y sales de los mismos, y uno o dos o más ácidos biliares tipo 2 b seleccionados del grupo que consiste en ácido desoxicólico (DCA), ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sales de los mismos.

2. El método de medición según la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana.

20 3. El método de medición según la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido o ácidos biliares de a) se utilizan en la etapa de contacto.

4. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cuando se utiliza el ácido o ácidos biliares de a), un índice de adición del ácido o ácidos biliares tipo a es 40 % o más en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.

25 5. El método de medición según la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido o ácidos biliares de b) se utilizan en la etapa de contacto.

6. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados de ácido glicodesoxicólico (GDCA) y sales de los mismos.

30 7. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno, o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.

8. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados de ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.

9. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde un agente tensioactivo no iónico está presente junto con el diglicérido.

35 10. El método de medición según la reivindicación 9, en donde el agente tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno y éter de alcohol secundario de polioxietileno.

11. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se emplea un método colorimétrico en la etapa de detección.

40 12. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde una concentración de todos los ácidos biliares es diez veces tan alta como una concentración de diglicéridos o más en términos de una relación molar en la etapa de contacto.

13. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el pH es 7,2 o inferior en la etapa de contacto.

45 14. El método según la reivindicación 1, en donde una concentración de diglicéridos es 0,35 a 2,5 mmol/l, y una concentración de ácido biliar es diez a veinte veces tan alta como la concentración de diglicéridos en términos de una relación molar, y

50 en donde una relación molar del ácido o ácidos biliares tipo a es 40 % o más en base a una cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos; o una relación molar del ácido o ácidos tipo 1 b es 30 a 70 % en base a la cantidad total de todos los ácidos biliares y/o sales de los mismos.

15. El método de medición según la reivindicación 14, en donde la muestra es una muestra que puede estar contaminada con una lipasa no pancreática humana.
16. El método de medición según la reivindicación 14 o 15, en donde el ácido o ácidos biliares de a) se utilizan en la etapa de contacto.
- 5 17. El método de medición según la reivindicación 14 o 15, en donde el ácido o ácidos biliares de b) se utilizan en la etapa de contacto.
18. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados de ácido glicodesoxicólico (GDCA) y sales de los mismos.
- 10 19. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos o más seleccionados del grupo que consiste en ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
20. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el ácido o ácidos biliares tipo a es uno o dos seleccionados de ácido taurodesoxicólico (TDCA) y sales de los mismos.
- 15 21. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en donde un agente tensioactivo no iónico está presente junto con el diglicérido.
22. El método de medición según la reivindicación 21, en donde el agente tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éter alquílico de polioxietileno, alquil fenil éter de polioxietileno y éter de alcohol secundario de polioxietileno.
- 20 23. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en donde se emplea un método colorimétrico en la etapa de detección.
24. El método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en donde el pH es 7,2 o inferior en la etapa de contacto.

Fig. 1

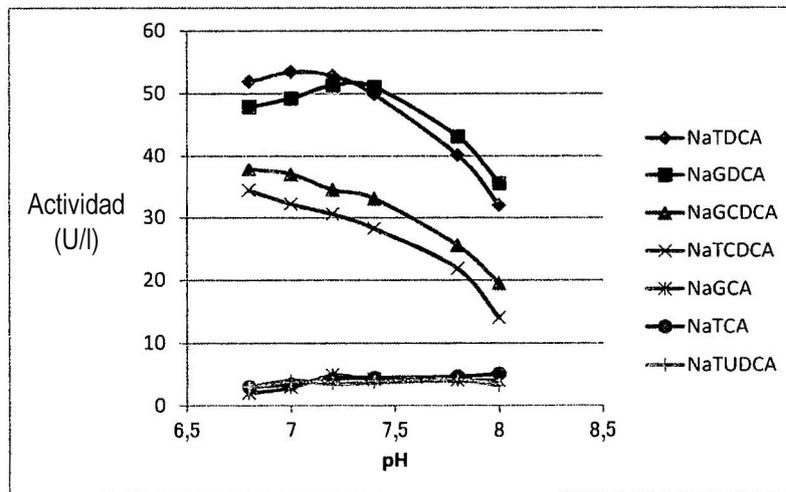


Fig. 2

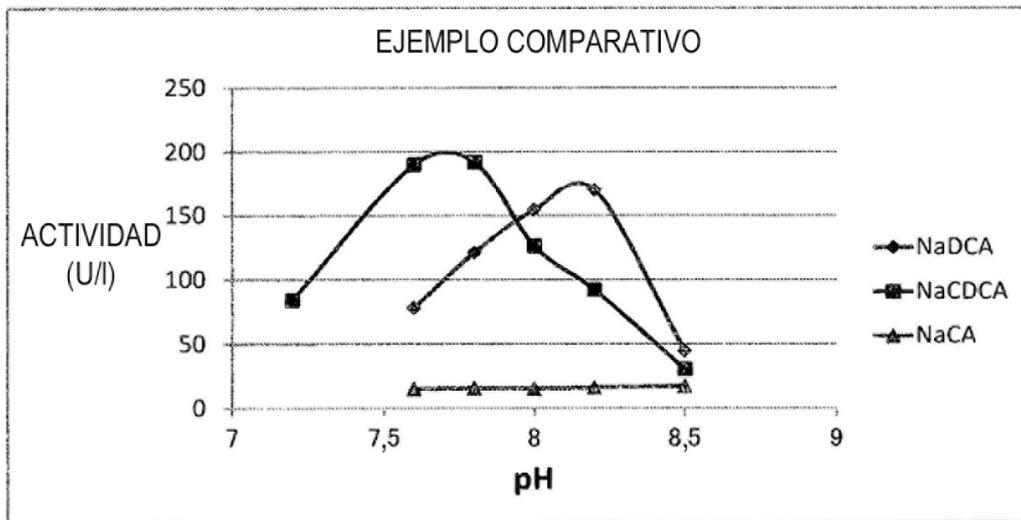


Fig. 3

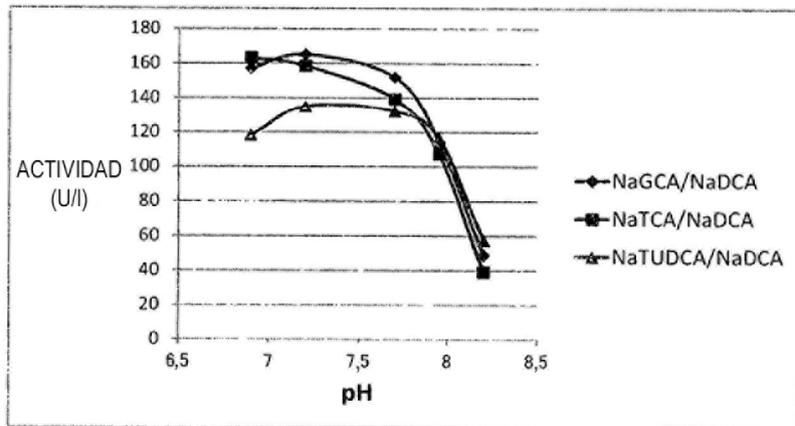


Fig. 4

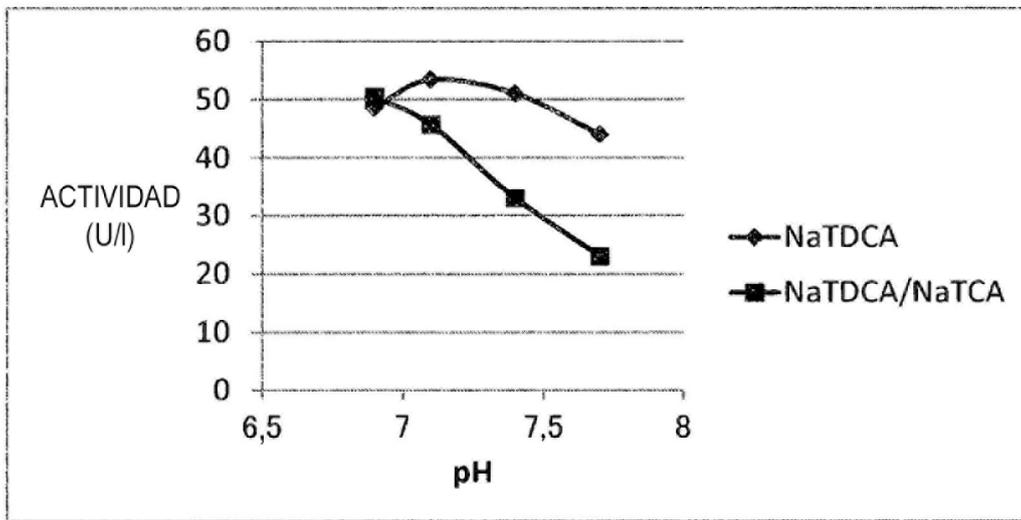


Fig. 5

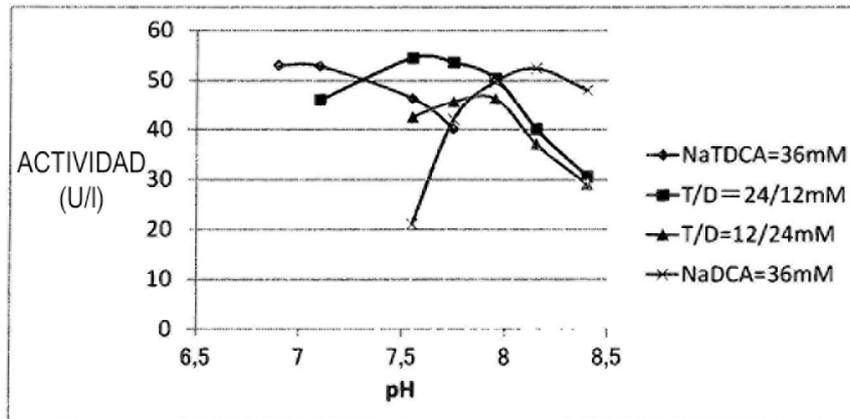


Fig. 6

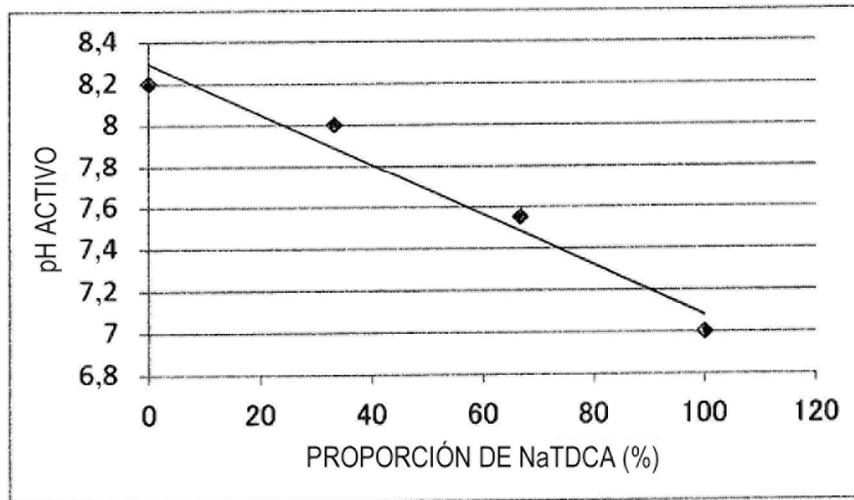


Fig. 7

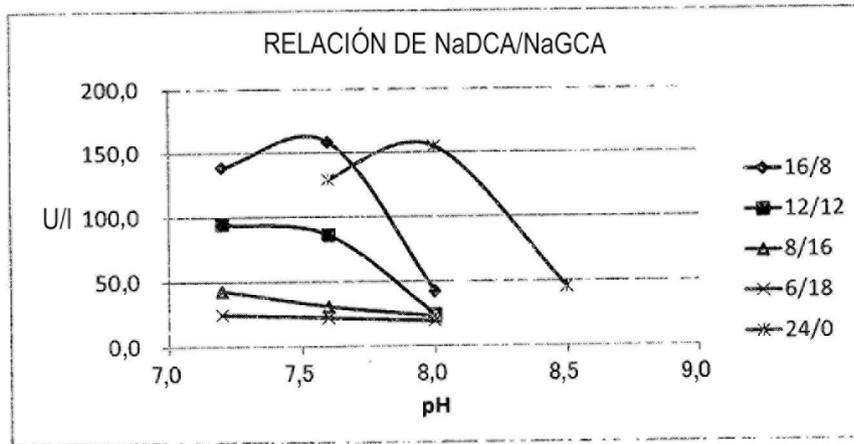


Fig. 8

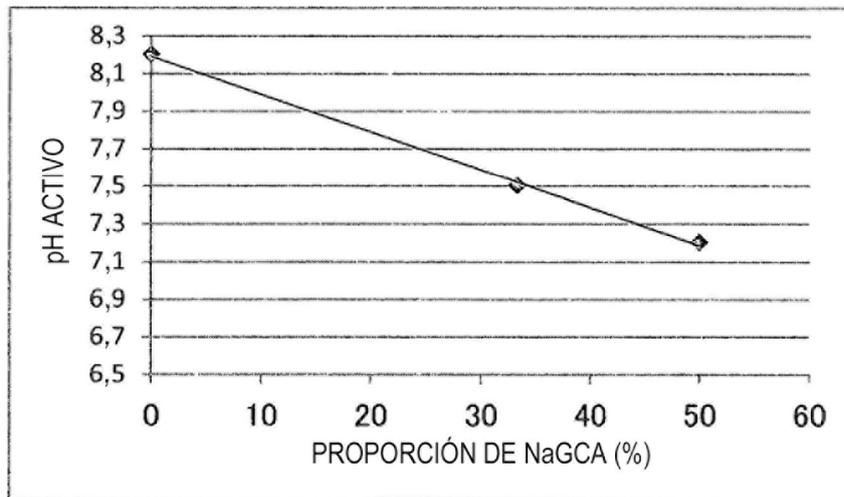


Fig. 9

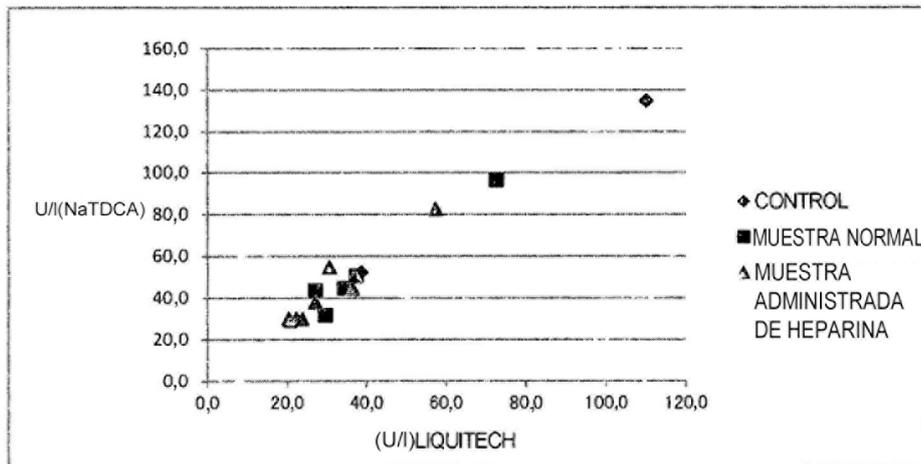


Fig. 12

	VALOR MEDIDO/VALOR TEÓRICO					
	EJEMPLO CONTROLADO	PRESENTE EJEMPLO	PRESENTE EJEMPLO	EJEMPLO CONTROLADO	PRESENTE EJEMPLO	PRESENTE EJEMPLO
AGENTE TENSIÓACTIVO	NPE	NPE	ADEKA TOL TN-100	NPE	NPE	ADEKA TOL TN-100
SAL BILIAR NO CONJUGADA	NaDCA(30mM)			NaDCA(30mM)		
SAL BILIAR CONJUGADA	NaGDCA(20mM)	NaGDCA(20mM)	NaGDCA(20mM)	NaGDCA(20mM)	NaGDCA(20mM)	NaGDCA(20mM)
		TDCA(20mM)	NaTDCA(20mM)		NaTDCA(20mM)	NaTDCA(20mM)
pH	pH7.95	pH7.2	pH7.2	pH7.95	pH7.2	pH7.2
	U/I	U/I	U/I	%	%	%
MUESTRA A ADMINISTRADA DE HEPARINA	74.2	40.0	28.3	209.5	116.3	118.1
MUESTRA B ADMINISTRADA DE HEPARINA	97.2	74.0	51.9	150.2	111.7	106.6
			63.0		83.4	110.1

Fig. 13

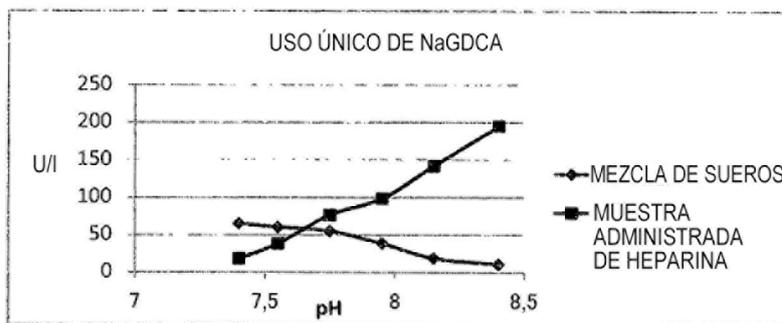


Fig. 14

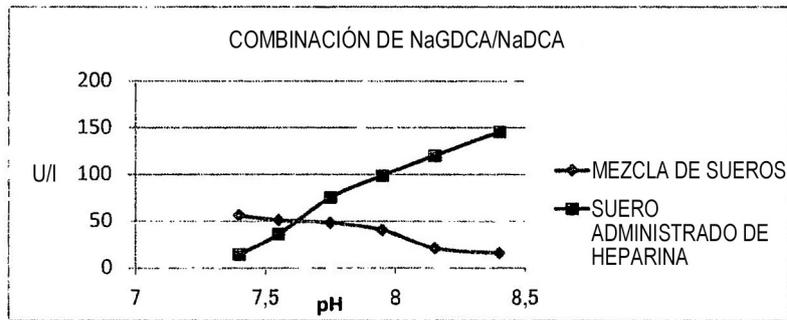


Fig. 15

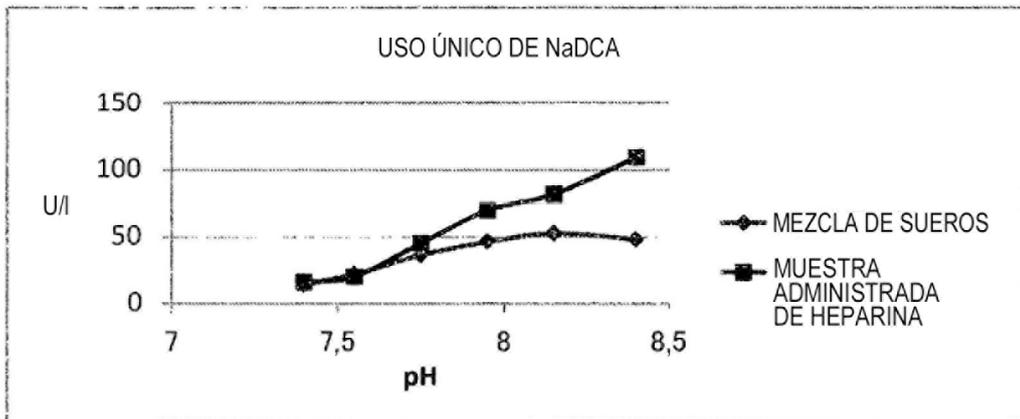


Fig. 16

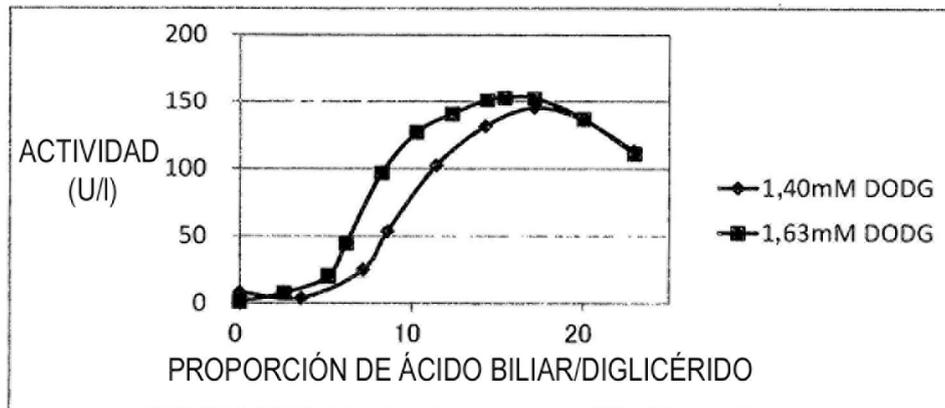


Fig. 17

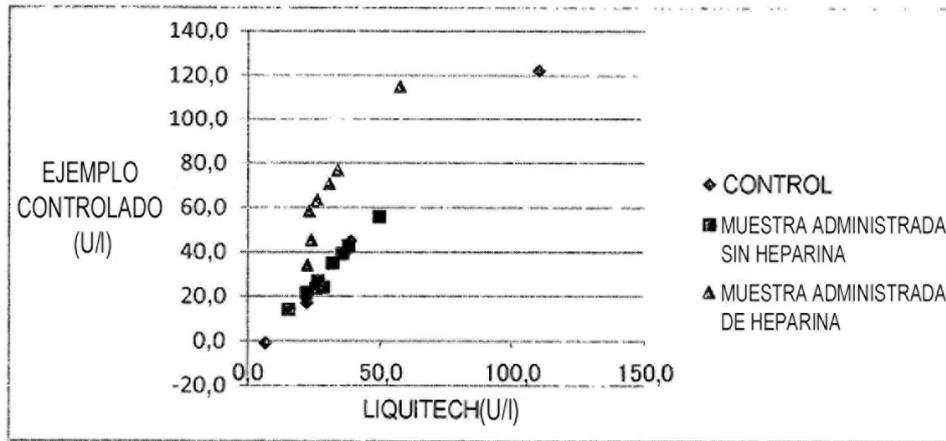


Fig. 18

EJEMPLO 16-3

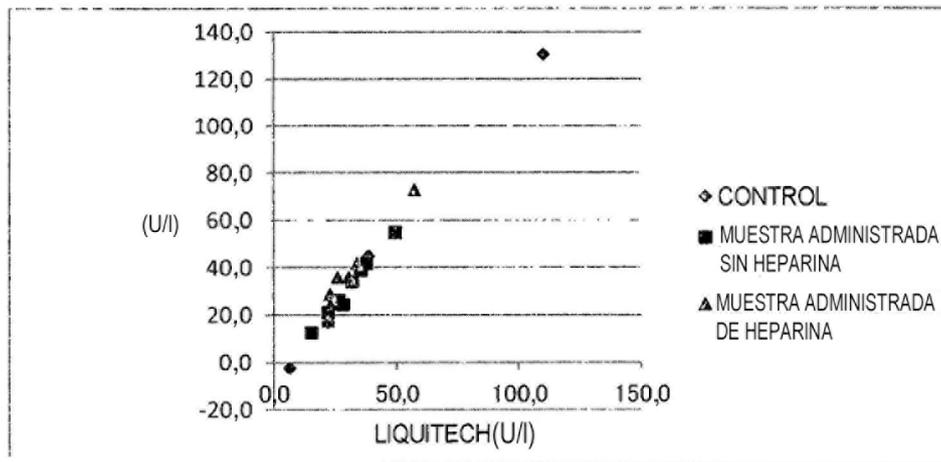


Fig. 19

