

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 475**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2015 PCT/JP2015/072543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16024549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2015 E 15832348 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3181689**

54 Título: **Proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa y método de simplificación de la producción**

30 Prioridad:

12.08.2014 JP 2014164107

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

09.06.2020

73 Titular/es:

**SHINO-TEST CORPORATION (100.0%)
7-9, Kanda-Surugadai 3-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8410, JP**

72 Inventor/es:

**IIZUKA, NAOMI y
HIKICHI, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 765 475 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

Proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa y método de simplificación de la producción

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un proceso de producción de una solución de sustrato usada para medir la actividad lipasa en una muestra. El proceso puede hacer que la producción de la solución de sustrato sea más simple que los métodos convencionales.

10

Además, la divulgación se refiere a un método de simplificación de la producción de la solución de sustrato como en el proceso de producción anterior.

15

La presente invención es útil en los campos de las ciencias de la vida (por ejemplo, pruebas de laboratorio clínico) y de la química (por ejemplo, química analítica).

Antecedentes de la técnica

20

La actividad lipasa en suero o plasma aumenta en las enfermedades pancreáticas (por ejemplo, pancreatitis aguda y crónica o cáncer de páncreas), por lo que la actividad lipasa es un marcador útil para la pancreatitis, etc.

25

La lipasa es una enzima que cataliza una reacción en la que los enlaces éster (en la posición α (posiciones 1 y 3)) de un triglicérido (TG) (tres moléculas de ácido graso de cadena larga están unidas mediante un enlace éster al glicerol) se hidrolizan para producir dos moléculas de ácido graso y una molécula de β -monoglicérido.

Esta molécula de β -monoglicérido se isomeriza a α -monoglicérido, que luego es hidrolizado por la lipasa, produciendo un glicerol y un ácido graso.

30

Los ejemplos de un ensayo de medición de la actividad lipasa en suero o plasma incluyen los siguientes ensayos (véanse los Documentos no de patente 1 y 2).

35

Los ejemplos conocidos incluyen un método de Cherry-Crandall, en el que se usa una emulsión de aceite de oliva como sustrato de lipasa; esta emulsión de aceite de oliva se prepara para entrar en contacto y reaccionar con, por ejemplo, una muestra de suero a 37 °C durante 24 horas; y luego un ácido graso que haya sido generado mediante hidrólisis por la lipasa, se valora con un álcali.

40

En este método, sin embargo, el tiempo de reacción es largo, la lipasa de interés se puede inactivar y, por lo tanto, la reacción se inhibe notablemente.

45

Otro ejemplo conocido es un método de Vogel-Zieve y un método modificado del mismo en el que se usa una emulsión de trioleína o de aceite de oliva como sustrato de lipasa; esta emulsión de trioleína o de aceite de oliva se prepara para entrar en contacto y reaccionar con, por ejemplo, una muestra de suero; las micelas emulsionadas son luego hidrolizadas por la lipasa para causar una disminución en la turbidez de la solución de reacción resultante; y la actividad lipasa se determina a partir de la disminución.

50

Estos métodos, sin embargo, implican inhibición y/o interferencia mediada por proteínas séricas debido a la agregación inducida por el factor reumatoide, de modo que es difícil producir una emulsión uniforme y estable. También, los métodos son poco reproducibles y, por lo tanto, desventajosos.

55

Otro ejemplo conocido es un ensayo de medición de la actividad lipasa en el que se usa BALB (tributirato de 2,3-dimercapto-1-propanol) como sustrato de lipasa; este BALB se prepara para entrar en contacto y reaccionar con, por ejemplo, una muestra de suero; BAL (2,3-dimercapto-1-propanol), que haya sido generado mediante hidrólisis por la lipasa, se hace reaccionar con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico); y la luz amarilla emitida por el anión TNB resultante se mide a 412 nm.

60

Este ensayo, sin embargo, implica la interferencia con una esterasa hepática en condiciones altamente concentradas. Por consiguiente, la esterasa hepática se mezcla a través de una celda de reacción o una boquilla (sonda) de un reactivo de ensayo de medición de otro elemento. Esto afecta a un valor medido y provoca un error, de modo que este ensayo es, por tanto, desventajoso.

65

Otro ejemplo conocido es un ensayo de medición de la actividad lipasa en el que el 1,2-dilinoileoilglicerol, que es un sustrato natural, se usa como un sustrato de lipasa; este 1,2-dilinoileoilglicerol se pone en contacto y reacciona con, por ejemplo, una muestra de suero: el ácido linoleico, que haya sido generado mediante hidrólisis por la lipasa, coopera, en presencia de la coenzima A, NAD⁺ y ATP, con acil-CoA sintetasa, Acil-CoA oxidasa y un complejo multienzimático de enoil-CoA hidratasa-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa-3-cetoacil-CoA tiolasa para realizar la

oxidación β ; y luego se mide la tasa de producción de NADH cuando se produce la oxidación β .

Este ensayo, sin embargo, también implica la interferencia con una esterasa hepática en condiciones altamente concentradas. Por consiguiente, la esterasa hepática se mezcla a través de una celda de reacción o una boquilla (sonda) de un reactivo de ensayo de medición de otro elemento. Esto afecta a un valor medido y provoca un error, de modo que este ensayo es, por tanto, desventajoso.

Además, de los respectivos ensayos anteriores, se ha desarrollado un ensayo de medición de la actividad lipasa en suero o plasma en el que se usa el éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina) (DGGMR) como sustrato de lipasa (véase el Documento de patente 1 y el Documento no de patente 2).

En este ensayo, el éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina) (en lo sucesivo, a veces denominado "DGGMR") se pone en contacto y reacciona con, por ejemplo, una muestra de suero; y la lipasa cataliza la hidrólisis para generar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de ácido glutámico (6'-metilresorufina).

Este éster de ácido glutámico (6'-metilresorufina) es inestable y se hidroliza fácil y naturalmente, generando 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

Se mide un aumento en la 6'-metilresorufina generada leyendo la absorbancia a o a casi 580 nm. Al hacerlo, se puede determinar el valor de la actividad lipasa en la muestra.

Este ensayo de medición de la actividad lipasa usando DGGMR como sustrato de la lipasa es sencillo, porque la medición se realiza en una serie de reacciones. Además, el ensayo también es ventajoso, porque es poco probable que se vea afectado por una esterasa mezclada a través de una celda de reacción o una boquilla (sonda) a partir de otros reactivos de medición.

Entre tanto, una lipasa contenida en, por ejemplo, suero o plasma es más eficaz en una superficie de contacto de agua-aceite de un sustrato de triglicéridos emulsionado. La velocidad de la reacción de esta lipasa implica el área superficial del sustrato disperso. Por lo tanto, para medir la actividad lipasa, parece fundamental preparar un sustrato compuesto de partículas de micelas estables y uniformes (véase el Documento no de patente 2).

Para este fin, cuando una solución de sustrato (solución de sustrato para medir la actividad lipasa) usada para medir la actividad lipasa se produce de manera convencional, la solución de sustrato debe estar emulsionada y compuesta de partículas de micelas estables y uniformes. Para ello, se han tenido en cuenta diferentes métodos: se puede mezclar un sustrato en una solución acuosa que contenga un tensioactivo; se puede mezclar un sustrato en una solución que contenga un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se puede añadir gota a gota un líquido que contenga sustrato y mezclarlo en una solución; se puede inyectar por chorro un líquido que contenga sustrato en una solución; se puede agitar una solución de sustrato con un potente mezclador a alta velocidad; o se puede someter una solución de sustrato a ultrasonidos. Los métodos requieren un procesamiento muy laborioso o especial que requiere habilidad. Los métodos también requieren un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales.

Por ejemplo, se desvela un proceso de producción de una solución acuosa transparente miscible que contiene una sustancia insoluble en agua, caracterizado por que se añade una sustancia insoluble en agua (por ejemplo, triglicérido) como sustrato de lipasa a una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico; la mezcla se calienta mientras se agita; la temperatura se eleva una vez hasta una temperatura más alta que el punto de turbidez del tensioactivo no iónico; y luego la temperatura se enfría hasta una temperatura igual o inferior al punto de turbidez, mientras se sigue agitando la mezcla (véase el Documento de patente 2).

También se desvela una solución de sustrato de triglicérido transparente para medir la actividad lipasa, caracterizada por que se calienta una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico hasta una temperatura igual o superior al punto de turbidez del tensioactivo no iónico; se añade un triglicérido y se disuelve en la mezcla mientras se agita para preparar una solución acuosa uniforme y miscible (transparente) que contenga el triglicérido; y se usa la solución acuosa resultante como sustrato de lipasa y, según sea necesario, incluye además un promotor de la función lipasa (véase el Documento de patente 3).

También se desvela un proceso de producción de una solución de sustrato usada para medir la actividad lipasa en una muestra, caracterizado por que cuando se mezcla un sustrato (por ejemplo, un triglicérido) con un tensioactivo (por ejemplo, un tensioactivo no iónico con un HLB de 10 a 16), se mezcla un disolvente orgánico hidrosoluble (por ejemplo, metanol o etanol); y un proceso de mezcla usa vibraciones tales como ultrasonidos, en donde la solución de sustrato contiene micelas con un diámetro medio geométrico de 0,17 μm a 0,38 μm y la desviación típica geométrica de la distribución del diámetro de las micelas es de 0,25 μm o inferior (véase el Documento de patente 4).

En el presente documento, en el ensayo de medición de la actividad lipasa usando el DGGMR como sustrato de la lipasa, la solución de sustrato se produce de la siguiente manera: "b) Se disuelven 0,9 g de taurodesoxicolato de sodio y 0,3 g de una colipasa (de un cerdo) con agitación en 60 ml de agua destilada. Mientras se agita bien, se inyecta por chorro una solución que contiene 70 mg de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metil-resorufina) en

- 1,7 ml de *n*-propanol en la solución anterior "(Ejemplo 29 del Documento de patente 1); o se disuelve el "Reactivo 2: 0,6 g de un sustrato cromogénico para una lipasa (por ejemplo, éster del ácido 1,2-*o*-dilauril-*rac*-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) en 9 ml de un alcohol adecuado (por ejemplo, etanol). Después, se añade 1 g de un emulgente (por ejemplo, Brij 35 o Triton X-114) a la solución. Se aspira la fase oleosa resultante con una aguja de inyección y se hace
- 5 pasar a través de una cánula fina (con un diámetro interno de 0,15 a 1,0 mm) a alta presión, para que la solución se inyecte a presión en una solución acuosa con agitación "(Ejemplo 3 del Documento de patente 5). En vista de lo anterior, se usa un alcohol como disolvente orgánico, y los ensayos requieren un proceso en el que se inyecta por chorro el líquido que contiene sustrato (se inyecta a alta presión) en una solución.
- 10 Cabe señalar que se desvela que una solución de sustrato para el análisis de lipasa contiene un sustrato de lipasa (por ejemplo, DGGMR), así como al menos un solubilizador de sustrato de lipasa seleccionado entre un tensioactivo aniónico, una lecitina y un éster de colesterol. Esta solución de sustrato ejerce el efecto de hacer que el sustrato sea bien miscible sin disminuir la actividad del sustrato (véase el Documento de patente 6).
- 15 Entonces, dicho documento describe resultados en los que, cuando se usó el 0,1 % en peso de un tensioactivo no iónico en lugar del solubilizador de sustrato de lipasa anterior, "la solución resultó ser turbia y, por lo tanto, presentó un inconveniente en la medición".
- 20 También se desvela una solución de sustrato de lipasa para medir la actividad enzimática, caracterizada por contener al menos un sustrato de lipasa (por ejemplo, DGGMR) y 1,2-difitanoi-*sn*-glicero-3-fosfocolina como un solubilizador de sustrato de lipasa. Esta solución de sustrato es muy transparente. Por consiguiente, se pueden ejercer efectos de manera que la actividad lipasa se pueda medir con una alta precisión y se aumente su estabilidad de almacenamiento (véase el Documento de patente 7).
- 25 Tanto el documento US 4.988.497 como el documento EP 337005 describen métodos de medición de la actividad lipasa, que implican mezclar un tensioactivo y un coloide protector con agua antes de mezclarlo más con un sustrato para medir la actividad lipasa en un disolvente orgánico, en donde el sustrato es el éster del ácido 1,2-*o*-dilauril-*rac*-glicero-2-glutárico (6'-metilresorufina).
- 30 El documento EP 1335026 describe un método de medición de los lípidos contenidos en los componentes sanguíneos en presencia de un compuesto organosilícico.

Documentos de la técnica anterior

35 Documentos de patente

- Documento de patente 1: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 61-254197A (1986)
 Documento de patente 2: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 58-156330A (1983)
 Documento de patente 3: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 63-188398A (1988)
 40 Documento de patente 4: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 2006-180741A (2006)
 Documento de patente 5: Publicación de patente JP (Kohyo) n.º 11-504529A (1999)
 Documento de patente 6: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 9-215500A (1997)
 Documento de patente 7: Publicación de patente JP (Kokai) n.º 11-318494A (1999)

45 Documentos no de patente

- Documento no de patente 1: "Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine", 30ª ed., pág. 670-674, editado por KANAI, Masamitsu, publicado por KANEHARA & Co., Ltd., 20 de agosto de 1993.
 Documento no de patente 2: "Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine", 33ª ed., pág. 545-547, editado por
 50 KANAI, Masamitsu, publicado por KANEHARA & Co., Ltd., 1 de abril de 2010.

Sumario de la invención

Objetivos por alcanzar mediante la invención

- 55 Como se ha descrito anteriormente, la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiere habilidad o un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales.
- 60 Por el contrario, el fin de la presente invención es proporcionar un proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que incluye, como sustrato para medir la actividad lipasa, DGGMR, en donde el proceso de producción no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales.
- 65 Además, otro fin de la presente invención es proporcionar un método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en el proceso de producción anterior, en el que el DGGMR se incluye como

un sustrato para medir la actividad lipasa, en donde el método no necesita un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales.

5 Medios para alcanzar los objetivos

Los presentes inventores han realizado una intensa investigación sobre cómo producir una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se incluye DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que los problemas anteriores se pueden resolver de manera que el DGGMR y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (en adelante, a veces denominado "el presente polímero") se mezclan directamente, y toda o una parte de la mezcla se mezcla luego con agua o una solución acuosa. De esta forma, los presentes inventores han completado la presente invención.

15 La presente invención se resume de la siguiente manera.

<1> Un proceso de producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina), comprendiendo el proceso las etapas de:

- (1) mezclar directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno para preparar una mezcla; y
- (2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa.

25 Efectos ventajosos de la invención

El proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales. El proceso puede producir una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se incluya DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa.

Además, el método simplifica la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa y no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales.

Por consiguiente, cuando se usa el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se incluye DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa puede simplificarse, acortarse y abarataarse.

Además, el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad. Por consiguiente, hay menos posibilidades de que la solución de sustrato producida para medir la actividad lipasa sea un producto defectuoso que se desvíe de un patrón establecido. Por lo tanto, la presente invención permite proporcionar a las instituciones médicas, etc., de manera económica y fiable, una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se pueden obtener resultados de ensayo exactos (valores medidos).

Descripción breve del dibujo

La Figura 1 son gráficos que ilustran cada uno la correlación entre los valores medidos obtenidos usando un reactivo de medición que contiene la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención y los valores medidos obtenidos usando un reactivo de control disponible en el mercado.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

<1> Proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa

1. Descripción general

(A) Esbozo

Los ejemplos de un proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención incluyen un proceso de producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR), comprendiendo el proceso las etapas de:

(1) mezclar directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno para preparar una mezcla; y

(2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa.

5 El proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención incluye las etapas (1) y (2). Por consiguiente, el proceso de producción no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales. De esta forma, el proceso de producción se puede usar para producir una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se incluya DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa.

(B) Realización en la que se usa aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral

15 El proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención incluye la siguiente realización en la que se usa un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

20 "Un proceso de producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina), comprendiendo el proceso las etapas de:

(1) mezclar directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral para preparar una mezcla; y

25 (2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa".

(C) Realización en la que se usa condensado de polioxietileno/polioxipropileno

30 De acuerdo con la siguiente realización de la presente invención, el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa incluye el uso de un condensado de polioxietileno/polioxipropileno.

"Un proceso de producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina), comprendiendo el proceso las etapas de:

35 (1) mezclar directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y un condensado de polioxietileno/polioxipropileno para preparar una mezcla; y

(2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa".

40 2. Lipasa

En la presente invención, una lipasa debería tener actividad como una lipasa, es decir, debería tener actividad lipasa. La lipasa no se limita a una en particular siempre que la lipasa tenga actividad lipasa.

45 En la presente invención, los ejemplos de la lipasa incluyen una lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) que cataliza una reacción en la que los enlaces éster (en la posición α (posiciones 1 y 3)) de un triglicérido (TG) (tres ácidos grasos de cadena larga están unidos a través de un enlace éster a glicerol) se hidrolizan para producir dos ácidos grasos y un monoglicérido β .

50 La presente invención es preferible para medir la actividad de una lipasa presente en una muestra de un fluido corporal, un órgano o un tejido, más preferible para medir la actividad de una lipasa presente en el fluido corporal, aún más preferible para medir la actividad de una lipasa presente en la sangre, suero o plasma, y aún más preferible para medir la actividad de una lipasa presente en suero o plasma.

55 Además, la presente invención es adecuada para medir la actividad de una lipasa pancreática.

3. Muestra

60 En la presente invención, una muestra para medir la actividad lipasa puede ser una muestra que puede contener la lipasa anterior. La muestra no se limita a una en particular siempre que la muestra pueda contener la lipasa anterior.

Los ejemplos de la muestra pueden incluir muestras humanas y muestras derivadas de animales o plantas.

65 Los ejemplos de las muestras humanas y las muestras derivadas de animales pueden incluir, pero sin limitación, fluido corporal humano o animal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, semen, líquido espinal, saliva, sudor, lágrimas, ascitos o líquido amniótico); excremento (por ejemplo, heces); órganos (por ejemplo, un páncreas, hígado o estómago);

tejidos (por ejemplo, un pelo, piel, uña, músculo o nervio); y células.

La presente invención es adecuada cuando se usa como muestra la muestra derivada de seres humanos o animales, y más adecuada cuando se usa como muestra la muestra derivada de seres humanos.

5 Además, la presente invención es preferible cuando se usa fluido corporal, órgano o tejido como muestra, más preferible cuando se usa fluido corporal como muestra, aún más preferible cuando se usa sangre, suero o plasma como muestra, y aún más preferible cuando se usa suero o plasma como muestra.

10 Cabe destacar que, en la presente invención, se prefiere una muestra líquida. Por lo tanto, si la muestra no es líquida, Se puede realizar un tratamiento previo (por ejemplo, extracción o solubilización) de acuerdo con un procedimiento conocido de preparación de una muestra líquida.

Además, la muestra puede diluirse o enriquecerse según sea necesario.

15 4. Sustrato para medir la actividad lipasa

En la presente invención, un sustrato que se usa para medir la actividad lipasa contenida en una muestra (es decir, un sustrato para medir la actividad lipasa) es el éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR).

En la presente invención, DGGMR, un sustrato para medir la actividad lipasa, se pone en contacto con una muestra y reacciona con una lipasa contenida en la muestra. Esta lipasa cataliza la hidrólisis para producir, a partir del DGGMR, 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina).

25 Este éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina) es inestable y se hidroliza fácil y naturalmente, dando 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

En la presente invención, se mide un aumento en la 6'-metilresorufina resultante leyendo la absorbancia a o casi 580 nm. Después, se puede determinar el valor de actividad lipasa contenida en la muestra.

Cabe señalar que el DGGMR está disponible en el mercado en, por ejemplo, Roche Diagnostics K. K. (Japón) o Sigma-Aldrich Co. LLC. (Japón).

35 5. Presente polímero

(1) Descripción general

40 Como se ha descrito anteriormente, el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención incluye las etapas de mezclar directamente el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (el presente polímero) para preparar una mezcla y mezclar toda o una parte de esta mezcla con agua o una solución acuosa.

45 (2) Aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral

A continuación, se describe un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral (en lo sucesivo, a veces denominado "el presente aceite de silicona modificado") usado en la presente invención.

50 El compuesto de silicona es un polímero que contiene, como cadena principal, un enlace siloxano (-Si-O-Si-) y, como cadena lateral, un grupo orgánico (por ejemplo, un grupo metilo (CH₃-)) unido a un átomo de silicio.

En el presente documento, un compuesto de silicona lineal se denomina aceite de silicona.

55 Cabe señalar que el aceite de silicona modificado es un compuesto en el que se introduce un grupo orgánico en una parte de átomos de silicio de un compuesto lineal de dimetil-silicona "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-Si(CH₃)₃".

60 Los ejemplos de este aceite de silicona modificado incluyen aceites de silicona en los que se introducen diferentes grupos orgánicos en parte de las cadenas laterales de polisiloxano, en cualquier extremo de polisiloxano, en ambos extremos de polisiloxano, o en parte de las cadenas laterales y en ambos extremos de polisiloxano.

65 Entre ellos, el aceite de silicona en el que se introducen distintos grupos orgánicos en parte de las cadenas laterales de polisiloxano es un aceite de silicona modificado de tipo de cadena lateral "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃".

Cabe señalar que, de acuerdo con las características de los grupos orgánicos introducidos, los aceites de silicona modificados se clasifican en un aceite de silicona reactivo y un aceite de silicona no reactivo.

5 Dependiendo del grupo orgánico introducido, los ejemplos del aceite de silicona modificado no reactivo de los dos incluyen un tipo modificado con poliéter, tipo modificado con aralquilo, tipo modificado con fluoroalquilo, tipo modificado con alquilo de cadena larga, tipo modificado con éster de ácido graso superior, tipo modificado con amida de ácido graso superior, tipo modificado con poliéter/alquilo de cadena larga/aralquilo, tipo modificado con alquilo de cadena larga/aralquilo y aceite de silicona de tipo modificado con fenilo.

10 Como aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃", los ejemplos del aceite de silicona de tipo modificado incluyen un aceite de silicona de tipo modificado con poliéter (el grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR'), un aceite de silicona de tipo modificado con poliéter/alquilo de cadena larga/aralquilo (el grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR', -C_aH_{2a+1}, -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona de tipo modificado con aralquilo (el grupo orgánico: -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona de tipo modificado con fluoroalquilo (el grupo orgánico: -CH₂CH₂CF₃), un aceite de silicona de tipo modificado con alquilo de cadena larga (el grupo orgánico: -C_aH_{2a+1}), un aceite de silicona de tipo modificado con alquilo de cadena larga/aralquilo (el grupo orgánico: -C_aH_{2a+1}, -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona de tipo modificado con éster de ácido graso superior (el grupo orgánico: -OCOR), un aceite de silicona de tipo modificado con amida de ácido graso superior (el grupo orgánico: -RNHCOR'), y un aceite de silicona de tipo modificado con fenilo (el grupo orgánico: -C₆H₅).

25 En la presente invención, se usa el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter de tipo cadena lateral "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃" (el grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR'). (Como alternativa, se usa un condensado de polioxietileno/polioxipropileno).

Ejemplo de este aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral que está disponible en el mercado incluye "KF-351A", "KF-354L", "KF-355A" y "KF-6011" (el distribuidor de cualquiera de los productos anteriores es Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.(Japón)).

30 (3) Condensado de polioxietileno/polioxipropileno

A continuación, se ilustra un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (en lo sucesivo, a veces denominado "presente condensado de POE/POP") usado en la presente invención.

35 En la presente invención, se usa un condensado de polioxietileno/polioxipropileno "HO(C₂H₄O)_a-(C₃H₆O)_b-(C₂H₄O)_cH". (Como alternativa, se usa el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral).

40 Los ejemplos de este condensado de polioxietileno/polioxipropileno (el presente condensado de POE/POP) incluyen polioxietilen(16)-polioxipropilen(17)-glicol (el nombre convencional de la materia prima cuasi-medicinal: polioxietilen-polioxipropilenglicol (16E.O.) (17P.O.)) y polioxietilen(20)-polioxipropilen(20)glicol (el nombre convencional de la materia prima cuasi-medicinal: polioxietilen-polioxipropilenglicol (20E.O.) (20P.O.)).

45 Los ejemplos del presente condensado de POE/POP que está disponible en el mercado incluyen polioxietilen(16)-polioxipropilen(17)glicol (el nombre del producto: "Pluronic L-34"; el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón)) y polioxietilen(20)-polioxipropilen(20)glicol (el nombre del producto: "Pluronic L-44"; el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón)).

50 6. Etapa de mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar la mezcla

(1) Descripción general

55 El proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención incluye una etapa de mezclar directamente un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (el presente polímero) para preparar una mezcla.

Cabe señalar que el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es como se describe en el apartado "4. Sustrato para medir la actividad lipasa".

60 También, el "aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o el condensado de polioxietileno/polioxipropileno" (el presente polímero) es como se describe en el apartado "5. Presente polímero".

65 (2) Mezcla de sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero

En la etapa de mezcla de un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa, en concreto, DGGMR, se mezcla con el presente polímero.

5 Es decir, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa se mezcla directamente con el presente polímero.

Convencionalmente, un tensioactivo usado se mezcla primero con agua o una solución acuosa, y la mezcla resultante se mezcla luego con un sustrato para medir la actividad lipasa.

10 La presente invención, sin embargo, difiere de un proceso tan convencional, pero proporciona un proceso que comprende una etapa de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa, en concreto, DGGMR y el presente polímero.

15 Cabe señalar que, como se usa en el presente documento, se puede mezclar un tipo del presente polímero con el sustrato para medir la actividad lipasa o se pueden mezclar varios tipos del presente polímero con el sustrato para medir la actividad lipasa.

(3) Cantidad mixta de sustrato para medir la actividad lipasa

20 En la etapa de mezcla de un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, la cantidad mixta de este sustrato no se limita a una en particular.

25 Cabe señalar que la concentración del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención es preferentemente de 0,05 mM o superior tras mezclar con agua o una solución acuosa (en adelante, a veces denominada "segunda mezcla") en la "etapa de mezcla de toda o una parte de la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero con agua o una solución acuosa", con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes.

30 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del sustrato para medir la actividad lipasa es más preferentemente de 0,1 mM o superior, y aún más preferentemente de 0,2 mM o superior en vista del fin anterior.

35 Además, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa es preferentemente de 2 mM o inferior tras la segunda mezcla en vista del fin anterior.

Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del sustrato para medir la actividad lipasa es más preferentemente de 1 mM o inferior y aún más preferentemente de 0,8 mM o inferior en vista del fin anterior.

40 La concentración preferible del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención tras la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

45 En la "etapa de mezcla de un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezclan directamente (en lo sucesivo, a veces denominada la "primera mezcla"). En este momento, la cantidad mezclada de cada uno entre el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero puede considerarse y luego determinarse de manera que la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla sea como se ha descrito anteriormente. Esto es preferible a la luz del procedimiento de producción.

50 Cabe señalar que, con respecto a la cantidad y concentración mezcladas del sustrato para medir la actividad lipasa, se pueden considerar, por ejemplo, los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

55 La cantidad mezclada del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Ps (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece como PMs. En este caso, La concentración Cs (representada en mM) del sustrato tras la segunda mezcla se puede expresar en la siguiente ecuación.

$$Cs = (Ps \times 10^6)/(Vf \times PMs).$$

65 Cabe señalar que, debido a que el peso molecular PMs del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es de 752,05, la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera.

ES 2 765 475 T3

$$Cs = (Ps \times 10^6) / (Vf \times 752,05).$$

Por lo tanto, en este caso, la cantidad mixta Ps (representada en gramos) del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla puede expresarse de la siguiente manera.

5

$$Ps = (Cs \times Vf \times PMs) / 10^6.$$

Es decir, $Ps = (Cs \times Vf \times 752,05) / 10^6$.

10 (b) Caso en el que una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad mezclada del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Ps (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece como PMs. En el presente documento, El % de A (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración Cs (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla se puede expresar en la siguiente ecuación.

15

20

$$Cs = (Ps \times 10^6) \times (A/100)/(Vf \times PMs) = (Ps \times A \times 10^4)/(Vf \times PMs).$$

25 Cabe señalar que, debido a que el peso molecular PMs del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es de 752,05, la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera.

$$Cs = (Ps \times A \times 10^4)/(Vf \times 752,05).$$

30 Por lo tanto, en este caso, la cantidad mixta Ps (representada en gramos) del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla puede expresarse de la siguiente manera.

$$Ps = (Cs \times Vf \times PMs) / (A \times 10^4).$$

35 Es decir,

$$Ps = (Cs \times Vf \times 752,05) / (A \times 10^4).$$

(4) Cantidad mezclada del presente polímero

40 En la etapa de mezclar directamente un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, la cantidad mezclada del presente polímero no se limita a una en particular.

45 Cabe señalar que la concentración del presente polímero es preferentemente del 0,01 % (p/v) o superior después de la mezcla con agua o una solución acuosa (la "segunda mezcla") en la "etapa de mezcla de toda o una parte de la mezcla de sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero con agua o una solución acuosa", con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes.

50 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del presente polímero es más preferentemente del 0,05 % (p/v) o superior y, aún más preferentemente, del 0,1% (p/v) o superior en vista del fin anterior.

Además, esta concentración del presente polímero es preferentemente del 20 % (p/v) o inferior tras la segunda mezcla en vista del fin anterior.

55

Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del presente polímero es más preferentemente del 10 % (p/v) o inferior, y aún más preferentemente, del 5 % (p/v) o inferior en vista del fin anterior.

La concentración preferible del presente polímero tras la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

60

En la "etapa de mezcla de un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezclan (la "primera mezcla"). En este momento, la cantidad mezclada de cada uno de entre el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero puede considerarse y luego determinarse de manera que la concentración del presente polímero tras la segunda mezcla sea como se ha descrito anteriormente. Esto es preferible a la luz del procedimiento de producción.

65

Cabe señalar que con respecto a la cantidad y concentración mezcladas del presente polímero, se pueden considerar, por ejemplo, los siguientes casos (a) y (b).

- 5 (a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

10 La cantidad mezclada del presente polímero mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Pp (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). En este caso, La concentración Cp (representada en % (p/v) del presente polímero tras la segunda mezcla se puede expresar como la siguiente ecuación.

$$15 \quad C_p = (P_p \times 100) / V_f.$$

Por lo tanto, en este caso, La cantidad mezclada Pp (representada en gramos) del presente polímero mezclado en el momento de la primera mezcla se puede expresar de siguiente manera.

$$20 \quad P_p = (C_p \times V_f) / 100.$$

- (b) Caso en el que una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

25 La cantidad mezclada del presente polímero mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Pp (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). En el presente documento, El % de A (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, La concentración Cp (representada en % (p/v) del presente polímero tras la segunda mezcla se puede expresar como la siguiente ecuación.

$$30 \quad C_p = (P_p \times 100) \times (A / 100) / V_f = (P_p \times A) / V_f.$$

Por lo tanto, en este caso, La cantidad mezclada Pp (representada en gramos) del presente polímero mezclado en el momento de la primera mezcla se puede expresar de siguiente manera.

$$35 \quad P_p = (C_p \times V_f) / A.$$

(5) Procedimiento de mezcla

- 40 En la etapa de mezclar directamente un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa se mezcla con el presente polímero. Este procedimiento no se limita a uno en particular y se puede adoptar cualquier procedimiento siempre que el sustrato para medir la actividad lipasa se pueda mezclar con el presente polímero.

45 Cabe señalar que de acuerdo con la presente invención, la mezcla no puede llevarse a cabo de las siguientes maneras: se puede mezclar un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución que contenga un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se añade gota a gota un líquido que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; se inyecta a chorro un líquido que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución; se agita una solución de sustrato para medir la actividad lipasa usando un mezclador fuerte a alta velocidad; se somete una solución de sustrato para medir la actividad lipasa a ultrasonidos; o similares. Por consiguiente, la mezcla no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial ni otros artículos. Se puede usar un mezclador común para mezclar a una velocidad típica. De manera análoga, se puede usar un procedimiento habitual para la mezcla. De esta forma, se puede preparar la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero.

55 (6) Temperatura de la mezcla

60 En la etapa de mezclar directamente un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, la temperatura cuando se mezcla el sustrato para medir la actividad lipasa con el presente polímero no se limita a una en particular. Sin embargo, esta etapa se lleva a cabo preferentemente a una temperatura cercana al punto de turbidez del presente polímero usado o en el punto de turbidez o inferior, con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes.

- 65 Cabe señalar que un punto de turbidez es una temperatura a la que las micelas de un tensioactivo no iónico, etc., no pueden formarse cuando aumenta la temperatura de una solución acuosa que contiene el tensioactivo. El punto de

turbidez también es una temperatura a la que esa solución acuosa se enturbia. Los diferentes tensioactivos tienen diferentes puntos de turbidez.

5 Como se usa en el presente documento, la temperatura en o cerca del punto de turbidez del presente polímero significa un intervalo de temperaturas que incluye el punto de turbidez del presente polímero ± 25 °C.

10 La temperatura en o cerca del punto de turbidez del presente polímero es preferentemente un intervalo de temperaturas que incluye el punto de turbidez del presente polímero ± 15 °C, más preferentemente un intervalo de temperaturas que incluye el punto de turbidez del presente polímero ± 10 °C, y aún más preferentemente, un intervalo de temperaturas que incluye el punto de turbidez del presente polímero ± 5 °C.

15 Directamente en la presente invención, la etapa de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla se lleva a cabo preferentemente a una temperatura cercana al punto de turbidez del presente polímero o inferior.

Cabe señalar que, por ejemplo, KF-351A, uno de los presentes aceites de silicona modificados, tiene un punto de turbidez de 52 °C (un valor automedido); KF-355A tiene un punto de turbidez de 67 °C (un valor automedido); y KF-6011 tiene un punto de turbidez de 64 °C (un valor automedido).

20 Cabe señalar que KF-354L no alcanzó un punto de turbidez incluso a 77 °C, que es el límite superior de la temperatura preestablecida de un baño de agua con termostato usado para medir el punto de turbidez, para que el punto de turbidez supere los 77 °C.

25 Además, Pluronic L-34, uno de los presentes condensados de POE/POP, por ejemplo, tiene un punto de turbidez de 65 °C (un valor automedido); y Pluronic L-44 tiene un punto de turbidez de 67 °C (un valor automedido).

30 En vista del fin anterior, la etapa de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla se lleva a cabo preferentemente en el punto de turbidez del presente polímero usado ± 25 °C o una temperatura inferior a este intervalo, más preferentemente en el punto de turbidez del presente polímero usado ± 15 °C o una temperatura inferior a este intervalo, aún más preferentemente en el punto de turbidez del presente polímero usado ± 10 °C o una temperatura inferior a este intervalo, y aún más preferentemente en el punto de turbidez del presente polímero usado ± 5 °C o una temperatura inferior a este intervalo.

35 Además, en la etapa de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa se mezcla con el presente polímero. En cuanto a la temperatura en este momento, la etapa se lleva a cabo preferentemente a una temperatura igual o superior al punto de fusión de cada uno de los sustratos (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero usado, con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes.

40 En vista del fin anterior, la etapa de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla se lleva a cabo preferentemente a 2 °C o más, más preferentemente a 5 °C o más, y aún más preferentemente a 10 °C o más.

45 (7) Duración de la mezcla

50 En la etapa de mezclar directamente un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de acuerdo con la presente invención, el sustrato para medir la actividad lipasa se mezcla con el presente polímero. La duración no se limita a una en particular siempre que el sustrato para medir la actividad lipasa se pueda mezclar uniformemente con el presente polímero.

55 Normalmente, se prefiere mezclar durante 5 minutos o más con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y que esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes. Cabe señalar que normalmente basta con 5 minutos.

60 Además, la duración necesaria para la mezcla directa del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero no tiene un límite superior en particular. Por ejemplo, la mezcla puede llevarse a cabo durante varias horas. A la luz de la idea de que el tiempo es un coste, la duración suele ser de 10 minutos, incluso si la mezcla se realiza con cuidado.

7. Etapa de mezcla de agua o solución acuosa con una mezcla de sustrato para medir la actividad lipasa y el polímero presente

65 (1) Descripción general

El proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente

invención incluye una etapa de mezcla de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla resultante preparada en la "etapa de mezcla de un sustrato (DGGMR) para medir la lipasa actividad y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (el presente polímero) para preparar una mezcla".

5 Cabe señalar que el sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el apartado "4. Sustrato para medir la actividad lipasa".

También, el presente polímero es como se describe en el apartado "5. Presente polímero".

10 También, la etapa de mezcla de un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla es como se describe en el apartado "6. Etapa de mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar la mezcla".

15 (2) Agua o solución acuosa

En la etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla resultante preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla de interés de acuerdo con la presente invención, el agua o la solución acuosa no se limita a una en particular.

20 Los ejemplos del agua pueden incluir, pero sin limitarse particularmente a, agua pura, agua destilada y agua purificada.

Además, esta solución acuosa no se limita a una en particular siempre que se use agua como disolvente. Los ejemplos pueden incluir soluciones acuosas que contengan al menos uno seleccionada del grupo que consiste en un promotor de lipasa, activador de la lipasa, colipasa y tampón.

(a) Promotor de lipasa

30 En la presente invención, el promotor de lipasa que puede incluirse en la solución acuosa anterior puede ser una sustancia que puede potenciar la actividad lipasa. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitarse particularmente a, ácido biliar y una sal del mismo.

35 Los ejemplos del ácido biliar pueden incluir ácido desoxicólico, ácido taurodesoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido 7-oxolitocólico, ácido 12-oxolitocólico, ácido 12-oxoquenodesoxicólico, ácido 7-oxodesoxicólico, ácido hiocólico, ácido hiodesoxicólico, ácido deshidrocólico y derivados del ácido cólico.

Además, los ejemplos de una sal del ácido biliar incluyen sales de metal alcalino o alcalinotérreo de ácido biliar y una sal de amonio de ácido biliar.

40 Los ejemplos del metal alcalino pueden incluir potasio, sodio y litio. Además, los ejemplos del metal alcalinotérreo pueden incluir magnesio y calcio.

45 En la presente invención, el ácido biliar o una sal del mismo es preferible como promotor de la lipasa debido a su función promotora de la actividad lipasa, la capacidad de formar una superficie de contacto compuesta de un sustrato para medir la actividad lipasa, la hidrosolubilidad y el coste.

50 Como ácido biliar, se prefiere el ácido taurodesoxicólico, porque es miscible en un intervalo ácido en el que es estable un sustrato para medir la actividad lipasa. También, en vista del coste, se prefiere el ácido desoxicólico.

Como ácido biliar, se prefiere más el ácido taurodesoxicólico.

55 Como sal del ácido biliar, se prefiere una sal de metal alcalino del ácido biliar, se prefiere más una sal de potasio o sodio del ácido biliar, y se prefiere todavía más una sal de sodio del ácido biliar.

Por lo tanto, como sal del ácido biliar, se prefiere una sal de metal alcalino (por ejemplo, potasio o sodio) de ácido desoxicólico o ácido taurodesoxicólico, se prefiere más una sal de metal alcalino (por ejemplo, potasio o sodio) de ácido taurodesoxicólico, siendo aún más preferible una sal de sodio de ácido taurodesoxicólico.

60 Cabe señalar que la concentración del promotor de lipasa de acuerdo con la presente invención es preferentemente del 0,2 % (p/v) o superior tras mezclarse el agua o una solución acuosa (la segunda mezcla) con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

65 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración del promotor de lipasa es más preferentemente del 0,4 % (p/v) o superior, y aún más preferentemente del 1 % (p/v) o superior.

Además, la concentración del promotor de lipasa es preferentemente del 20 % (p/v) o inferior tras la segunda mezcla.

Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del promotor de lipasa es más preferentemente del 10 % (p/v) o inferior y aún más preferentemente del 5 % (p/v) o inferior.

5 La concentración preferible del promotor de lipasa tras la segunda mezcla de acuerdo con la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

10 En la presente invención, la proporción mezclada de la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero" con respecto a la solución acuosa anterior se considera tal que la concentración del promotor de la lipasa tras la segunda mezcla se ajusta a la concentración anterior. Basado en lo anterior, es preferible incluir una concentración adecuada del promotor de la lipasa en la solución acuosa correspondiente.

15 (b) Activador de la lipasa

En la presente invención, el activador de la lipasa que se puede incluir en la solución acuosa anterior puede ser una sustancia que pueda activar una lipasa. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitarse particularmente a, un ion o una sal de un metal alcalinotérreo.

20 Los ejemplos del ion o de la sal de un metal alcalinotérreo pueden incluir un ion de berilio o una sal de berilio, un ion de magnesio o una sal de magnesio, y un ion de calcio o una sal de calcio.

Los ejemplos de la sal de calcio pueden incluir una sal de calcio hidrosoluble. Los ejemplos específicos pueden incluir una sal hidrosoluble que contenga un anión monovalente o divalente, o superior, y un ion de calcio.

25 Cabe señalar que los ejemplos del anión pueden incluir un ion de halógeno, un grupo ácido de un compuesto orgánico y un grupo ácido de un compuesto inorgánico.

Los ejemplos del ion de halógeno pueden incluir un ion de flúor y un ion de cloro.

30 Los ejemplos del grupo ácido de un compuesto orgánico pueden incluir un ion de acetato, ión de citrato e ión de gluconato.

35 Los ejemplos del grupo ácido de un compuesto inorgánico pueden incluir un ion de sulfato, ion de fosfato e ion de carbonato.

El activador de la lipasa de acuerdo con la presente invención es preferentemente un ion o una sal de un metal alcalinotérreo.

40 Cabe señalar que como ion o sal de un metal alcalinotérreo, se prefiere un ion de calcio o una sal de calcio en vista de los siguientes puntos (i) y (ii):

(i) capacidad para activar una lipasa; e

45 (ii) un ácido graso que se libere de un sustrato para medir la actividad lipasa mientras la lipasa ejerce su actividad catalítica altera una superficie de contacto compuesta del sustrato para medir la actividad lipasa, pero un ion de calcio o una sal de calcio pueden capturar el ácido graso libre, evitando así que se interrumpa la superficie de contacto.

En el presente documento, se prefiere una sal de calcio hidrosoluble que contenga un anión y un ion de calcio.

50 Los ejemplos de un anión preferible incluyen un ion de halógeno y un grupo ácido de un compuesto orgánico. Específicamente, se prefiere más un ion de cloro o un ion de acetato.

55 Por lo tanto, como sal de calcio, se prefiere un haluro de calcio o una sal de calcio de un grupo ácido de un compuesto orgánico. Específicamente, se prefiere más cloruro de calcio o acetato de calcio.

Cabe señalar que la concentración del activador de la lipasa de acuerdo con la presente invención es preferentemente de 0,1 mM o superior la mezcla del agua o de una solución acuosa (la segunda mezcla) con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

60 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del activador de la lipasa es más preferentemente de 1 mM o superior, y aún más preferentemente de 5 mM o superior.

Además, esta concentración del activador de la lipasa es preferentemente de 100 mM o inferior tras la segunda mezcla.

65 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, la concentración preferible del activador de la lipasa es más

preferentemente de 50 mM o inferior, y aún más preferentemente de 25 mM o inferior.

La concentración preferible del activador de la lipasa tras la segunda mezcla de acuerdo con la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

5 En la presente invención, la proporción mezclada de la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero" con respecto a la solución acuosa anterior se considera tal que la concentración del activador de la lipasa tras la segunda mezcla se ajusta a la concentración anterior. Basado en lo anterior, es preferible incluir una concentración adecuada del activador de la lipasa en la solución acuosa correspondiente.

10 (c) Colipasa

15 En la presente invención, la colipasa que se puede incluir en una solución acuosa puede tener el efecto, la función o la actividad de una colipasa. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitarse particularmente a, colipasas derivadas de mamíferos (por ejemplo, un ser humano, un cerdo) y colipasas preparadas, modificadas o alteradas mediante ingeniería genética.

20 En la presente invención, se prefiere una colipasa derivada de un mamífero (por ejemplo, un cerdo). Se prefiere más una colipasa derivada del páncreas de un mamífero (por ejemplo, un cerdo).

25 Cabe señalar que el valor de la actividad de la colipasa de acuerdo con la presente invención es preferentemente de 15K unidades/l o superior tras mezclar "agua o una solución acuosa (la segunda mezcla) con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad de lipasa y el presente polímero".

30 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, el valor de actividad preferible de la colipasa es más preferentemente de 150K unidades/l o superior, y aún más preferentemente de 750K unidades/l o superior.

35 Además, el valor de la actividad de la colipasa es preferentemente de 7.500K unidades/l o inferior, tras la segunda mezcla.

40 Cabe señalar que, tras la segunda mezcla, el valor de actividad de la colipasa es más preferentemente de 3.750K unidades/l o inferior, y aún más preferentemente de 2.250K unidades/l o inferior.

45 El valor de actividad preferible de la colipasa tras la segunda mezcla de acuerdo con la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

50 En la presente invención, la proporción de mezcla de la "mezcla del sustrato para medir la actividad de la lipasa y el presente polímero" con respecto a la solución acuosa anterior se considera tal que el valor de la actividad de la colipasa tras la segunda mezcla se ajusta al valor de la actividad anterior. Basado en lo anterior, es preferible que la solución acuosa anterior contenga la colipasa con un valor de actividad adecuado.

55 Cabe señalar que cada valor de actividad (Unidad/l) de la colipasa se basa en cómo se designa el valor de actividad de una colipasa pancreática de cerdo (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (1 mg/l = 75K unidades/l).

60 Cabe señalar que la colipasa está disponible en el mercado en, por ejemplo, Roche Diagnostics K. K. (Japón) o Sigma-Aldrich Co. LLC. (Japón).

(d) pH

65 El sustrato (DGGMR) para medir la actividad de la lipasa de acuerdo con la presente invención es estable a o cerca de pH 4.

Por lo tanto, el pH es preferentemente un pH dentro de un cierto intervalo con respecto al pH 4 después de "la mezcla de agua o una solución acuosa (la segunda mezcla) con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad de la lipasa y el presente polímero".

70 Específicamente, en vista de la estabilidad del sustrato (DGGMR) para medir la actividad de la lipasa, el pH tras la segunda mezcla es preferentemente de 2 a 7, más preferentemente de 3 a 5, y aún más preferentemente de 3,5 a 4,5 (cualquiera de los valores de pH es un valor a 20 °C).

75 El pH tras la segunda mezcla de acuerdo con la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

80 En la presente invención, es preferible ajustar el pH de la solución acuosa anterior a un pH adecuado de modo que el pH tras la segunda mezcla se ajuste al pH descrito anteriormente.

(e) Tampón

5 En la presente invención, se mezcla agua o una solución acuosa (la segunda mezcla) con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero. Después, para mantener el pH dentro del intervalo de pH descrito en (d), la solución acuosa puede contener, según sea necesario, un tampón con capacidad de tamponamiento dentro del intervalo de pH anterior.

10 Los ejemplos del tampón que se puede incluir en la solución acuosa anterior de acuerdo con la presente invención pueden incluir, pero sin limitarse particularmente a, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido tartárico, ácido succínico, ácido malónico, ácido cítrico); glicina; ácido fosfórico; y sales de los mismos.

15 En la presente invención, la concentración del tampón en esta solución acuosa que contiene tampón (es decir, una solución tampón) no se limita a una en particular siempre que la capacidad de tamponamiento pueda ejercerse dentro de un intervalo de pH prescrito.

20 Por ejemplo, tras la segunda mezcla, la concentración del tampón es preferentemente de 5 mM o superior, más preferentemente de 10 mM o superior, y aún más preferentemente de 30 mM o superior.

25 Además, tras la segunda mezcla, la concentración del tampón es preferentemente de 500 mM o inferior, más preferentemente de 100 mM o inferior, y aún más preferentemente de 50 mM o inferior.

30 La concentración preferible del tampón tras la segunda mezcla de acuerdo con la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

35 En la presente invención, es preferible que la solución acuosa anterior contenga una concentración adecuada del tampón de manera que la concentración del tampón tras la segunda mezcla se ajuste a la concentración descrita anteriormente.

(3) Mezcla de agua o solución acuosa con una mezcla de sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero

40 En la etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención, toda o una parte de la mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa.

45 Convencionalmente, un tensioactivo usado se mezcla primero con agua o una solución acuosa, y la mezcla resultante se mezcla luego con un sustrato para medir la actividad lipasa.

50 La presente invención, sin embargo, difiere de un proceso tan convencional, pero proporciona un proceso que comprende las etapas de mezclar directamente un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero; y mezclar agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla resultante del sustrato para medir la actividad de la lipasa y el presente polímero como se preparó.

55 Entre tanto, la etapa de mezcla de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención no se limita a una en particular. Por ejemplo, toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero" se puede añadir y mezclar con "agua o una solución acuosa". Además, se puede añadir o mezclar "agua o una solución acuosa" con toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero". También, son aceptables otras realizaciones.

60 Cabe destacar que, en la presente invención, la proporción mezclada de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero con respecto al agua o la solución acuosa no se limita a una en particular y puede determinarse adecuadamente.

65 Cabe señalar que se puede considerar mezclar la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero con el agua o la solución acuosa en vista de los siguientes aspectos (i) y (ii).

(i) En vista de la concentración de sustrato para medir la actividad lipasa

60 Como se describe en detalle en el apartado anterior 6.(3), la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla es preferentemente de 0,05 mM o superior, más preferentemente de 0,1 mM o superior, y aún más preferentemente de 0,2 mM o superior en vista del fin anterior.

65 Como también se describe en detalle en el apartado anterior 6.(3), la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla es preferentemente de 2 mM o inferior, más preferentemente de 1 mM o inferior, y aún más preferentemente de 0,8 mM o inferior en vista del fin anterior.

Cabe señalar que con respecto a la relación entre la concentración preferible del sustrato para medir la actividad lipasa

y el volumen final después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla, se pueden considerar, por ejemplo, los siguientes casos (a) y (b).

5 (a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

10 La cantidad mezclada del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Ps (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece como PMs. En este caso, la concentración Cs (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla se puede expresar en la siguiente ecuación.

$$15 \quad C_s = (P_s \times 10^6) / (V_f \times P_{Ms}).$$

Cabe señalar que, debido a que el peso molecular PMs del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es de 752,05, la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera.

$$20 \quad C_s = (P_s \times 10^6) / (V_f \times 752,05).$$

Por lo tanto, en este caso, el volumen final Vf (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar de la siguiente manera.

$$25 \quad V_f = (P_s \times 10^6) / (C_s \times P_{Ms}).$$

Es decir,

$$V_f = (P_s \times 10^6) / (C_s \times 752,05).$$

30 Por consiguiente, en el momento de la segunda mezcla, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen Vf (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Esto permite que una solución de sustrato para medir la actividad lipasa contenga una concentración deseada del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa.

35 (b) Caso en el que una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

40 La cantidad mezclada del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Ps (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece como PMs. En el presente documento, El % de A (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración Cs (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa tras la segunda mezcla se puede expresar en la siguiente ecuación.

$$C_s = (P_s \times 10^6) \times (A/100) / (V_f \times P_{Ms}) = (P_s \times A \times 10^4) / (V_f \times P_{Ms}).$$

50 Cabe señalar que, debido a que el peso molecular PMs del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es de 752,05, la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera.

$$C_s = (P_s \times A \times 10^4) / (V_f \times 752,05).$$

55 Por lo tanto, en este caso, el volumen final Vf (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar de la siguiente manera.

$$V_f = (P_s \times A \times 10^4) / (C_s \times P_{Ms}).$$

Es decir,

$$60 \quad V_f = (P_s \times A \times 10^4) / (C_s \times 752,05).$$

65 Por consiguiente, en el momento de la segunda mezcla, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen Vf (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Esto permite que una solución de sustrato para medir la actividad lipasa contenga una concentración deseada del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa.

(ii) En vista de la concentración del presente polímero

5 Como se describe en detalle en el apartado 6.(4) anterior, la concentración preferible del presente polímero después de la segunda mezcla es preferentemente del 0,01 % (p/v) o superior, más preferentemente, del 0,05 % (p/v) o superior, y aún más preferentemente del 0,1 % (p/v) o superior en vista del fin anterior.

10 Como también se describe en detalle en el apartado anterior 6.(4), la concentración preferible del presente polímero después de la segunda mezcla es preferentemente del 20 % (p/v) o inferior, más preferentemente del 10 % (p/v) o inferior, y aún más preferentemente del 5 % (p/v) o inferior en vista del fin anterior.

15 Con respecto a la relación entre la concentración preferible del presente polímero y el volumen final después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla, se pueden considerar, por ejemplo, los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

20 La cantidad mezclada del presente polímero mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Pp (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). En este caso, La concentración Cp (representada en % (p/v) del presente polímero tras la segunda mezcla se puede expresar como la siguiente ecuación.

$$25 \quad C_p = (P_p \times 100) / V_f.$$

Por lo tanto, en este caso, el volumen final Vf (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar de la siguiente manera.

$$30 \quad V_f = (P_p \times 100) / C_p.$$

35 Por consiguiente, en el momento de la segunda mezcla, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen Vf (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Esto permite que una solución de sustrato para medir la actividad lipasa contenga una concentración deseada del presente polímero.

(b) Caso en el que una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa

40 La cantidad mezclada del presente polímero mezclada en el momento de la primera mezcla se establece como Pp (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, un volumen después de haberse llenado hasta la marca) tras mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece como Vf (representado en ml). En el presente documento, El % de A (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, La concentración Cp (representada en % (p/v) del presente polímero tras la segunda mezcla se puede expresar como la siguiente ecuación.

$$45 \quad C_p = (P_p \times 100) \times (A / 100) / V_f = (P_p \times A) / V_f.$$

50 Por lo tanto, en este caso, el volumen final Vf (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar de la siguiente manera.

$$V_f = (P_p \times A) / C_p.$$

55 Por consiguiente, en el momento de la segunda mezcla, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen Vf (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Esto permite que una solución de sustrato para medir la actividad lipasa contenga una concentración deseada del presente polímero.

60 Cabe señalar que la etapa de mezcla de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo usando dos o más fases (etapas).

Cabe señalar que esta etapa puede llevarse a cabo usando múltiples fases (etapas) de dicha manera. Esto se prefiere con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes.

65 En cuanto al procedimiento en el que se lleva a cabo esta etapa usando múltiples fases, este procedimiento es viable siempre y cuando esta etapa se lleve a cabo usando múltiples fases. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitarse

particularmente a, procedimientos usando las siguientes fases <A> y .

Fase <A> en la que se mezcla una cierta cantidad de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero.

5 Fase en la que se mezcla una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa con el líquido mezclado después de mezclar el agua o la solución acuosa anterior con la mezcla (la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero) en la fase <A>.

10 Cabe destacar en este caso, que V_a (representado en ml) se ajusta al volumen (volumen fijo) del "agua o de la solución acuosa" mezclada con "toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero" en la fase <A>. V_f (representado en ml) se ajusta al volumen final (por ejemplo, un volumen después de llenarse hasta la marca) después de mezclarse "una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa" con el líquido mezclado en la fase (es decir, el volumen final después de mezclarse el agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla). Con el fin de producir una solución emulsionada que contenga

15 sustrato para medir la actividad lipasa y esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes, la proporción (V_f/V_a) calculada mediante la división de V_f entre V_a es preferentemente de 1 a 500.

Es decir, en vista del fin anterior, es preferible que los valores de V_a y V_f (volúmenes) anteriores se seleccionen de manera que la proporción (V_f/V_a) calculada mediante la división de V_f entre V_a esté dentro de un intervalo de 1 a 500.

20 De manera análoga, en vista del fin anterior, la proporción (V_f/V_a) calculada mediante la división de V_f entre V_a es más preferentemente de 2 a 200 y aún más preferentemente de 5 a 100.

Es decir, en vista del fin anterior, es más preferible que los valores de V_a y V_f (volúmenes) anteriores se seleccionen de manera que la proporción (V_f/V_a) calculada mediante la división de V_f entre V_a esté dentro de un intervalo de 2 a 200. Es aún más preferible que los valores de V_a y V_f (volúmenes) anteriores se seleccionen de manera que la proporción (V_f/V_a) esté dentro de un intervalo de 5 a 100.

30 Cabe señalar que no hay limitación con respecto a la fase <A> "en la que se mezcla una cierta cantidad de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero". Por ejemplo, toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero" se puede añadir y mezclar con una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa". Además, se puede añadir y mezclar una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa" con toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero". También,

35 son aceptables otras realizaciones.

Además, No hay limitación con respecto a la fase "en la que se mezcla una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa con el líquido mezclado después de mezclar el agua o la solución acuosa anterior con la mezcla (la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero) en la fase <A>". Por ejemplo, el "líquido mezclado después de mezclarse el agua o la solución acuosa anteriores con la mezcla (la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero) en la fase <A>" se puede añadir y mezclar con una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa". Además, una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa" se puede añadir al y mezclar con el "líquido mezclado después de mezclarse el agua o la solución acuosa anteriores con la mezcla (la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero) en la fase <A>". También, son aceptables

40 otras realizaciones.

45

(4) Procedimiento de mezcla

En la etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención,

50 toda o una parte de la mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa. Este procedimiento no se limita a uno en particular y se puede adoptar cualquier procedimiento siempre que la mezcla se pueda mezclar con el agua o la solución acuosa.

55 Cabe señalar que la mezcla de acuerdo con la presente invención puede realizarse de manera que: se puede mezclar un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución que contenga un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se añade gota a gota un líquido que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; se inyecta a chorro un líquido que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución; se agita una solución de sustrato para medir la actividad lipasa usando un mezclador fuerte a alta velocidad; se somete

60 una solución de sustrato para medir la actividad lipasa a ultrasonidos; o similares. Por consiguiente, la mezcla no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial ni otros artículos. Se puede usar un mezclador común para agitar a una velocidad típica. De manera análoga, se puede usar un procedimiento habitual para la mezcla. De esta forma, toda o una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se puede mezclar con agua o una solución acuosa.

65

(5) Temperatura de la mezcla

5 En la etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención, toda o una parte de la mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa. En este momento, la temperatura no se limita a una en particular, y la etapa puede llevarse a cabo a una temperatura igual o inferior al punto de turbidez del presente polímero usado. Esta temperatura es preferible con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y se componga de partículas de micelas estables y uniformes.

10 Entre tanto, la etapa de mezcla del agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se lleva a cabo más preferentemente una temperatura igual o inferior a la temperatura que es inferior en 10 °C al punto de turbidez del presente polímero usado y aún más preferentemente a 25 °C o menos en vista del fin anterior.

15 Además, en la etapa de mezcla del agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención, toda o una parte de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se mezcla con agua o una solución acuosa. En cuanto a la temperatura en este momento, esta etapa se lleva a cabo preferentemente a una temperatura igual o superior al punto de fusión de cada uno de los sustratos (DGGMR) para medir la actividad lipasa, el presente polímero usado y el agua o solución acuosa usados. Esta temperatura es preferible con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y se componga de partículas de micelas estables y uniformes.

20 En el presente documento, la etapa de mezcla de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se lleva a cabo más preferentemente a 10 °C o temperatura superior, y aún más preferentemente, a 15 °C o temperatura superior en vista del fin anterior.

(6) Duración de la mezcla

30 En la etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero de acuerdo con la presente invención, toda o una parte de la mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa. Esta duración no se limita a una en particular siempre que la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero se puedan mezclar uniformemente con el agua o la solución acuosa.

35 Normalmente, se prefiere mezclar durante 5 minutos o más con el fin de producir una solución emulsionada que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa y que esté compuesta de partículas de micelas estables y uniformes. Cabe señalar que normalmente basta con 5 minutos.

40 Además, la duración necesaria para mezclar la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero con agua o una solución acuosa no tiene un límite superior en particular. Por ejemplo, la mezcla puede llevarse a cabo durante varias horas. A la luz de la idea de que el tiempo es un coste, la duración suele ser de 10 minutos, incluso si la mezcla se realiza con cuidado.

45 8. Diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

50 Como se ha descrito anteriormente, una lipasa actúa más eficazmente en una superficie de contacto de agua y aceite de un sustrato de triglicéridos emulsionado. La velocidad de la reacción de la lipasa implica el área superficial del sustrato disperso. Por lo tanto, para medir la actividad lipasa, parece fundamental preparar un sustrato compuesto de partículas de micelas estables y uniformes (véase el Documento no de patente 2).

55 En la solución que contiene un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, cuando el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de las mismas está dentro de un intervalo de 60 a 1.500 nm, la velocidad de reacción de la lipasa es alta, y también, la emulsión es estable. Por consiguiente, esta solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede almacenar y usar durante un período prolongado, por lo que es preferible.

60 Debido a esto, en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, las micelas de la emulsión tienen un diámetro (tamaño de partícula) más preferentemente de 70 a 1.000 nm, aún más preferentemente de 80 a 600 nm, y aún más preferentemente de 100 a 200 nm.

<2> Método de simplificación de la producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa 1. Descripción general

65 (A) Esbozo

Un método de simplificación de la producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, el éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina) (DGGMR) comprende las etapas de:

- 5 (1) mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno (el presente polímero) para preparar una mezcla; y
(2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa.

10 En el presente documento, el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa incluye las etapas (1) y (2), y no requiere, por tanto, un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial, instrumentos especiales u otros artículos especiales. Por lo tanto, el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en la que se incluye DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa.

15 (B) Realización en la que se usa aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

20 De acuerdo con la siguiente realización, el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa incluye el uso de un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

25 "Un método de simplificación de la producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina), comprendiendo el método las etapas de:

- 30 (1) mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral para preparar una mezcla; y
(2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa".

(C) Realización en la que se usa condensado de polioxietileno/polioxipropileno.

35 De acuerdo con la siguiente realización, el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa incluye el uso de un condensado de polioxietileno/polioxipropileno.

"Un método de simplificación de la producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina), comprendiendo el método las etapas de:

- 40 (1) mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa y un condensado de polioxietileno/polioxipropileno para preparar una mezcla; y
(2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa".

45 2. Lipasa

La lipasa en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "2. Lipasa".

50 3. Muestra

La muestra en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "3. Muestra".

55 4. Sustrato para medir la actividad lipasa

El sustrato para medir la actividad lipasa en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "4. Sustrato para medir la actividad lipasa".

60 5. Presente polímero

65 El "aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de cadena lateral o el condensado de polioxietileno/polioxipropileno" (el presente polímero) en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1 >, el apartado "5. Presente polímero".

6. Etapa de mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar la mezcla

5 La etapa de mezcla de un sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar una mezcla en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "6. Etapa de mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero para preparar la mezcla".

7. Etapa de mezcla de agua o solución acuosa con una mezcla de sustrato para medir la actividad lipasa y el polímero presente

10 La etapa de mezcla de agua o de una solución acuosa con la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente polímero en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "7. Etapa de mezcla de agua o solución acuosa con una mezcla de sustrato para medir la actividad lipasa y el polímero presente".

15 8. Diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

20 El diámetro de las micelas de una emulsión de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa en el método de simplificación de la producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa es como se describe en el capítulo <1>, el apartado "8. Diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa".

<3> Reactivo y ensayo para medir la actividad lipasa en la muestra

25 A continuación, se describe un reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra, cuyo reactivo incluye una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, y un ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra usando la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

1. Reactivo para medir la actividad lipasa en la muestra

30 (1) Componentes del reactivo para medir la actividad lipasa en la muestra

El reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra puede consistir en una solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Como alternativa, el reactivo (kit de reactivos) puede contener una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, así como otro componente reactivo.

35 Cabe señalar que el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra es preferentemente un kit de reactivos que contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, así como otro componente reactivo debido a las siguientes razones (a) y (b).

40 (a) El sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa es estable a o cerca de pH 4. Por el contrario, la lipasa tiene una actividad óptima a pH 8 o cercano. Los respectivos intervalos de pH adecuados son, por lo tanto, diferentes.
(b) Cuando un reactivo todo en uno contiene un sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa, una colipasa y, como promotor de lipasa, ácido biliar o una sal del mismo, el sustrato (DGGMR) es inestable.

45 Por lo tanto, el kit de reactivos comprende preferentemente una solución de sustrato para medir la actividad lipasa y otro componente reactivo. En este caso, un reactivo que contiene el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa debe tener un pH de 8 o cerca de pH 4. Al menos uno de los otros componentes reactivos combinados con el reactivo anterior debe tener un pH de 8 o superior. Además, es preferible que el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa, una colipasa y, como promotor de lipasa, ácido biliar o una sal del mismo no estén incluidos en un reactivo.

50 Preferentemente, el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra es un kit de reactivos de dos componentes que consiste en una solución de sustrato para medir la actividad lipasa y otro componente reactivo.

55 En este caso, es más preferible usar otro componente reactivo como primer reactivo; y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se usa como el segundo reactivo.

En este caso, es aún más preferible que otro componente reactivo tenga un pH de 8 o superior; y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa tiene un pH igual o cercano a pH 4.

60 Además, tanto la colipasa como el ácido biliar o su sal como promotor de la lipasa no están incluidos en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Por lo tanto, es aún más preferible que al menos una de entre la colipasa y el ácido biliar o la sal de la misma como promotor de la lipasa estén incluidos en otro componente reactivo.

65 El reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra, reactivo que contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, puede usarse para llevar a cabo mediciones mediante un método de criterio de valoración. Como alternativa, el reactivo puede usarse para llevar a cabo la medición mediante un método de velocidad de reacción

(método de velocidad). Los métodos pueden seleccionarse adecuadamente. En el presente documento, es preferible llevar a cabo la medición mediante el método de velocidad de reacción (método de velocidad).

5 Además, el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa. El sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa se pone en contacto con la muestra para hacer una reacción. La lipasa cataliza la hidrólisis para generar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina). Este éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina) es inestable y se hidroliza fácil y naturalmente, dando 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

10 Por consiguiente, se mide un aumento en la 6'-metilresorufina resultante leyendo la absorbancia a o casi 580 nm. Después, se puede determinar el valor de actividad lipasa contenida en la muestra. Cabe señalar que este caso puede usar un método de una sola longitud de onda o un método de dos longitudes de onda.

15 Entre tanto, el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra contiene la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. La temperatura durante la reacción de ensayo se puede establecer a una temperatura, por ejemplo, 30 °C o 37 °C que está dentro de un intervalo de temperaturas de modo que la reacción pueda continuar y los componentes de la reacción, por ejemplo, una enzima que implica la reacción de ensayo no se inactive, se desnaturalice ni se modifique debido al calor.

20 Entre tanto, el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra contiene la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. La forma de iniciar la reacción de ensayo puede implicar cualquiera de los métodos que incluyen: un método de adición de, por ejemplo, un sustrato para medir la actividad lipasa; un método de adición de una muestra; y similares.

25 Entre tanto, el reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra contiene la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. La medición se puede realizar manualmente o usando un dispositivo (por ejemplo, un analizador automático).

30 Además, con respecto al reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra, reactivo que contiene la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, todos o parte de los componentes reactivos pueden ser líquidos.

Cabe señalar que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, por sí misma, puede comercializarse y usarse para medir la actividad lipasa en una muestra.

35 Cabe señalar que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede comercializarse en combinación con otro componente reactivo u otros reactivos, y puede usarse para medir la actividad lipasa en una muestra.

40 Los ejemplos de otro componente reactivo y otros reactivos incluyen: un tampón; un diluyente de muestra; un diluyente reactivo; un reactivo que contiene una sustancia usada para la calibración; y un reactivo que contiene una sustancia usada para el control de calidad.

(2) Ejemplos específicos de reactivo para medir la actividad lipasa en la muestra

45 A continuación, se ilustran ejemplos específicos del reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra, reactivo que contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

(I) Ejemplo 1

50 (a) Primer reactivo (una solución acuosa (pH 8,3 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos con las respectivas concentraciones que se describen a continuación)

Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) 2 % (p/v)

Cloruro de calcio (un activador de la lipasa) 5 mM

Colipasa (derivada de un páncreas de cerdo; Roche Diagnostics K. K. (Japón)) 375K unidades/l (5 mg/l)

55 Bicina (un tampón) 40 mM

(b) Segundo reactivo (una solución de sustrato para medir la actividad lipasa) (una solución acuosa (pH 4,0 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos con las respectivas concentraciones que se describen a continuación)

60 éster de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (un sustrato para medir la actividad lipasa) 0,3 mM

Aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral 0,3 % (p/v)

Ácido L-tartárico (un tampón) 40 mM

65

(II) Ejemplo 2

(a) Primer reactivo (una solución acuosa (pH 8,4 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos con las respectivas concentraciones que se describen a continuación)

- 5 Taurodesoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) 2 % (p/v)
 Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) 0,2 % (p/v)
 Cloruro de calcio (un activador de la lipasa) 5 mM
 Colipasa (derivada de un páncreas de cerdo; Roche Diagnostics K. K. (Japón)) 150K unidades/l (2 mg/l)
 Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (un tampón) 40 mM

10 (b) Segundo reactivo (una solución de sustrato para medir la actividad lipasa) (una solución acuosa que contiene los siguientes componentes reactivos con las respectivas concentraciones que se describen a continuación)

- 15 éster de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (un sustrato para medir la actividad lipasa) 0,6 mM
 Condensado de polioxietileno/polioxipropileno 2 % (p/v)
 Taurodesoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) 2 % (p/v)

20 2. Ensayo para medir la actividad lipasa en la muestra

(1) Cómo medir la actividad lipasa en la muestra

25 La solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede usarse para el ensayo de acuerdo con el ensayo de medición de la actividad lipasa en una muestra. En este caso, el ensayo puede llevarse a cabo mediante un método de criterio de valoración. Como alternativa, el ensayo puede llevarse a cabo mediante un método de velocidad de reacción (método de velocidad). Los métodos pueden seleccionarse adecuadamente. En el presente documento, es preferible llevar a cabo el ensayo mediante el método de velocidad de reacción (método de velocidad).

30 Además, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede usar para llevar a cabo la medición de acuerdo con el ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra. En cuanto a la medición, un método de una sola etapa, en el que la medición se lleva a cabo en una etapa, o un método de múltiples etapas, en el que la medición se lleva a cabo en dos o más etapas, puede seleccionarse adecuadamente para llevarse a cabo la medición.

35 Cabe señalar que el reactivo de medición usado para medir la actividad lipasa en una muestra puede componerse del primer reactivo, el segundo reactivo y otro reactivo (uno o más reactivos). En este caso, en concreto, el caso que tiene tres o más reactivos, la reacción de ensayo se puede realizar usando el número de etapas necesario para la medición con estos reactivos (según sea necesario, dos o más etapas, o tres o más etapas), para que se pueda medir la actividad lipasa en la muestra.

40 Además, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede usar para llevar a cabo la medición de acuerdo con el ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra. En este caso, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa se pone en contacto con la muestra para hacer una reacción. La lipasa cataliza la hidrólisis para generar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina). Este éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina) es inestable y se hidroliza fácil y naturalmente, dando 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

45 Por consiguiente, se mide un aumento en la 6'-metilresorufina resultante leyendo la absorbancia a o casi 580 nm. Después, se puede determinar el valor de actividad lipasa contenida en la muestra. Cabe señalar que este caso puede usar un método de una sola longitud de onda o un método de dos longitudes de onda.

50 Cabe señalar que el valor de actividad lipasa contenida en la muestra se calcula a partir de la absorbancia (o transmitancia) medida o de un cambio en la absorbancia (o transmitancia). Este procedimiento de cálculo puede usar la absorbancia (o transmitancia) medida según el coeficiente de absorción molar de la 6'-metilresorufina. Como alternativa, en este procedimiento de cálculo, la absorbancia (o transmitancia) de interés se compara con la absorbancia (o transmitancia) de un material de referencia (por ejemplo, una solución patrón o un suero de referencia),
 55 Se conoce el valor de la actividad lipasa. Estos procedimientos pueden seleccionarse adecuadamente.

Además, el valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra se calcula preferentemente restando el valor en blanco de la absorbancia (o transmitancia) obtenida midiendo la muestra.

60 Además, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede usar para llevar a cabo la medición de acuerdo con el ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra. La temperatura durante la reacción de ensayo se puede establecer a una temperatura, por ejemplo, 30 °C o 37 °C que está dentro de un intervalo de temperaturas de modo que la reacción del ensayo pueda continuar y los componentes de la reacción, por ejemplo, una enzima que implica la reacción de ensayo no se inactive, se desnaturalice ni se modifique debido al calor.

65 Además, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede usar para llevar a cabo el ensayo de acuerdo

con el ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra. En este caso, la forma de iniciar la reacción de ensayo puede implicar cualquiera de los métodos que incluyen: un método de adición de, por ejemplo, un sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención; un método de adición de una muestra; y similares.

5 Además, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede usar para llevar a cabo la medición de acuerdo con el ensayo para medir la actividad lipasa en una muestra. En este caso, la medición se puede realizar manualmente o usando un dispositivo, por ejemplo, un analizador automatizado.

(2) Ejemplos específicos de ensayo para medir la actividad lipasa en la muestra

10 A continuación, se ilustran ejemplos específicos del ensayo de medición de la actividad lipasa en una muestra usando una solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

(a) Reactivo de medición

15 (i) Primer reactivo

El primer reactivo descrito en el apartado anterior 1.(2)(i)(a) se usó como el primer reactivo en este ejemplo específico con respecto al ensayo de medición.

20 (ii) Segundo reactivo

El segundo reactivo descrito en el apartado anterior 1.(2)(i)(b) se usó como el segundo reactivo en este ejemplo específico con respecto al ensayo de medición.

25 (b) Muestra

Se usó suero humano como muestra.

30 (c) Medición

(i) Primera etapa

La muestra anterior y el primer reactivo se mezclan para preparar un líquido mezclado.

35 La cantidad de cada una de las muestras y del primer reactivo mezclado puede determinarse adecuadamente dependiendo de la cantidad del segundo reactivo, del valor de la actividad de la lipasa contenida en la muestra y de otras condiciones.

40 Cabe destacar que, hablando en general, los ejemplos de la cantidad de la muestra están preferentemente dentro de un intervalo de 0,5 a 100 μ l y la cantidad del primer reactivo está preferentemente dentro de un intervalo de 20 a 1.000 μ l.

Este líquido mezclado se prepara así y luego se incuba.

45 El período de incubación no se limita a uno en particular y, normalmente, es preferentemente de 20 minutos, más preferentemente, de 10 minutos, y aún más preferentemente, de 5 minutos.

50 Además, la temperatura de incubación puede ser superior a la temperatura a la que el líquido mezclado anterior se puede congelar.

Cabe destacar que, hablando en general, cuanto mayor sea la temperatura de reacción del ensayo, mayor será la velocidad de reacción. Esto es preferible.

55 Sin embargo, si la temperatura es demasiado alta, los componentes (por ejemplo, una enzima) que implican la reacción de ensayo están desnaturalizados o inactivados. Por consiguiente, la temperatura de incubación debe ser inferior a la temperatura a la que los componentes (por ejemplo, una enzima) que participan en la reacción de ensayo pueden desnaturalizarse o inactivarse.

60 Esta temperatura de incubación, normalmente, es preferentemente de 2 a 70 °C, más preferentemente, de 20 a 37 °C, y aún más preferentemente, de 30 a 37 °C.

65 Cabe señalar que si los componentes (por ejemplo, una enzima) que participan en la reacción de ensayo son cada uno un componente resistente al calor (por ejemplo, una enzima termoestable), la temperatura puede ser mucho más alta.

Se prepara y se incuba este líquido mezclado de la muestra y el primer reactivo. A continuación, una lipasa contenida en la muestra está en contacto con los componentes reactivos contenidos en el primer reactivo. Estos componentes, por ejemplo, luego potencian y activan la actividad lipasa.

5 (ii) Segunda etapa

El "líquido mezclado de la muestra y el primer reactivo" preparado en la primera etapa se mezcla con el segundo reactivo.

10 Esto forma la solución de reacción final.

La cantidad del segundo reactivo mezclado puede determinarse adecuadamente dependiendo de la cantidad de la muestra, de la cantidad del primer reactivo, del valor de la actividad de la lipasa contenida en la muestra, de los ajustes de un analizador usado y de otras condiciones.

15 Cabe destacar que, hablando en general, la cantidad del segundo reactivo está, por ejemplo, preferentemente, dentro de un intervalo de 10 a 1.000 μ l.

Esta solución de reacción final se prepara así y luego se incuba.

20 El período de incubación no se limita a uno en particular y, normalmente, es preferentemente de 20 minutos, más preferentemente, de 10 minutos, y aún más preferentemente, de 5 minutos.

25 Además, la temperatura de incubación puede ser superior a una temperatura a la que la solución de reacción final anterior se pueda congelar.

Cabe destacar que, hablando en general, cuanto mayor sea la temperatura de reacción del ensayo, mayor será la velocidad de reacción. Esto es preferible.

30 Sin embargo, si la temperatura es demasiado alta, los componentes (por ejemplo, una enzima) que implican la reacción de ensayo están desnaturalizados o inactivados. Por consiguiente, la temperatura de incubación debe ser inferior a la temperatura a la que los componentes (por ejemplo, una enzima) que participan en la reacción de ensayo se desnaturalizan o se inactivan.

35 Esta temperatura de incubación, normalmente, es preferentemente de 2 a 70 °C, más preferentemente, de 20 a 37 °C, y aún más preferentemente, de 30 a 37 °C.

40 Cabe señalar que si los componentes (por ejemplo, una enzima) que participan en la reacción de ensayo son cada uno un componente resistente al calor (por ejemplo, una enzima termoestable), la temperatura puede ser mucho más alta.

Mediante la preparación de incubación de la solución de reacción final, se potencia y se activa la actividad lipasa en la primera etapa y, en la segunda etapa, se inicia la reacción de ensayo, para que la reacción proceda a fin de medir la actividad lipasa en la muestra.

45 Específicamente, la presente invención proporciona el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa. En el presente documento, el segundo reactivo (la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención) es una solución de sustrato emulsionada compuesta de partículas de micelas estables y uniformes, y, en la segunda etapa, se pone en contacto con una lipasa contenida en una muestra.
50 Esta lipasa cataliza la hidrólisis para generar, a partir del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa, 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina).

Este éster de ácido glutárico (6'-metilresorufina) es inestable y se hidroliza fácil y naturalmente, dando 6'-metilresorufina (λ máx: 580 nm).

55 La 6'-metilresorufina resultante tiene una longitud de onda de absorción máxima (λ máx) a 580 nm. La absorbancia (o transmitancia) (debido a esta 6'-metilresorufina) de la solución de reacción final se mide leyendo la absorbancia (o transmitancia) a o a casi 580 nm.

60 A continuación, el valor de actividad lipasa contenida en la muestra se calcula a partir de la absorbancia (o transmitancia) medida o de un cambio en la absorbancia (o transmitancia).

65 Cabe señalar que este procedimiento de cálculo puede usar la absorbancia (o transmitancia) medida según el coeficiente de absorción molar de la 6'-metilresorufina. Como alternativa, en este procedimiento de cálculo, la absorbancia (o transmitancia) de interés se compara con la absorbancia (o transmitancia) de un material de referencia (por ejemplo, una solución patrón o un suero de referencia), Se conoce el valor de la actividad lipasa. Estos

procedimientos pueden seleccionarse adecuadamente.

Cabe señalar que el valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra se calcula preferentemente usando la diferencia de absorbancia ($\Delta Abs.$) determinada restando el valor en blanco de la absorbancia (o transmitancia) de la solución de reacción final obtenida midiendo la muestra.

Ejemplos

A continuación, se describe específicamente la presente invención en detalle haciendo referencia a los ejemplos. La presente invención, sin embargo, no se limita a estos ejemplos.

<Ejemplo 1> (Producción (1) de solución de sustrato para medir la actividad lipasa)

Se midió el punto de turbidez del presente polímero. Se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de la presente invención. También, se determinó el diámetro de las micelas de una emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

1. Medición del punto de turbidez

(1) Preparación de solución acuosa que contiene el presente polímero

Se mezclaron cada uno de los cuatro siguientes tipos (a) a (d) de aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y de los dos siguientes tipos (e) a (f) de un condensado de polioxietileno/polioxipropileno con agua pura de modo que la concentración fue del 0,1 % (p/v). Por consiguiente, se preparó una solución acuosa que contenía el presente polímero.

- (a) KF-351A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
- (b) KF-354L (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
- (c) KF-355A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
- (d) KF-6011 (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
- (e) Pluronic L-34 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))
- (f) Pluronic L-44 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(2) Medición del punto de turbidez del presente polímero

(i) Se vertió cada uno de los 6 tipos (a) a (f) de la solución acuosa que contiene el presente polímero (la concentración 0,1 % (p/v)) como se ha preparado en el apartado (1) anterior en un tubo de ensayo individual de 1 ml.

(ii) A continuación, se dispusieron estos tubos de ensayo en un tanque de agua del termostato (el modelo: BK-33; el distribuidor: YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD. (Japón)), y se aumentó la temperatura del tanque de agua en 1 °C a la vez. Cabe señalar que la temperatura del tanque de agua se midió con un termómetro de mercurio.

(iii) Entonces, se observó la presente solución acuosa que contenía polímero en cada tubo de ensayo colocado en el tanque de agua del termostato. Se registró la temperatura a la que esta solución acuosa se volvió turbia como el punto de turbidez del presente polímero.

Cabe señalar que, en el tanque de agua del termostato (BK-33) usado para la medición del punto de turbidez, el límite superior de la temperatura a la que se puede calentar el tanque de agua es de 77 °C. De modo que, cuando la solución acuosa no se volvió turbia y no se alcanzó el punto de turbidez incluso tras elevar la temperatura del tanque de agua hasta 77 °C, el registro fue designado como "superior a 77 °C".

(3) Resultados medidos

A continuación, se enumera el punto de turbidez de cada presente polímero medido y registrado en el apartado (2) anterior.

- (a) KF-351A: 52 °C
- (b) KF-354L: Superior a 77 °C
- (c) KF-355A: 67 °C
- (d) KF-6011: 64 °C
- (e) Pluronic L-34: 65 °C
- (f) Pluronic L-44: 67 °C

2. Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención

Se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

(1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), un sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, y se colocaron en cada uno de los 6 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

(2) A continuación, se pesaron 4,0 g de cada uno de los 4 siguientes tipos (a) a (d) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y de los 2 siguientes tipos (e) a (f) del condensado de polioxietileno/polioxipropileno y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1).

(a) KF-351A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(b) KF-354L (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(c) KF-355A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(d) KF-6011 (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(e) Pluronic L-34 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(f) Pluronic L-44 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(3) Tras la adición en el apartado anterior (2), se colocó cada vaso de precipitados en un tanque de agua del termostato (el modelo: BK-33; el distribuidor: YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD. (Japón)) fijado a una temperatura de 67 °C. Luego, se agitó cada vaso de precipitados, y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero a 67 °C. Cabe señalar que la temperatura del tanque de agua se midió y se verificó con un termómetro de mercurio.

Esta mezcla (agitación) a 67 °C se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que se colocó cada vaso de precipitados sobre un agitador (un agitador electromagnético de control remoto; el modelo: HP40107; el distribuidor: Sansho Co., Ltd. (Japón)) en el tanque de agua a una temperatura de 67 °C mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador a "3".

(4) A continuación, se aspiró toda la "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero" como se describe en el apartado (3) anterior usando una micropipeta de cada vaso de precipitados. Se añadió toda (toda la cantidad de) la mezcla de la micropipeta a una "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura", que se había mantenido a 20 °C en otro vaso de precipitados (el volumen: 10 ml), bajo agitación.

Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, se mezcló la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

Entre tanto, se midió la temperatura de la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" en cada vaso con un termómetro de mercurio, y se verificó si la temperatura era o no de 20 °C.

(5) A continuación, el "líquido mezclado después de haberse mezclado la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero) y la cierta cantidad de agua pura" como se ha descrito en el apartado (4) anterior se mezcló además con una cierta cantidad de agua pura para tener un volumen final de 200 ml.

(6) El procedimiento anterior permitió la producción de los seis siguientes tipos (a) a (f) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción y el método de simplificación de la producción de acuerdo con la presente invención.

Cabe señalar que, en cualquiera de (los 6 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM y el presente polímero tenía una concentración de 2,0 % (p/v). Además, no hubo ni un gradiente de concentración observable ni una fuerte turbidez en ninguna de (los seis tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa. De esta forma, se examinó a simple vista si cada solución de sustrato se había mezclado uniformemente o no.

(a) Solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A)

(b) Solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-354L)

(c) Solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-355A)

(d) Solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-6011)

(e) Solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-34)

(f) Solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-44)

3. Medición del diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

Se determinó el diámetro de las micelas en una emulsión de (los 6 tipos de) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa como se produjo en el apartado 2 anterior.

5 (1) Medición del diámetro de las micelas en emulsión

10 (i) Cada celda de plástico individual contenía 2,5 ml de cada uno de los 6 tipos ((a) a (f) del apartado 2.(7)) anterior de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM; el presente polímero tenía una concentración del 2,0 % (p/v)) como se produjo en el apartado 2 anterior.

15 (ii) A continuación, se colocó cada celda de plástico en un analizador de distribución de tamaño de partículas con dispersión de luz dinámica (el modelo: LB-550; el distribuidor: Horiba, Ltd. (Japón)). Después, se midió el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa en cada celda de plástico. Cabe señalar que la medición se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

(2) Resultados medidos

20 La Tabla 1 muestra el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada uno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa como se midió en el apartado (1) anterior.

Cabe señalar que la Tabla 1 indica el diámetro medio (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada uno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

25 Además, La Tabla 1 también muestra los resultados de observación de cómo se veían a simple vista los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Además, la Tabla 1 muestra los resultados de la medición del punto de turbidez del presente polímero usado en cada uno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa como se determina en el apartado 1.

30 Cabe señalar que en la columna "Resultados de la observación" de dicha tabla, "O" indica que "no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración".

35 Entre tanto, en la columna "Punto de turbidez del presente polímero usado" de dicha tabla, Se designó el valor medido del punto de turbidez del presente polímero usado en cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Cuando la solución de sustrato no se volvió turbia y no se alcanzó el punto de turbidez incluso tras elevar la temperatura del tanque de agua hasta 77 °C, el espacio se completó con "Superior a 77 °C".

[Tabla 1]

Presente invención				
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Presente polímero	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión	Resultados de la observación	Punto de turbidez del presente polímero usado
Solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa	KF-351A	514,6 nm	○	52 °C
Solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa	KF-354L	564,5 nm	○	Superior a 77 °C
Solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa	KF-355A	115,9nm	○	67 °C
Solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa	KF-6011	151,4nm	○	64 °C
Solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-34	1.063,9 nm	○	65 °C
Solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-44	109,1nm	○	67 °C
Resultados de la observación ○ : no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración.				

40 (3) Discusión

La Tabla 1 demuestra que, con respecto a los 6 tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, las soluciones de sustrato (a) a (f) para medir la actividad lipasa) producidos de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de cada emulsión varía de

100 nm a 1.100 nm.

Es decir, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas se midió como se ha descrito anteriormente. Los resultados demuestran que cualquiera de los seis tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa está compuesto de partículas de micelas y se produce como una solución de sustrato emulsionada para medir la actividad lipasa.

En cualquiera de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en cada emulsión se encuentra dentro de un intervalo de 60 nm a 1.500 nm, en cuyo intervalo, la velocidad de reacción con una lipasa es alta, la emulsión resultante es estable, y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede almacenarse y usarse durante un largo período.

Además, la Tabla 1 muestra que no hubo un gradiente de concentración observable, turbidez fuerte, ni coloración en ninguno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Por lo tanto, no se encontraron dichos problemas.

Lo anterior demuestra que el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por los siguientes puntos (i) a (iii).

(i) En los procesos convencionales, se mezcla un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución que contiene un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se añade gota a gota un líquido que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; se inyecta a chorro un líquido que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución; se agita una solución de sustrato para medir la actividad lipasa usando un mezclador fuerte a alta velocidad; se somete una solución de sustrato para medir la actividad lipasa a ultrasonidos; o similares. En la presente invención, la mezcla no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial ni otros artículos.

(ii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede agitar, por ejemplo, usando un mezclador común a una velocidad típica, y por lo tanto, se puede producir usando un procedimiento simple, corto y económico. Por lo tanto, se puede simplificar la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

(iii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida es adecuada para la medición de la actividad lipasa en una muestra.

<Ejemplo 2> (Producción (2) de solución de sustrato para medir la actividad lipasa)

Se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de la presente invención y un proceso de control. También, se determinó el diámetro de las micelas de una emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

1. Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa

Se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

Además, se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

<1> Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de la presente invención.

(1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se pesó un sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, y se colocó en cada uno de 5 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

(2) A continuación, se pesaron 4,0 g de cada uno de los 3 siguientes tipos (a) a (c) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y de los 2 siguientes tipos (d) a (e) del condensado de polioxietileno/polioxipropileno y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1).

(a) KF-351A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(b) KF-355A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(c) KF-6011 (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(d) Pluronic L-34 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(e) Pluronic L-44 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(3) Después de la adición como se describe en el apartado (2) anterior, se sometió cada vaso de precipitados a agitación a temperatura ambiente (25 °C). Después, se agitó cada vaso de precipitados, y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero en cada vaso de precipitados.

Esta mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

5 (4) A continuación, se usó una micropipeta para añadir una "cierta cantidad (4,0 ml) de concentración de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" a temperatura ambiente (25 °C) con agitación a (toda) la "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero" en el vaso de precipitados como se describe en el apartado (3) anterior.

10 Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, se mezcló la "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

15 (5) A continuación, se mezcló además una cierta cantidad adicional de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) con el "líquido mezclado una vez mezclada la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero) y la cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" como se describe en el apartado (4) anterior para tener un volumen final de 200 ml.

20 (6) El procedimiento anterior permitió la producción de los cinco siguientes tipos (A) a (E) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención.

Cabe señalar que, en cualquiera de (los 5 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM y el presente polímero tenía una concentración de 2,0 % (p/v).

25 Además, no hubo ni un gradiente de concentración observable ni una fuerte turbidez en ninguna de (los cinco tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa. De esta forma, se examinó a simple vista si cada solución de sustrato se había mezclado uniformemente o no.

30 (A) Solución de sustrato (A) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A)

(B) Solución de sustrato (B) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-355A)

(C) Solución de sustrato (C) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-6011)

35 (D) Solución de sustrato (D) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-34)

(E) Solución de sustrato (E) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-44)

40 <2> Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

(1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), un sustrato para medir la actividad lipasa, y se colocaron en cada uno de 5 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

45 (2) A continuación, se pesaron 4,0 g de cada uno de los siguientes tipos (f) a (j) de un tensioactivo (cada uno era un tensioactivo no iónico) y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1).

50 (f) Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán) (el distribuidor: TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (Japón))

(g) NIKKOL GO-460V (polioxietilen(60)-tetraoleato-sorbitol) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))

(h) NIKKOL TL-10 (polioxietilen(20)-sorbitol de mono-ácido graso de coco) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))

55 (i) SANNIX GP-1000 (polioxipropilengliceriléter) (el distribuidor: Sanyo Chemical Industries, Ltd. (Japón))

(j) NIKKOL TMGO-15 (polioxietilen(15)-monooleato-glicerilo) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))

(3) Tras la adición como se describe en el apartado (2) anterior, se agitó cada vaso de precipitados a temperatura ambiente (25 °C), y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo en cada vaso de precipitados.

60 Esta mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

65 (4) A continuación, se usó una micropipeta para añadir una "cierta cantidad (4,0 ml) de concentración de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" a temperatura ambiente (25 °C) con agitación a (toda) la "mezcla

del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo" en el vaso de precipitados como se describe en el apartado (3) anterior.

Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" se mezcló con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

(5) A continuación, se mezcló además una cierta cantidad adicional de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) con el "líquido mezclado una vez mezclada la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo) y la cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" como se describe en el apartado (4) anterior para tener un volumen final de 200 ml.

(6) El procedimiento anterior permitió la producción de los cinco siguientes tipos (F) a (J) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

Cabe señalar que, en cualquiera de (los 5 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM y cada tensioactivo tenía una concentración del 2,0 % (p/v).

(F) Solución de sustrato (F) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Tween 80)

(G) Solución de sustrato (G) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL GO-460V)

(H) Solución de sustrato (H) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL TL-10)

(I) Solución de sustrato (I) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: SANNIX GP-1000)

(J) Solución de sustrato (J) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL TMGO-15)

Cabe señalar que cualquiera de los anteriores "(F) Solución de sustrato (F) para medir la actividad lipasa", "(G) solución de sustrato (G) para medir la actividad lipasa" y "(H) solución de sustrato (H) para medir la actividad lipasa" no tenía ni un gradiente de concentración observable ni una fuerte turbidez, y se mezcló uniformemente, lo que se comprobó a simple vista.

Sin embargo, la anterior "(I) solución de sustrato (I) para medir la actividad lipasa" era muy turbia. Además, en la anterior "(J) Solución de sustrato (J) para medir la actividad lipasa", se produjo coloración.

2. Medición del diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

Con respecto a los 5 tipos ((A) a (E) del apartado anterior 1.<1>(7)) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de la presente invención y los 4 tipos ((F) a (I) del apartado 1.<2>(7) anterior de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de control, se midió el diámetro de las micelas de cada emulsión (cabe señalar que debido a la coloración producida en la "(J) Solución de sustrato (J) para medir la actividad lipasa", no se determinó el diámetro de las micelas en una emulsión de la misma).

(1) Medición del diámetro de las micelas en emulsión

(i) Cada celda de plástico individual contenía 2 ml de cada uno de los 5 tipos ((A) a (E) del apartado 1.<1>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (para cada una, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM; el presente polímero tenía una concentración del 2,0 % (p/v)) producida en el apartado 1.<1> anterior y los 4 tipos ((F) a (I) del apartado 1.<2>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (para cada una, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM; el tensioactivo tenía una concentración del 2,0 % (p/v)) producida en el apartado 1.<2> anterior.

(ii) A continuación, se introdujo una sonda óptica (fibra óptica) de un analizador de la distribución del tamaño de partícula con dispersión de luz dinámica (el modelo: Nanotrak UPA-EX250; el distribuidor: NIKKISO CO., LTD. (Japón)) en cada celda de plástico una a una. Después, se midió el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa en cada celda de plástico. Cabe señalar que la medición se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

(2) Resultados medidos

La Tabla 2 muestra el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada uno de los 9 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa como se midió en el apartado (1) anterior.

Cabe señalar que la Tabla 2 indica el diámetro medio (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada uno de los 9 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

5 Además, la Tabla 2 muestra los resultados de la observación visual de (los 5 tipos de) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida en el apartado 1.<1> anterior mediante el proceso de la presente invención y (el total de 5 tipos de) solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida en el apartado 1.<2> mediante el proceso de control.

10 Cabe señalar que en la columna "Resultados de la observación" de dicha tabla, "O" indica que "no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración". El "× (*1)" indica que "se produjo una fuerte turbidez" y el "× (*2)" indica que "se produjo coloración".

[Tabla 2]

Presente invención			
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Presente polímero	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión	Resultados de la observación
Solución de sustrato (A) para medir la actividad lipasa	KF-351A	147 nm	○
Solución de sustrato (B) para medir la actividad lipasa	KF-355A	156 nm	○
Solución de sustrato (C) para medir la actividad lipasa	KF-6011	105 nm	○
Solución de sustrato (D) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-34	112 nm	○
Solución de sustrato (E) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-44	89nm	○
Control			
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Tensioactivo	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión	Resultados de la observación
Solución de sustrato (F) para medir la actividad lipasa	Tween80	41 nm	○
Solución de sustrato (G) para medir la actividad lipasa	NIKKOL GO-460V	51 nm	○
Solución de sustrato (H) para medir la actividad lipasa	NIKKOL TL-10	35 nm	○
Solución de sustrato (I) para medir la actividad lipasa	SANNIX GP-1000	213 nm	× (*1)
Solución de sustrato (J) para medir la actividad lipasa	NIKKOL TMGO-15	(Sin medir)	× (*2)
Resultados de la observación ○ : no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración. × (*1): se produjo una fuerte turbidez. × (*2): se produjo coloración.			

15 (3) Discusión

(I) Solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

20 La Tabla 2 demuestra que, con respecto a los 5 tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, las soluciones de sustrato (A) a (F) para medir la actividad lipasa) producidos de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de cada emulsión varía de 80 nm a 200 nm.

25 Es decir, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas se midió como se ha descrito anteriormente. Los resultados demuestran que cualquiera de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa está compuesto de partículas de micelas y se produce como una solución de sustrato emulsionada para medir la actividad lipasa.

30 En cualquiera de los 5 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en cada emulsión se encuentra dentro de un intervalo de 60 nm a 1.500 nm, en cuyo intervalo, la velocidad de reacción con una lipasa es alta, la emulsión resultante es estable, y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede almacenarse y usarse durante un largo período.

Además, la Tabla 2 muestra que no hubo un gradiente de concentración observable, turbidez fuerte, ni coloración en ninguno de los 5 tipos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, no se encontraron dichos problemas.

5 Lo anterior demuestra que el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por los siguientes puntos (i) a (iii).

10 (i) En los procesos convencionales, se mezcla un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución que contiene un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se añade gota a gota un líquido que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; se inyecta a chorro un líquido que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución; se agita una solución de sustrato para medir la actividad lipasa usando un mezclador fuerte a alta velocidad; se somete una solución de sustrato para medir la actividad lipasa a ultrasonidos; o similares. En la presente invención, la mezcla no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial ni otros artículos.

15 (ii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede agitar, por ejemplo, usando un mezclador común a una velocidad típica, y por lo tanto, se puede producir usando un procedimiento simple, corto y económico. Por lo tanto, se puede simplificar la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

20 (iii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida es adecuada para la medición de la actividad lipasa en una muestra.

(II) Solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de control

25 La Tabla 2 demuestra que con respecto a la "(F) solución de sustrato (F) para medir la actividad lipasa", la "(G) solución de sustrato (G) para medir la actividad lipasa" y la "(H) solución de sustrato (H) para medir la actividad lipasa" producidas de acuerdo con el proceso de control, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de cada emulsión es inferior a 60 nm.

30 Es decir, en cualquiera de (el total de los tres tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de control, se midió el diámetro (tamaño de partícula) de sus micelas. Los resultados demuestran que cualquiera de ellas se produce como una solución de sustrato emulsionada para medir la actividad lipasa que se compone de partículas de micelas.

35 Sin embargo, cualquiera de (el total de los 3 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de control, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en cada emulsión está fuera del intervalo de 60 nm a 1.500 nm, en cuyo intervalo, la velocidad de reacción con una lipasa es alta, la emulsión resultante es estable, y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede almacenarse y usarse durante un largo período.

40 Es decir, se encuentra que cualquiera de (el total de tres tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de control no es adecuada para medir la actividad lipasa en una muestra.

45 (b) Además, como se describe en la Tabla 2, se produjo una fuerte turbidez en la "(I) Solución de sustrato (I) para medir la actividad lipasa" producida mediante el proceso de control. Además, en la "(J) Solución de sustrato (J) para medir la actividad lipasa", se produjo coloración.

Es decir, se encuentra que cualquiera de (el total de dos tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de control no es adecuada para medir la actividad lipasa en una muestra.

50 <Ejemplo 3> (Producción (3) de solución de sustrato para medir la actividad lipasa)

También, se produjeron soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de la presente invención y se determinó el proceso de control y el diámetro de las micelas en una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

55 1. Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa

Se produjeron soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

60 Además, se produjeron soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

<1> Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de la presente invención.

65 (1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (6'-metilresorufina)

(DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se pesó un sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, y se colocó en cada uno de 4 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

(2) A continuación, se pesaron 2,0 g de cada uno de los 2 siguientes tipos (a) a (b) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1). Además, se pesaron 4,0 g de cada uno de los siguientes 2 tipos (a) a (b) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1) (en concreto, para cada uno de los presentes polímeros, se prepararon un vaso de precipitados, en el que se pesaron y añadieron 2,0 g del presente polímero, y otro vaso de precipitados, en el que se pesaron y añadieron 4,0 g del presente polímero).

(a) KF-351A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(b) KF-6011 (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))

(3) Tras la adición como se describe en el apartado (2) anterior, se agitó cada vaso de precipitados a temperatura ambiente (25 °C), y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero en cada vaso de precipitados.

Esta mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

(4) A continuación, se usó una micropipeta para añadir una "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" a temperatura ambiente (25 °C) con agitación a (toda) la "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero" en el vaso de precipitados como se describe en el apartado (3) anterior.

Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, se mezcló la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" con (toda) la mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

(5) A continuación, el "líquido mezclado después de haberse mezclado la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero) y la cierta cantidad de agua pura" como se ha descrito en el apartado (4) anterior se mezcló además con una cierta cantidad de agua pura para tener un volumen final de 200 ml.

(6) El procedimiento anterior permitió la producción de los 4 siguientes tipos [1] a [4] de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención.

Cabe señalar que, en cualquiera de (los 4 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM.

Entre tanto, la concentración del presente polímero fue del 1,0 % (p/v) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa obtenida al pesar 2,0 g del presente polímero y añadirlos al vaso de precipitados como se describe en el apartado (2) anterior. Después, la concentración del presente polímero fue del 2,0 % (p/v) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa obtenida al pesar 4,0 g del presente polímero y añadirlos al vaso de precipitados.

[1] Solución de sustrato [1] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A (la concentración: 1,0 % (p/v)))

[2] Solución de sustrato [2] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A (la concentración: 2,0 % (p/v)))

[3] Solución de sustrato [3] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-6011 (la concentración: 1,0 % (p/v)))

[4] Solución de sustrato [4] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-6011 (la concentración: 2,0 % (p/v)))

<2> Producción de solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

(1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), un sustrato para medir la actividad lipasa, y se dispusieron en cada uno de 24 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

(2) A continuación, se pesaron 2,0 g de cada uno de los 12 siguientes tipos (c) a (n) de un tensioactivo (cada uno era un tensioactivo no iónico) y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1). Además, se pesaron 4,0 g de cada uno de los 12 siguientes tipos (c) a (n) de un tensioactivo (cada uno era un tensioactivo no iónico) y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1).

(c) NIKKOL BT-7 (alquiléter secundario de polioxiétileno (7)) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))

- (d) NIKKOL NP-7,5 (nonilfeniléter de polioxietileno (7,5)) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))
 (e) EMALGEN 1108 (alquiléter polioxietileno(8)) (el distribuidor: Kao Corporation (Japón))
 (f) Triton X-100 (octilfeniléter de polioxietileno (10)) (el distribuidor: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japón))
 5 (g) Brij 35 (lauriléter de polioxietileno (23)) (el distribuidor: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japón))
 (h) Triton X-405 (isooctilfeniléter de polioxietileno (40)) (el distribuidor: Sigma-Aldrich Co. LLC. (Japón))
 (i) Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitán) (el distribuidor: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japón))
 10 (j) NIKKOL NP-15 (nonilfeniléter de polioxietileno (15)) (el distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd. (Japón))
 (k) EMALGEN B-66 (tribencilfeniléter de polioxietileno) (el distribuidor: Kao Corporation (Japón))
 (l) EMALGEN A-60 (feniléter de polioxietileno distirenado) (el distribuidor: Kao Corporation (Japón))
 (m) Triton X-114 (octilfeniléter de polioxietileno (8)) (el distribuidor: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japón))
 15 (n) SANNIX GP-440 (gliceriléter de polioxipropileno) (el fabricante: Sanyo Chemical Industries, Ltd. (Japón))

(3) Tras la adición como se describe en el apartado (2) anterior, se agitó cada vaso de precipitados a temperatura ambiente (25 °C), y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo en cada vaso de precipitados.

Esta mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

(4) A continuación, se usó una micropipeta para añadir una "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" a temperatura ambiente (25 °C) con agitación a (toda) la "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo" en el vaso de precipitados como se describe en el apartado (3) anterior.

Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, se mezcló la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" con (toda) la mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada sustrato".

Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

(5) A continuación, el "líquido mezclado después de haberse mezclado la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo) y la cierta cantidad de agua pura" como se ha descrito en el apartado (4) anterior se mezcló además con una cierta cantidad de agua pura para tener un volumen final de 200 ml.

(6) El procedimiento anterior permitió la producción de los 24 siguientes tipos [5] a [28] de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de control.

40 Cabe señalar que, en cualquiera de (los 24 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM.

Entre tanto, la concentración de cada tensioactivo fue del 1,0 % (p/v) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa obtenida al pesar 2,0 g del tensioactivo y añadirlos al vaso de precipitados como se describe en el apartado (2) anterior. Después, la concentración del presente polímero fue del 2,0 % (p/v) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa obtenida al pesar 4,0 g del tensioactivo y añadirlos al vaso de precipitados.

[5] Solución de sustrato [5] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL BT-7 (la concentración: 1,0 % (p/v))

50 [6] Solución de sustrato [6] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL BT-7 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[7] Solución de sustrato [7] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL NP-7.5 (la concentración: 1,0 % (p/v))

55 [8] Solución de sustrato [8] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL NP-7.5 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[9] Solución de sustrato [9] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN 1108 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[10] Solución de sustrato [10] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN 1108 (la concentración: 2,0 % (p/v))

60 [11] Solución de sustrato [11] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-100 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[12] Solución de sustrato [12] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-100 (la concentración: 2,0 % (p/v))

65 [13] Solución de sustrato [13] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Brij 35 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[14] Solución de sustrato [14] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el

tensioactivo: Brij 35 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[15] Solución de sustrato [15] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-405 (la concentración: 1,0 % (p/v))

5 [16] Solución de sustrato [16] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-405 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[17] Solución de sustrato [17] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Tween 20 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[18] Solución de sustrato [18] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Tween 20 (la concentración: 2,0 % (p/v))

10 [19] Solución de sustrato [19] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL NP-15 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[20] Solución de sustrato [20] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: NIKKOL NP-15 (la concentración: 2,0 % (p/v))

15 [21] Solución de sustrato [21] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN B-66 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[22] Solución de sustrato [22] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN B-66 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[23] Solución de sustrato [23] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN A-60 (la concentración: 1,0 % (p/v))

20 [24] Solución de sustrato [24] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: EMALGEN A-60 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[25] Solución de sustrato [25] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-114 (la concentración: 1,0 % (p/v))

25 [26] Solución de sustrato [26] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: Triton X-114 (la concentración: 2,0 % (p/v))

[27] Solución de sustrato [27] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: SANNIX GP-440 (la concentración: 1,0 % (p/v))

[28] Solución de sustrato [28] para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el tensioactivo: SANNIX GP-440 (la concentración: 2,0 % (p/v))

30 2. Observación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y medir el diámetro de las micelas en emulsión de la misma

<1> Observación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

35 (1) Examen

Con respecto a los 4 tipos ([1] a [4] del apartado anterior 1.<1>(7)) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de la presente invención y los 24 tipos ([5] a [28] del apartado 1.<2> (7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de control, se examinó cada una a simple vista.

40

(2) Resultados de la observación

45 La Tabla 3 muestra los resultados de la observación de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa que se habían examinado a simple vista en el apartado (1) anterior.

Cabe señalar que en la columna "Resultados de la observación" de dicha tabla, "○" indica que "no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración". Además, el "× (*3)" indica "no uniforme (el sustrato para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo se separaron o se separaron en una capa de aceite y una capa de agua)".

50

[Tabla 3]

Presente invención				
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Presente polímero	Concentración (% (p/v))	Resultados de la observación	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión
Solución de sustrato (1) para medir la actividad lipasa	KF-351A	1,0	○	170 nm
Solución de sustrato (2) para medir la actividad lipasa	KF-351A	2,0	○	177 nm
Solución de sustrato (3) para medir la actividad lipasa	KF-6011	1,0	○	180 nm
Solución de sustrato (4) para medir la actividad lipasa	KF-6011	2,0	○	160 nm
Control				
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Tensioactivo	Concentración (% (p/v))	Resultados de la observación	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión
Solución de sustrato (5) para medir la actividad lipasa	NIKKOL BT-7	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (6) para medir la actividad lipasa	NIKKOL BT-7	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (7) para medir la actividad lipasa	NIKKOL NP-7.5	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (8) para medir la actividad lipasa	NIKKOL NP-7.5	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (9) para medir la actividad lipasa	EMALGEN 1108	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (10) para medir la actividad lipasa	EMALGEN 1108	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (11) para medir la actividad lipasa	Triton X-100	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (12) para medir la actividad lipasa	Triton X-100	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (13) para medir la actividad lipasa	Brij35	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (14) para medir la actividad lipasa	Brij35	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (15) para medir la actividad lipasa	Triton X-405	1,0	3 (*3)	(Sin medir)

(continuación)

Control				
Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Tensioactivo	Concentración (% (p/v))	Resultados de la observación	Diámetro (medio) (tamaño de partícula) de micelas en emulsión
Solución de sustrato (16) para medir la actividad lipasa	Triton X-405	2,0	3 (*3)	(Sin medir)
Solución de sustrato (17) para medir la actividad lipasa	Tween20	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (18) para medir la actividad lipasa	Tween20	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (19) para medir la actividad lipasa	NIKKOL NP-15	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (20) para medir la actividad lipasa	NIKKOL NP-15	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (21) para medir la actividad lipasa	EMALGEN B-66	1,0	3 (*3)	(Sin medir)
Solución de sustrato (22) para medir la actividad lipasa	EMALGEN B-66	2,0	3 (*3)	(Sin medir)
Solución de sustrato (23) para medir la actividad lipasa	EMALGEN A-60	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (24) para medir la actividad lipasa	EMALGEN A-60	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (25) para medir la actividad lipasa	Triton X-114	1,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (26) para medir la actividad lipasa	Triton X-114	2,0	○	[Inferior a 10 nm]
Solución de sustrato (27) para medir la actividad lipasa	SANNIX GP-440	1,0	3 (*3)	(Sin medir)
Solución de sustrato (28) para medir la actividad lipasa	SANNIX GP-440	2,0	× (*3)	(Sin medir)

Resultados de la observación ○ : no se observaron ni un gradiente de concentración, ni turbidez fuerte, ni coloración.
 × (*3): no uniforme (el sustrato para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo se separaron o se separaron en una capa de aceite y una capa de agua).

<2.> Medición del diámetro de las micelas en emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

- 5 Con respecto a los 4 tipos ([1] a [4] del apartado 1.<1>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de la presente invención y los 18 tipos ([5] a [14], [17] a [20] y [23] a [26] del apartado 1.<2>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de control, se midió el diámetro de las micelas de cada emulsión.
- 10 Cabe señalar que la Tabla 3, que ha mostrado los resultados de la observación, demuestra que cada uno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa ([15], [16], [21], [22], [27] y [28] del apartado 1.<2>(7) anterior) producidos mediante el proceso de control "no era uniforme" (el sustrato para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo se separaron o se separaron en una capa de aceite y una capa de agua)". Era evidente que no eran adecuadas para medir la actividad lipasa, de modo que no se midió el diámetro de las micelas de cada emulsión.

15

(1) Medición del diámetro de las micelas en emulsión

Con respecto a los 4 tipos ([1] a [4] del apartado 1.<1>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de la presente invención y los 18 tipos ([5] a [14], [17] a [20] y [23] a [26] del

apartado 1.<2>(7) anterior) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producidos mediante el proceso de control, Se midió el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa mientras se ejecutaba el procedimiento como se describe en el apartado 2.(1) (i) a (ii) del Ejemplo 2.

5 (2) Resultados medidos

La Tabla 3 muestra el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa como se midió en el apartado anterior (1).

10 Cabe señalar que la Tabla 3 indica el diámetro medio (tamaño de partícula) de las micelas en una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

15 En el presente documento, la columna "Diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en emulsión" de dicha tabla muestra los valores medidos del diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en una emulsión de cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa. En el analizador de la distribución del tamaño de partículas con dispersión de luz dinámica (el modelo: Nanotrak UPA-EX250) usado para la medición, el límite inferior de la medición con respecto al diámetro (tamaño de partícula) de las micelas es de 10 nm. Por consiguiente, cuando el analizador mostró que el resultado medido era inferior al límite inferior de la medición, se completó el espacio correspondiente con "Inferior a 10 nm".

3. Discusión

<1> Solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

25 la Tabla 3 demuestra que no hubo un gradiente de concentración observable, turbidez fuerte, ni coloración en ninguno de los 4 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa (soluciones de sustrato (1) a (4) para medir la actividad lipasa) producidos de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, no se encontraron dichos problemas.

30 Además, la Tabla 3 demuestra que, con respecto a los 4 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, las soluciones de sustrato (1) a (4) para medir la actividad lipasa) producidos de acuerdo con el proceso de producción de acuerdo con la presente invención, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de cada emulsión varía de 100 nm a 200 nm.

35 Es decir, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas se midió como se ha descrito anteriormente. Los resultados demuestran que cualquiera de los cuatro tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa está compuesto de partículas de micelas y se produce como una solución de sustrato emulsionada para medir la actividad lipasa.

40 En cualquiera de estos 4 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en cada emulsión se encuentra dentro de un intervalo de 60 nm a 1.500 nm, en cuyo intervalo, la velocidad de reacción con una lipasa es alta, la emulsión resultante es estable, y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede almacenarse y usarse durante un largo período.

45 Lo anterior ha confirmado que el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por los siguientes puntos (i) a (iii).

50 (i) En los procesos convencionales, se mezcla un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución que contiene un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); se añade gota a gota un líquido que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; se inyecta a chorro un líquido que contenga un sustrato para medir la actividad lipasa en una solución; se agita una solución de sustrato para medir la actividad lipasa usando un mezclador fuerte a alta velocidad; se somete una solución de sustrato para medir la actividad lipasa a ultrasonidos; o similares. En la presente invención, la mezcla no requiere un procesamiento laborioso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato especial ni otros artículos.

55 (ii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede agitar, por ejemplo, usando un mezclador común a una velocidad típica, y por lo tanto, se puede producir usando un procedimiento simple, corto y económico. Por lo tanto, se puede simplificar la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

60 (iii) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida es adecuada para la medición de la actividad lipasa en una muestra.

<2> Solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de control

65 La Tabla 3 demuestra que cada uno de los 6 tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa ([15], [16], [21], [22], [27] y [28] del apartado 1.<2>(7) anterior) producido mediante el proceso de control "no era uniforme" (el sustrato para medir la actividad lipasa y cada tensioactivo se separaron o se separaron en una capa de aceite y una capa de agua)", siendo inestable para la medición de la actividad lipasa.

Además, la Tabla 3 muestra los resultados de la medición en los que, en relación con los 18 tipos de solución de sustrato ([5] a [14], [17] a [20], y [23] a [26] del apartado anterior 1.<2>(7)) para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de control, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas de cada emulsión fue inferior al límite inferior de medición, en concreto, "inferior a 10 nm", lo que indica que ninguna de ellas se produjo como una solución de sustrato emulsionada para medir la actividad lipasa que estaba compuesta de partículas de micelas.

Por lo tanto, se encuentra que cualquiera de (el total de 24 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de control no es adecuada para medir la actividad lipasa en una muestra.

< Ejemplo 4 >

(Medición de la actividad lipasa en la muestra)

Se midió la actividad lipasa de una muestra usando cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención.

1. Reactivo de medición

<1> Medición de solución de sustrato que contiene reactivo para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

Se produjo un reactivo para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) que estaba compuesto por un segundo reactivo y un primer reactivo correspondiente al segundo reactivo compuesto por cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

(1) Primer reactivo

Se disolvieron los siguientes componentes reactivos cada uno a la concentración designada en agua pura, y se ajustó el pH a pH 8,4 (20 °C) para preparar el primer reactivo.

Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) 2 % (p/v)

Cloruro de calcio (un activador de la lipasa) 5 mM

Colipasa (derivada de un páncreas de cerdo; el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)) 375K unidades/l (5 mg/l)

Bicina (un tampón) 40 mM

(2) Segundo reactivo

Se usaron cada uno de los 6 tipos ((a) a (f) del apartado 2.(7) del Ejemplo 1) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenían una concentración de 0,6 mM; el presente polímero tenía una concentración del 2,0 % (p/v)) producida mediante el proceso de la presente invención (descrito a continuación), como segundo reactivo.

(a) Solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A)

(b) Solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-354L)

(c) Solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-355A)

(d) Solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-6011)

(e) Solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-34)

(f) Solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-44)

<2> Reactivo de control disponible en el mercado

Se usó como control el reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) "Li quitech Lipase Color II" (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)).

Cabe señalar que este "Liquitech Lipase Color II" (en adelante, a veces denominado "reactivo de control disponible en el mercado") está compuesto por un "tampón", que es el primer reactivo, y un "sustrato líquido", que es el segundo reactivo, (que contiene DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa).

2. Muestra

Se usó como muestra cada uno de los siguientes "(1) material de referencia", "(2) suero de control 1", "(3) suero de control 2" y "(4) suero de control 3".

(1) Material de referencia

Se usó un material de referencia disponible en el mercado, una "enzima JSCC convencional de referencia, (JCCLS CRM-001)" (Lote n.º. 001b; el distribuidor: Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards (Japón)) como "material de referencia".

(2) Suero de control 1

Se usó "Aalto Control I G" (el distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control disponible en el mercado para el control de calidad como el "suero de control 1".

(3) Suero de control 2

Se usó un "prototipo" de "Aalto Control II" (Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control para el control de calidad como el "suero de control 2".

(4) Suero de control 3

Se usó "Aalto Control CRPII U" (el distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control disponible en el mercado para el control de calidad como el "suero de control 3".

3. Medición de la actividad lipasa en la muestra

Se midió la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior como se describe a continuación.

<1> Medición usando reactivo de medición que contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

Un reactivo para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) estaba compuesto por el segundo reactivo y el primer reactivo correspondiente al segundo reactivo que contenía la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, y se usó para medir la actividad lipasa en cada muestra del apartado 2 anterior usando un analizador clínico 7180 (el distribuidor: Hitachi High-Technologies Corporation (Japón)).

(1) Caso en el que se usó la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

(a) En el analizador clínico 7180, se añadieron 160 µl del "primer reactivo" del apartado 1.<1>(1) como el primer reactivo a 2,6 µl de cada una de las muestras, incluyendo el "(1) material de referencia", "(2) suero de control 1", "(3) suero de control 2" y "(4) suero de control 3" como se describe en el apartado 2 anterior para preparar una reacción a 37 °C.

(b) A continuación, entre el punto 16 (270,093 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 17 (286,977 segundos después de la adición del primer reactivo), se añadieron, como segundo reactivo, 96 µl de la "solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa" del apartado anterior 1.<1>(2)(a) para preparar una reacción a 37 °C.

(c) Entonces, se midió un cambio en la absorbancia desde el punto 30 (516,049 segundos tras la adición del primer reactivo) hasta el punto 34 (587,426 segundos después de la adición del primer reactivo) a una longitud de onda principal de 570 nm y otra longitud de onda de 700 nm (basado en un aumento de la concentración de 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa en una muestra, se midió un cambio en la absorbancia).

(d) Cabe señalar que, como calibrador para la calibración, se usó un "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" (Lote n.º 158688; el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)).

Se realizó el mismo procedimiento descrito en los apartados (a) a (c) anteriores, excepto que se usó el "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" como muestra. Después, se determinó un cambio en la absorbancia cuando se usó el calibrador "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" para la medición (basándose en un aumento de la concentración de la 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa (valor conocido) en el calibrador, se midió un cambio en la absorbancia).

(e) Entretanto, se usó solución salina para medir un reactivo en blanco.

Se realizó el mismo procedimiento descrito en los apartados (a) a (c) anteriores, excepto que se usó la solución salina como muestra. Después, se determinó un cambio en la absorbancia cuando se usó la solución salina para la medición (se midió un cambio en la absorbancia del reactivo blanco).

(f) A continuación, se calculó un "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia de cada muestra" restando

el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (e) anterior, al cambio en la absorbancia de cada muestra del apartado 2 anterior entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (c) anterior.

5 Además, se calculó un "valor de diferencia en el cambio de la absorbancia del calibrador" restando el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (e) anterior, al cambio en la absorbancia del calibrador (con un valor de actividad lipasa conocido) entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (d) anterior.

10 Posteriormente, se compararon el "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia de cada muestra", el "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia del calibrador" y el "valor de actividad lipasa del calibrador" conocido. Después, se calculó la proporción para dar el valor de actividad lipasa de cada muestra como se describe en el apartado 2.

15 (2) Caso en el que se usó la solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (b) (del apartado 1.<1>(2)(b) anterior) para medir la actividad lipasa en lugar de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como el segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 24 (411,887 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 28 (480,360 segundos después de la adición del primer reactivo). Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

25 (3) Caso en el que se usó la solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (c) (del apartado 1.<1>(2)(c) anterior) para medir la actividad lipasa en lugar de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior. Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

35 (4) Caso en el que se usó la solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (d) (del apartado 1.<1>(2)(d) anterior) para medir la actividad lipasa de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior. Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

45 (5) Caso en el que se usó la solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (e) (del apartado 1.<1>(2)(e) anterior) para medir la actividad lipasa de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 23 (394,043 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 27 (462,516 segundos después de la adición del primer reactivo). Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

55 (6) Caso en el que se usó la solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (f) (del apartado 1.<1>(2)(f) anterior) para medir la actividad lipasa de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 19 (322,665 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 23 (394,043 segundos después de la adición del primer reactivo). Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

65 <2> Medición usando el reactivo de control disponible en el mercado

Se usó un reactivo de control disponible en el mercado para medir la actividad lipasa en cada muestra del apartado 2

anterior usando un analizador clínico 7180 (el distribuidor: Hitachi High-Technologies Corporation (Japón)).

5 Específicamente, se realizó el mismo procedimiento que se describe en el apartado <1>(1)(a) a (f) anterior, excepto que se usó el "tampón" del "reactivo de control disponible en el mercado" (del apartado 1.<2> anterior) en lugar del "primer reactivo" como primer reactivo como se describe en el apartado <1>(1)(a) anterior; se usó la "solución de sustrato" del "reactivo de control disponible en el mercado" (del apartado 1.<2> anterior) en lugar de la solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado <1>(1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado <1>(1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 21 (358,354 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 25 (429,732 segundos después de la adición del primer reactivo)". Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó el reactivo de control disponible en el mercado.

15 (4) Resultados de la medición

La medición se llevó a cabo como se describe en el apartado 3.<1> y <2> anterior. La Tabla 4 muestra el valor medido de la actividad lipasa de cada muestra como se describe en el apartado 2 anterior.

20 Cabe señalar que el valor de la actividad lipasa de cada muestra que se presenta en la Tabla 4 se representa en Unidad/l.

[Tabla 4]

	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Presente polímero	Valores medidos			
			Material convencional	Suero de control 1	Suero de control 2	Suero de control 3
Presente invención	Solución de sustrato (a) para medir la actividad lipasa	KF-351A	167,0	24,6	27,2	29,6
	Solución de sustrato (b) para medir la actividad lipasa	KF-354L	164,6	20,8	23,2	25,7
	Solución de sustrato (c) para medir la actividad lipasa	KF-355A	146,3	24,0	25,0	30,9
	Solución de sustrato (d) para medir la actividad lipasa	KF-6011	149,5	25,7	28,2	32,8
	Solución de sustrato (e) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-34	178,3	21,8	23,2	25,9
	Solución de sustrato (f) para medir la actividad lipasa	Pluronic L-44	157,7	21,5	22,3	26,0
Reactivo de control disponible en el mercado			143,1	22,4	25,6	27,9
[Unidad/l]						

5. Discusión

25 En la Tabla 4, se usaron las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas mediante el proceso de la presente invención, obteniéndose los resultados de medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa en cada muestra. Incluso cuando se usaron los seis tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa (las soluciones de sustrato (a a f) para medir la actividad lipasa), cualquiera de ellos proporcionó esencialmente los mismos valores que los resultados de medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa cuando se calcula usando el reactivo de control disponible en el mercado.

30 Esto demuestra que las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención pueden usarse para medir con precisión la actividad lipasa en una muestra.

35 Específicamente, cuando se usa el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede simplificar, acortarse y abaratare. Además, se ha demostrado que las soluciones de sustrato pueden proporcionar resultados de medición precisos (valores medidos) de la actividad lipasa en una muestra.

40

< Ejemplo 5>

(Correlación entre las mediciones de la actividad lipasa en la muestra)

5 Se midió la actividad lipasa de una muestra usando cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención. También, se midió la actividad lipasa en la misma muestra usando el reactivo de control disponible en el mercado. Después, se examinó la correlación entre estos resultados.

1. Reactivo de medición

10 <1> Medición de solución de sustrato que contiene reactivo para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

15 Se usó un reactivo para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) que estaba compuesto por un segundo reactivo y un primer reactivo correspondiente al segundo reactivo que contenía cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

[1] Primer reactivo

20 Como primer reactivo, se usó el "primer reactivo" como se describe en el apartado 1.<1>(1) del Ejemplo 4.

[2] Segundo reactivo

25 Se produjo una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención.

(1) En primer lugar, se pesaron 0,09 g de éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina) (DGGMR) (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), un sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, y se dispusieron en cada uno de 5 vasos de precipitados (el volumen: 10 ml).

30 (2) A continuación, se pesaron 4,0 g de cada uno de los 3 siguientes tipos (a) a (c) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) y de los 2 siguientes tipos (d) a (e) del condensado de polioxietileno/polioxipropileno y se añadieron a uno de los vasos de precipitados diferentes usados en el apartado anterior (1).

- 35
- (a) KF-351A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
 - (b) KF-354L (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
 - (c) KF-355A (el distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón))
 - (d) Pluronic L-34 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))
 - 40 (e) Pluronic L-44 (el distribuidor: ADEKA CORPORATION (Japón))

(3) Tras la adición como se describe en el apartado (2) anterior, se colocó cada vaso de precipitados en un tanque de agua con termostato (modelo: BK-33; el distribuidor: YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD. (Japón)) fijado a una temperatura de 67 °C. Luego, se agitó cada vaso de precipitados, y se mezclaron el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero a 67 °C. Cabe señalar que la temperatura del tanque de agua se midió y se verificó con un termómetro de mercurio.

45 Esta mezcla (agitación) a 67 °C se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

50 Cabe señalar que se colocó cada vaso de precipitados sobre un agitador (un agitador electromagnético de control remoto; el modelo: HP40107; el distribuidor: Sansho Co., Ltd. (Japón)) en el tanque de agua a una temperatura de 67 °C mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador a "3".

(4) A continuación, se aspiró toda la "mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero" como se describe en el apartado (3) anterior usando una micropipeta de cada vaso de precipitados. Se añadió toda (toda la cantidad de) la mezcla de la micropipeta a una "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura", que se había mantenido a 20 °C en otro vaso de precipitados (el volumen: 10 ml), bajo agitación.

55 Tras la adición, se prosiguió esta agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, se mezcló la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" con (toda) la mezcla preparada mezclando el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero".

60 Cabe señalar que cada vaso de precipitados se colocó en un agitador múltiple (el modelo: M-3; el distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) mientras se realizaba esta agitación. Se rotó una barra magnética en cada vaso de precipitados mientras se ajustaba el dial de una unidad de control de este agitador múltiple a "3".

Entre tanto, se midió la temperatura de la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" en cada vaso con un termómetro de mercurio, y se verificó si la temperatura era o no de 20 °C.

65 (5) A continuación, el "líquido mezclado después de haberse mezclado la mezcla (la mezcla del sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa y el presente polímero) y la cierta cantidad de agua pura" como se ha descrito en el

apartado (4) anterior se mezcló además con una cierta cantidad de agua pura para tener un volumen final de 200 ml.

5 (6) El procedimiento anterior permitió la producción de los cinco siguientes tipos (i) a (v) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con el proceso de producción y el método de simplificación de la producción de acuerdo con la presente invención.

10 Cabe señalar que, en cualquiera de (los 5 tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa, el sustrato (DGGMR) para medir la actividad lipasa tenía una concentración de 0,6 mM y el presente polímero tenía una concentración de 2,0 % (p/v).

Además, no hubo ni un gradiente de concentración observable ni una fuerte turbidez en ninguna de (los cinco tipos de) estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa. De esta forma, se examinó a simple vista si cada solución de sustrato se había mezclado uniformemente o no.

15 (i) Solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-351A)

(ii) Solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-354L)

20 (iii) Solución de sustrato (iii) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: KF-355A)

(iv) Solución de sustrato (iv) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-34)

25 (v) Solución de sustrato (v) para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente polímero: Pluronic L-44)

<2> Reactivo de control disponible en el mercado

30 Un reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) "Liquitech Lipase Color II" (el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)) como se describe en el apartado 1.<2> del Ejemplo 4 se usó como reactivo de control disponible en el mercado.

2. Muestra

35 Cada uno de los siguientes "(1) material de referencia", "(2) suero de control 1", "(3) suero de control 2", "(4) suero de control 3", "(5) suero combinado" y "(6) suero humano" se usó como muestra.

(1) Material de referencia

40 Se usó un material de referencia disponible en el mercado, una "enzima JSCC convencional de referencia, (JCCLS CRM-001)" (Lote nº. 001b; el distribuidor: Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards (Japón)) como "material de referencia".

(2) Suero de control 1

45 Se usó "Aalto Control I G" (el distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control disponible en el mercado para el control de calidad como el "suero de control 1".

(3) Suero de control 2

50 Se usó un "prototipo" de "Aalto Control II" (Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control para el control de calidad como el "suero de control 2".

(4) Suero de control 3

55 Se usó "Aalto Control CRPII U" (el distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)) de suero de control disponible en el mercado para el control de calidad como el "suero de control 3".

(5) Suero combinado

60 Se usó una mezcla de sueros humanos como "suero combinado".

(6) Suero humano

65 Se usó suero humano (el total de 50 muestras) como "suero humano".

3. Medición de la actividad lipasa en la muestra

Se midió la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior como se describe a continuación.

<1> Medición usando reactivo de medición que contiene una solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención

Un reactivo para medir la actividad lipasa (kit de reactivos para medir la actividad lipasa) estaba compuesto por el segundo reactivo y el primer reactivo correspondiente al segundo reactivo que contenía la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, y se usó para medir la actividad lipasa en cada muestra del apartado 2 anterior usando un analizador clínico 7180 (el distribuidor: Hitachi High-Technologies Corporation (Japón)).

(1) Caso en el que se usó la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

(a) En el analizador clínico 7180, se añadieron 160 µl del "primer reactivo" del apartado 1.<1>(1) como el primer reactivo a 2,6 µl de cada una de las muestras, incluyendo el "(1) material de referencia", "(2) suero de control 1", "(3) suero de control 2", "(4) suero de control 3", "(5) suero combinado" y "(6) suero humano" como se describe en el apartado 2 anterior para preparar una reacción a 37 °C.

(b) A continuación, entre el punto 16 (270,093 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 17 (286,977 segundos después de la adición del primer reactivo), se añadieron, como segundo reactivo, 96 µl de la "solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa" del apartado anterior 1.<1>[2](7)(i) para preparar una reacción a 37 °C.

(c) Entonces, se midió un cambio en la absorbancia desde el punto 30 (516,049 segundos tras la adición del primer reactivo) hasta el punto 34 (587,426 segundos después de la adición del primer reactivo) a una longitud de onda principal de 570 nm y otra longitud de onda de 700 nm (basado en un aumento de la concentración de 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa en una muestra, se midió un cambio en la absorbancia).

(d) Cabe señalar que, como calibrador para la calibración, se usó un "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" (Lote n.º 158688; el distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)).

Se realizó el mismo procedimiento descrito en los apartados (a) a (c) anteriores, excepto que el "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" se usó como muestra. Después, se determinó un cambio en la absorbancia cuando se usó el calibrador "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" para la medición (basándose en un aumento de la concentración de la 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa (valor conocido) en el calibrador, se midió un cambio en la absorbancia).

(e) Entretanto, se usó solución salina para medir un reactivo en blanco.

Se realizó el mismo procedimiento descrito en los apartados (a) a (c) anteriores, excepto que se usó la solución salina como muestra. Después, se determinó un cambio en la absorbancia cuando se usó la solución salina para la medición (se midió un cambio en la absorbancia del reactivo blanco).

(f) A continuación, se calculó un "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia de cada muestra" restando el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (e) anterior, al cambio en la absorbancia de cada muestra del apartado 2 anterior entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (c) anterior.

Además, se calculó un "valor de diferencia en el cambio de la absorbancia del calibrador" restando el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (e) anterior, al cambio en la absorbancia del calibrador (con un valor de actividad lipasa conocido) entre los puntos anteriores, cambio que se había calculado en el apartado (d) anterior.

Posteriormente, se compararon el "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia de cada muestra", el "valor de la diferencia en el cambio de la absorbancia del calibrador" y el "valor de actividad lipasa del calibrador" conocido. Después, se calculó la proporción para dar el valor de actividad lipasa de cada muestra como se describe en el apartado 2.

(2) Caso en el que se usó la solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (ii) (del apartado 1.<1>[2](7)(ii) anterior) para medir la actividad lipasa de la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 24 (411,887 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 28 (480,360 segundos después de la adición del primer reactivo)". Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

(3) Caso en el que se usó la solución de sustrato (iii) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (iii) (del apartado 1.<1>[2](7)(iii) anterior) para medir la actividad lipasa en lugar de la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como el segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior. Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

(4) Caso en el que se usó la solución de sustrato (iv) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (iv) (del apartado 1.<1>[2](7)(iv) anterior) para medir la actividad lipasa en lugar de la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como el segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 23 (394,043 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 27 (462,516 segundos después de la adición del primer reactivo). Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (iv) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

(5) Caso en el que se usó la solución de sustrato (v) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo

Se realizó el mismo procedimiento que se describe en los apartados (1)(a) a (f) anteriores, excepto que se usó la solución de sustrato (v) (del apartado 1.<1>[2](7)(v) anterior) para medir la actividad lipasa en lugar de la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo del apartado (1)(b) anterior; y los puntos (puntos de tiempo) en los que se midió un cambio en la absorbancia como se describe en el apartado (1)(c) anterior se cambiaron de "entre los puntos 30 y 34" a "entre el punto 19 (322,665 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 23 (394,043 segundos después de la adición del primer reactivo). Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 2 anterior cuando se usó la solución de sustrato (v) para medir la actividad lipasa como segundo reactivo.

<2> Medición usando el reactivo de control disponible en el mercado

Se usó un reactivo de control disponible en el mercado para medir la actividad lipasa en cada muestra del apartado 2 anterior usando un analizador clínico 7180 (el distribuidor: Hitachi High-Technologies Corporation (Japón)).

Se realizó el procedimiento de acuerdo con el ensayo descrito en el apartado 3.<2> del Ejemplo 4 para medir la actividad lipasa de cada muestra como se describe en el apartado 2. (1) a (6) anterior usando el "tampón" (primer reactivo) y el "líquido de sustrato" (segundo reactivo) del "reactivo de control disponible en el mercado" del apartado 1.<2> anterior. Después, se determinó el valor de la actividad lipasa de cada una de las muestras correspondientes.

4. Resultados de la medición

(1) Gráficos de correlación

La Figura 1 son gráficos que indican la correlación entre los resultados de medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 3.<1> y los resultados de medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa de cada muestra del apartado 3.<2>.

Cabe señalar que la Figura 1[1] es un gráfico que indica la correlación cuando se usó la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención; la Figura 1[2] es un gráfico que indica la correlación cuando se usó la solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa; la Figura 1[3] es un gráfico que indica la correlación cuando se usó la solución de sustrato (iii) para medir la actividad lipasa; la Figura 1 [4] es un gráfico que indica la correlación cuando se usó la solución de sustrato (iv) para medir la actividad lipasa; y la Figura 1[5] es un gráfico que indica la correlación cuando se usó la solución de sustrato (v) para medir la actividad lipasa.

Cabe señalar que, en la Figura 1[1] a [5], el eje de abscisas (x) representa los resultados de la medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa de cada muestra obtenida usando el reactivo de control disponible en el mercado como se describe en el apartado 3.<2>. Los valores medidos se representan en Unidad/l.

Cabe señalar que, en la Figura 1[1] a [5], el eje de ordenadas (y) representa los resultados de medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa de cada muestra obtenida usando el "reactivo de medición que contiene cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención" como se describe en el apartado 3.<1>. Los valores medidos se representan en Unidad/l.

En el presente documento, en la Figura 1[1] a [5], las muestras del "material de referencia" se representaron como "Δ"; cada una de las muestras del "suero de control 1" se representaron como "○"; cada una de las muestras del "suero de control 2" se representaron como "□"; cada una de las muestras del "suero de control 3" se representaron

como "●"; cada una de las muestras del "suero combinado" se representaron como "◇"; y cada una de las muestras del "suero humano" (el total de 50 muestras) se representaron como "◆".

(2) Fórmula de la correlación de regresión

5 A continuación, se ilustra la fórmula de regresión y el coeficiente de correlación de la correlación entre los resultados de medición (valores medidos) obtenidos usando el "reactivo de medición que contiene cada solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención" como se describe en el apartado 3.<1> anterior y los resultados de medición (valores medidos) obtenidos usando el reactivo de control disponible en el mercado del apartado 3.<2> anterior (cabe señalar que "x" e "y" en las siguientes fórmulas de correlación de regresión son como se describe en el apartado (1) anterior).

15 [1] Cuando se usó la solución de sustrato (i) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, la fórmula de correlación de regresión fue $y = 1,205x - 7,999$ y el coeficiente de correlación fue $R^2: 0,9795$.

[2] Cuando se usó la solución de sustrato (ii) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, la fórmula de correlación de regresión fue $y = 1,136x - 10,04$ y el coeficiente de correlación fue $R^2: 0,9892$.

20 [3] Cuando se usó la solución de sustrato (iii) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, la fórmula de correlación de regresión fue $y = 1,041x - 1,756$ y el coeficiente de correlación fue $R^2: 0,9953$.

[4] Cuando se usó la solución de sustrato (iv) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, la fórmula de correlación de regresión fue $y = 1,1739x - 11,93$ y el coeficiente de correlación fue $R^2: 0,9861$.

25 [5] Cuando se usó la solución de sustrato (v) para medir la actividad lipasa como la solución de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, la fórmula de correlación de regresión fue $y = 1,1065x - 5,760$ y el coeficiente de correlación fue $R^2: 0,9980$.

5. Discusión

30 La Figura 1[1] a [5] y las fórmulas de correlación de regresión y los valores de los coeficientes de correlación como se describen en el apartado 4.(2) anterior demuestran que, incluso cuando se usaron los cinco tipos de solución de sustrato para medir la actividad lipasa, cualquiera de ellos dio una buena correlación entre los resultados de medición (valores medidos) de la actividad lipasa de cada muestra, valores que se calcularon usando las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producida mediante el proceso de la presente invención, y los resultados de la medición (valores medidos) del valor de la actividad lipasa como se calcula usando el reactivo de control disponible en el mercado.

40 Esto determina que las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa producidas de acuerdo con el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención pueden usarse para medir con precisión la actividad lipasa en una muestra.

45 Específicamente, cuando se usa el proceso de producción de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención, la producción de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se puede simplificar, acortarse y abaratare. Además, se ha demostrado que las soluciones de sustrato pueden proporcionar resultados de medición precisos (valores medidos) de la actividad lipasa en una muestra.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de producción de una solución de sustrato que se usa para medir la actividad lipasa en una muestra y que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, éster del ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6'-metilresorufina), comprendiendo el proceso las etapas de:
- 5
- (1) mezclar directamente el sustrato para medir la actividad lipasa y un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral o un condensado de polioxietileno/polioxipropileno para preparar una mezcla; y
- 10 (2) mezclar toda o una parte de la mezcla de la etapa (1) con agua o una solución acuosa.

Fig. 1

