



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 304**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/26** (2006.01)

**C12Q 1/32** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05809660 .3**

96 Fecha de presentación : **28.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1818412**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54

Título: **Un método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes.**

30

Prioridad: **29.11.2004 JP 2004-344427**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.08.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.08.2010**

73

Titular/es: **Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.**  
**2-9, Kanda-Tsukasa-Machi**  
**Chiyoda-ku, Tokyo 101-8535, JP**

72

Inventor/es: **Nakano, Takamitu;**  
**Niimi, Manabu y**  
**Ogihara, Fumiko**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 344 304 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

Un método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes, y también para la medición de un reactivo para el colesterol en lipoproteínas remanentes.

### 10 **Técnica anterior**

15 Con la tendencia reciente hacia una sociedad que envejece, la morbilidad de las enfermedades de adultos está aumentando rápidamente. En particular, la arteriosclerosis es bien conocida como uno de los principales factores causantes de enfermedades del sistema circulatorio, tales como las enfermedades del corazón y las enfermedades cerebrovasculares (incluyendo el infarto cerebral).

20 La acumulación de colesterol en los vasos sanguíneos desempeña un papel esencial en el crecimiento de la arteriosclerosis, y se asocia a varias lipoproteínas en la sangre. Las lipoproteínas, incluyen el colesterol, los ésteres de colesterol, la grasa neutra, los fosfolípidos y las apoproteínas como componentes. De estas lipoproteínas, el colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se conoce como un factor de riesgo negativo para la arteriosclerosis, mientras que el colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL) es conocido como un factor de riesgo positivo para la arteriosclerosis. Estos colesterolos se observan frecuentemente en el campo del diagnóstico clínico.

25 En los últimos años, sin embargo, se ha informado de que el colesterol en una lipoproteína inducida por un metabolismo lipídico tal como una lipoproteína remanente, más que el colesterol LDL, es un indicador más estrechamente relacionado como factor de riesgo de la arteriosclerosis. Desde el punto de vista de estos problemas, es cada vez más necesario desarrollar un método tecnológico para la medición de colesterolos en lipoproteínas de muestras biológicas con mayor facilidad y eficiencia.

30 Entre los métodos convencionales existentes para medir enzimáticamente el colesterol en lipoproteínas remanentes, hay informes que describen un método caracterizado por una creciente selectividad de medición mediante el uso de un gel sobre el cual se inmoviliza un anticuerpo para una apoproteína como componente de la lipoproteína o utilizando una enzima que degrada fosfolípidos, un tensioactivo, o similares, lo que permite a la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa o la colesterol deshidrogenasa actuar para que el éster de colesterol se convierta en colesterol, y luego medir el peróxido de hidrógeno o la coenzima reducida producidos (véanse los Documentos de Patente 1 y 2 y el Documento No de Patente 1).

35 Incluso esos métodos, sin embargo, tienen ventajas y desventajas en términos de selectividad de las lipoproteínas remanentes, facilidad de operación, período de tiempo de medición, y similares, y por lo tanto no son necesariamente suficientes.

Documento de Patente 1: Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública (JP-A) Núm. 2001-231597.

45 Documento de Patente 2: Patente Japonesa Núm. 2949354

Documento No de Patente 1: Domyakukoka (arteriosclerosis), 25 (9, 10), 371 (1998).

### 50 **Descripción de la invención**

#### **Problema a resolver por la invención**

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la medición con más facilidad y precisión del colesterol en una proteína remanente y proporcionar un reactivo para su uso en la realización de ese método.

#### **Medios para resolver los problemas**

60 A la luz de las circunstancias, los autores de la presente invención se han centrado en el hecho de que muchas colesterol esterases tienen no sólo actividad esterasa sino también un poco de actividad lipoproteína lipasa e investigaron varias afecciones para la medición del colesterol en lipoproteínas. Como resultado, se ha encontrado que si una colesterol esterasa en que la tasa de actividad de la lipoproteína lipasa es superior a la de la colesterol esterasa se selecciona y se utiliza con la colesterol oxidasa o la colesterol deshidrogenasa para medir el colesterol de las lipoproteínas, la selectividad hacia las lipoproteínas remanentes será alta y el colesterol de las lipoproteínas remanentes puede ser medido de forma selectiva a partir de muestras biológicas que contienen lipoproteínas tales como las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los quilomicrones (CM), las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), los CM remanentes, las VLDL remanentes y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) remanentes.

Por lo tanto, la presente invención está dirigida a un método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes, *caracterizado porque* se utiliza una colesterol esterasa, en la que la razón de actividad de una lipoproteína lipasa con respecto a una colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 12 a 7000, en un método para medir el colesterol en la lipoproteína midiendo el peróxido de hidrógeno o una coenzima reducida obtenida al permitir que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa o una colesterol deshidrogenasa actúe en una muestra de ensayo que contenga una lipoproteína.

La presente invención también se refiere a un reactivo de medición para el colesterol en lipoproteínas remanentes, incluyendo: una colesterol esterasa en la que la razón de actividad de una lipoproteína lipasa con respecto a una colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 12 a 7000; y una colesterol oxidasa o una colesterol deshidrogenasa.

### Efectos de la invención

Cuando se utilizan el método de medición y el reactivo de medición de acuerdo con la presente invención, el colesterol de las lipoproteínas remanentes se puede medir muy fácilmente con alta sensibilidad en poco tiempo.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra la especificidad de reacción con respecto a LDL en un caso en el que se utiliza una enzima LP;

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la especificidad de reacción con respecto HDL en un caso en el que se utiliza una enzima LP;

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la especificidad de reacción con respecto a VLDL no unida y VLDL unida en el método de la presente invención;

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la reactividad con respecto a VLDL no unida y VLDL unida en un caso en el que se añaden anticuerpos, y

La Fig. 5 es un gráfico que muestra una correlación entre el método de medición de la presente invención y un método de medición existente (RLP-II) cuando se miden las lipoproteínas remanentes en sangre.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

De acuerdo con la presente invención, el método para medir el colesterol en las lipoproteínas remanentes se realiza de la siguiente manera: se miden el peróxido de hidrógeno o una coenzima reducida obtenidos al permitir que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa o una colesterol deshidrogenasa actúen y se utiliza una colesterol esterasa, en la que la razón de actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) con respecto a la colesterol esterasa (CE) (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 12 a 7000.

La colesterol esterasa es una enzima que puede hidrolizar los ésteres de colesterol de las lipoproteínas para producir colesterol. Se sabe que en muchos casos, esta enzima tiene no sólo actividad esterasa sino también una pequeña actividad lipoproteína lipasa, es decir, actividad lipasa que hidroliza la grasa neutra. En la presente invención, es necesario utilizar una colesterol esterasa que tenga una actividad lipoproteína lipasa más fuerte que la actividad colesterol esterasa y, específicamente, es necesario utilizar una colesterol esterasa en la que la razón de actividad de la lipoproteína lipasa con respecto a la colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) sea de 12 a 7000, de modo que la enzima pueda actuar selectivamente sobre las lipoproteínas remanentes para permitir la hidrólisis selectiva de los ésteres de colesterol en la proteína. Por tanto, sólo se puede medir selectivamente el colesterol deseado de las lipoproteínas remanentes.

En la presente memoria, la actividad lipoproteína lipasa se refiere a una unidad de actividad que se calcula de acuerdo a un método de análisis de la actividad lipoproteína lipasa utilizando una emulsión de aceite de oliva (Horiuchi Y. *et al.*, J Biochem 1976; 80:367-370), y la actividad colesterol esterasa se refiere a una unidad de actividad que se calcula según un método de análisis de la actividad CEN utilizando un suero bovino (Kameno Y. *et al.*, J Clin Jap Ruta 1976; 24:650).

La razón de actividad de la lipoproteína lipasa con respecto a la colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) (en adelante referida simplemente como "razón de actividad") es de 12 a 7000, preferiblemente de 20 a 1000, más preferiblemente de 28 a 800.

Los ejemplos de la colesterol esterasa que tiene tal razón de actividad incluyen LP (con una razón de actividad de 460 a 800, fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), LPBP (con un razón de actividad de 5600 a 6900, fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), CEN (con una razón de actividad de 13,0 a 16,0, fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation), CE (con una razón de actividad de 13,0 a 16,0, fabricada por Amano Enzyme Inc.), COE 311 (con una razón de actividad de 28,0 a 35,0, fabricada por Toyobo Co., Ltd.), y enzimas que tienen la misma razón de actividad que cualquiera de las anteriores.

## ES 2 344 304 T3

La colesterol esterasa puede ser cualquiera entre una enzima derivada de microorganismos y una enzima de origen animal, siempre y cuando cumpla las condiciones anteriores.

5 La cantidad de colesterol esterasa puede estar por lo general en el intervalo de 0,1 a 200 unidades/ml, preferiblemente de 1 a 100 unidades/mL, dependiendo del contenido o las propiedades físicas de las lipoproteínas remanentes en la muestra de ensayo. En general, para los sujetos sanos, se pueden obtener buenos resultados de medición con una cantidad de 1 a 5 unidades/mL.

10 Aquí, se deben utilizar preferiblemente al menos 50 unidades/mL de la colesterol esterasa para los pacientes con hiperlipemia, particularmente para los pacientes con hiperlipidemia familiar de tipo III, para lo cual se ha demandado un método de medición sencillo. Para las mujeres embarazadas sanas, en las que se observa generalmente un aumento en el valor del colesterol en sangre, se pueden obtener buenos valores medidos utilizando 20 unidades/mL de la colesterol esterasa de acuerdo con la presente invención.

15 De acuerdo con la presente invención, el método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes puede incluir el pretratamiento de la muestra con un anticuerpo anti-apoB-100 y/o un anticuerpo anti-apoA-I. La adición del anticuerpo puede incrementar la selectividad de la colesterol esterasa hacia LDL o VLDL teniendo como componente y HDL o CM teniendo apoA-I como componente.

20 Tal técnica de tratamiento con anticuerpos se describe en la Patente Japonesa Núm. 2949354, en la que el procedimiento de operación incluye añadir un gel con anticuerpos unidos a una muestra y dejarlo reposar durante varias horas para separar las lipoproteínas remanentes de las otras lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL, CM) de modo que la selectividad de la colesterol esterasa aumenta circunstancialmente. Por el contrario, cuando se utiliza la colesterol esterasa según la presente invención, no hay necesidad de inmovilizar el anticuerpo en un gel, y la acción de la enzima sobre lipoproteínas distintas de las lipoproteínas remanentes puede ser inhibida sólo mediante la adición del anticuerpo. Como resultado, la selectividad a la lipoproteína remanente se puede aumentar. En el primer método, el anticuerpo inmovilizado en el gel se debe dejar reposar durante mucho tiempo después de la adición. De acuerdo con el método de la presente invención, sin embargo, el objeto se logra mediante la unión entre el anticuerpo y la lipoproteína, y por lo tanto, la siguiente operación se puede realizar varios minutos después de la adición, por lo que se pueden realizar mejoras espectaculares en la simplicidad, la medición de la exactitud y la reducción del tiempo del procedimiento.

25 Se puede utilizar cualquier anticuerpo apoB-100 o apoA-I sin limitaciones particulares, y el anticuerpo a utilizar puede ser cualquier anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal y una de sus combinaciones. Un ejemplo de los anticuerpos que reconocen apoB-100 incluye JI-H (fabricado por JIMRO Co., Ltd.), y un ejemplo del anticuerpo que reconoce apoA-I incluye H-12 (fabricado por JIMRO Co., Ltd.). La cantidad de adición del anticuerpo depende de la cantidad de HDL, LDL, VLDL, o CM en la muestra de ensayo. Por lo tanto debería ser suficiente la adición del anticuerpo en una cantidad tal que pueda unirse a la lipoproteína.

30 La colesterol oxidasa puede ser cualquier enzima que tenga la capacidad de oxidar el colesterol y producir peróxido de hidrógeno, cuyos ejemplos incluyen colesterol oxidasas derivadas de microorganismos o de origen animal.

35 La colesterol deshidrogenasa puede ser cualquier enzima que tenga la capacidad de oxidar el colesterol y reducir la coenzima oxidada, cuyos ejemplos incluyen colesterol deshidrogenasas derivadas de microorganismos o de origen animal.

40 La colesterol oxidasa y la colesterol deshidrogenasa se utilizan cada una preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 200 U/mL, más preferiblemente de 0,01 a 100 U/mL, en un líquido de reacción.

45 Además de la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y la colesterol deshidrogenasa, se pueden añadir varios tipos de iones metálicos, particularmente iones Ca para aumentar la especificidad y la estabilidad de la enzima en el método de medición de la presente invención.

50 La colesterol esterasa, la colesterol oxidasa o la colesterol deshidrogenasa se pueden modificar químicamente con un grupo incluyendo polietilenglicol como componente principal, un residuo oligosacárido soluble en agua, un grupo sulfopropilo, o similares, siempre que la modificación tenga la misma actividad, o la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa o la colesterol deshidrogenasa puedan ser enzimas modificadas que tengan la misma actividad obtenidas mediante ingeniería genética.

55 La reacción enzimática de acuerdo con la presente invención se puede realizar en un medio acuoso, y en particular se realiza preferiblemente en un tampón.

60 Los ejemplos del tampón incluyen tris(hidroximetil)aminometano, tampones fosfato, tampones borato, y tampones Good. Los ejemplos de los tampones Good incluyen ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropano-sulfónico (DIPSO), ácido 2-(2-hidroxietil)piperazino-N'-2-etanosulfónico (HE-PES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPSO), piperazino-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), y piperazino-N,N'-bis(ácido 2-hidroxipropano-3-sulfónico) (POPS).

## ES 2 344 304 T3

El tampón puede tener un pH de 4 a 10, preferiblemente de 5 a 9. El tampón se utiliza preferiblemente a una concentración de 5 a 500 mM, más preferiblemente de 10 a 200 mM, particularmente de manera preferible de 20 a 100 mM.

5 Cuando la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa se utilizan en el método de medición de la presente invención, el peróxido de hidrógeno se produce a partir del oxígeno por la reacción del colesterol. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno producido se puede cuantificar utilizando 4-aminoantipirina y fenoles, 4-aminoantipirina y reactivos Trinder, o un cromógeno altamente sensible, en presencia de peroxidasa.

10 Los ejemplos de los fenoles incluyen fenol, 4-clorofenol, m-cresol, y ácido 3-hidroxi-2,4,6-triodobenzoico (HTIB).

Los ejemplos de los reactivos Trinder (véase el catálogo colectivo, 19ª edición, 2002, publicado por DOJINDO LABORATORIES) incluyen anilinas tales como N-sulfopropil-anilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina (MAO), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS), N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina (TOPS), N-(2-hidroxi-m-toluidina, N,N-disulfopropil-3,5-dimetoxianilina, N-etil-N-sulfopropil-m-anisidina, N-etil-N-sulfopropil-anilina, N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetoxianilina, N-sulfopropil-disulfopropil-3,5-dimetoxianilina, N-etil-N-sulfopropil-3,5-dimetilanilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-anisidina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, N-etil-m-3-sulfopropil-3-metoxianilina (APPS), N-etil-N-3-sulfopropil-anilina (ALPS), y N-etil-N-2-hidroxi-3-sulfopropil-3-metoxianilina, o N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-succiniletildiamina (EMSE), o N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-acetiletildiamina.

Los ejemplos de los cromógenos altamente sensibles incluyen 10-(N-metilcarbamoil)-3,7-bis(dimetilamino)-fenotiadina (MCDP) descrita en la Publicación de la Solicitud de Patente Japonesa (JP-B) Núm. 60-33479, bis[3-bis(4-clorofenil)metil-4-dimetilaminofenil]amina (BCMA) descrita en el documento JP-B Núm. 4-27839, y los compuestos descritos en el documento JP-A Núm. 62-296. La concentración de los cromógenos es preferiblemente de 0,01 a 10 mg/ml.

30 Cuando se utilizan la colesterol esterasa y la colesterol deshidrogenasa, se produce NAD(P)H, que es una coenzima reducida, a partir de NAD(P) que es una coenzima oxidada, mediante la reacción del colesterol. El NAD(P)H puede ser cuantificado mediante la medición de la absorbancia del líquido de reacción a una longitud de onda de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 nm, preferiblemente de 330 a 400 nm, preferiblemente en concreto a aproximadamente 340 nm. El NAD(P)H también se puede cuantificar mediante un procedimiento que incluye la adición de diaforasa y una sal de tetrazolio para formar un colorante de formazán y determinar el colorante de formazán mediante colorimetría.

La reacción puede llevarse a cabo de 10 a 50°C, preferiblemente de 30 a 40°C, generalmente a 37°C durante 1 a 30 minutos, preferiblemente durante 2 a 10 minutos.

40 El reactivo de acuerdo con la presente invención incluye una colesterol esterasa en la que la actividad lipoproteína lipasa es más fuerte que la actividad colesterol esterasa e incluye colesterol oxidasa o colesterol deshidrogenasa.

45 Por ejemplo, en el caso en el que las lipoproteínas distintas de las lipoproteínas remanentes están presentes significativamente en la muestra de ensayo, se puede realizar un tratamiento previo con el anticuerpo anti-apoB-100 y el anticuerpo anti-apoA-I con el fin de reducir el efecto de las lipoproteínas. En tal caso, el reactivo incluye preferiblemente un primer reactivo que contiene el anticuerpo y un segundo reactivo que contiene la solución enzimática. En este caso, se prefiere añadir el primer reactivo a la muestra de ensayo y dejar que reaccione de 25 a 40°C durante 1 a 10 minutos, y después se debe añadir el segundo reactivo y dejar que actúe de 25 a 40°C durante 2 a 20 minutos.

Si fuera necesario, el reactivo de medición puede contener diferentes sales para solubilizar proteínas tales como las globulinas en la muestra biológica, coagulantes lipoproteicos, y otras enzimas.

55 Los ejemplos de las sales incluyen cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de magnesio, cloruro de litio, sulfato de litio, sulfato de amonio, nitrato de magnesio y nitrato de calcio, y las sales se pueden utilizar de 0 a 100 mM. Los ejemplos del coagulante lipoproteico incluyen polianiones tales como fosfotungstato, sulfato de dextrano y heparina, y sales de metales divalentes tales como magnesio, calcio y cobalto. Los ejemplos de otras enzimas incluyen la ascorbato oxidasa.

En la presente invención, se puede utilizar cualquier muestra de ensayo sin limitaciones particulares. En concreto, se pueden utilizar muestras biológicas tales como la propia sangre (sangre completa) o plasma sanguíneo, y fracciones sanguíneas tales como suero sanguíneo.

65

## ES 2 344 304 T3

### Ejemplos

La presente invención se describe con más detalle, mostrando los ejemplos siguientes, que no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### (1) Preparación de la muestra

Se separaron los componentes del suero en una fracción LDL y una fracción HDL, y se midieron cada una de las lipoproteínas. El método de fraccionamiento de proteínas se describe a continuación. Se prepararon una columna de afinidad con anticuerpo anti-apoB-100 unido y una columna de afinidad con anticuerpo anti-apoA-I unido, respectivamente. Se les incorporó el suero sanguíneo, y las fracciones unidas se recogieron y se designaron LDL y HDL, respectivamente. Las fracciones VLDL se separaron por ultracentrifugación (Havel R. J. *et al.*, J Clin Invest 1955; 34:1345., 120.000 rpm, 1,5 horas, 4°C) (VLDL Total), y a continuación la fracción unida por inmunoabsorción (con una columna de afinidad con anticuerpo anti-apoB-100 unido) fue designada VLDL Unida, mientras que la fracción de paso fue designada VLDL No Unida (fracción de lipoproteína remanente). En ambas mediciones en los Ejemplos 2 y 3, se utilizaron en la medición las muestras con una concentración de colesterol ajustada de 40 mg/dL.

##### (2) Preparación de los reactivos de medición

Los reactivos para medir el colesterol de las lipoproteínas remanentes fueron preparados como se muestra a continuación.

TABLA 1

Reactivo 1 (para el tratamiento previo con los anticuerpos)	
Tampón Good pH 6,8 (PIPES, fabricado por DOJINDO LABORATORIES)	50 mM
HDAOS (fabricado por DOJINDO LABORATORIES)	1 mM
Anticuerpo monoclonal anti-apoB-100 (JI-H, fabricado por JIMRO Co., Ltd.)	100 mg/mL
Anticuerpos monoclonal anti-apoA-I (H-12, fabricado por JIMRO Co., Ltd.)	100 mg/mL

# ES 2 344 304 T3

TABLA 2

5	Reactivo 2	
	Tampón Good pH 6,8 (BES, fabricado por DOJINDO LABORATORIOE)	50 mM
10	Colesterol esterasa	20 unidades/mL
15	LP (fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation) o CE (fabricada por Amano Enzyme Inc.)	
20	4-aminoantipirina (fabricada por KANTO CHEMICAL CO., INC)	3 mM
25	Peroxidasa (enzima fabricada por Amano Enzyme Inc.)	10 unidades/mL
30	Colesterol oxidasa (fabricada por Amano Enzyme Inc.)	6 unidades/mL

### (3) Método de medición y Resultados

35 Cuando se realizó el pretratamiento con anticuerpo, se añadieron a la célula de un espectrofotómetro 210  $\mu$ L de Reactivo 1, y se añadieron a esto 20  $\mu$ l de suero sanguíneo y se agitó y después se incubó a 37°C. Posteriormente, después de cinco minutos (Punto de Reacción 17), se añadieron a esto 70  $\mu$ L de Reactivo 2 preincubado a 37°C, y después se realizó la medición hasta cinco minutos más tarde (Punto de Reacción 33). La medición se realizó a una longitud de onda de 572 nm y una sublongitud de onda de 748 nm.

40 La evaluación se realizó basándose en el cambio de absorbancia del Punto de Reacción 17 al Punto de Reacción 33.

### 45 Ejemplo 2

#### (1) Especificidad de Reacción de la Colesterol Esterasa para LDL y HDL

50 La medición del colesterol se realizó con LDL y HDL que habían sido tratadas con tensioactivo al 0,1% (Emulgen, fabricado por Kao Corporation) y las soluciones no tratadas como muestras de ensayo. La colesterol esterasa utilizada fue la enzima LP (con una razón de actividad de 512, fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation) o una enzima CE (con una razón de actividad de 14,3, fabricada por la Amano Enzyme Inc.). La LDL y la HDL se muestran en las Figs. 1 y 2, respectivamente. El método de medición fue de acuerdo al Ejemplo 1. En ambos casos, cuando se utiliza la enzima LP, la reactividad se redujo significativamente, con respecto a la cantidad de colesterol reactivo total (tratado con tensioactivo). Cuando se utilizó la enzima CE, se obtuvo una alta absorción en comparación con el caso de la enzima LP.

### 60 Ejemplo 3

#### (2) Especificidad de la Reacción con respecto a VLDL No Unida (Fracción de Lipoproteína Remanente) y VLDL Unida

65 En el método de medición de acuerdo con la presente invención, se examinó la especificidad de la reacción con respecto a la fracción VLDL utilizando la enzima LP. El método de medición fue de acuerdo al Ejemplo 1. La Fig. 3 muestra la reactividad sin adición de anticuerpo anti-apoB-100 (JI-H) y anticuerpo anti-apoA-I (H-12). La Fig. 4 muestra la reactividad con la adición de los anticuerpos. Los anticuerpos se añadieron al primer líquido de tal forma

## ES 2 344 304 T3

que JI-H y H-12 alcanzaron una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las Figs. 3 y 4 muestran esencialmente la misma curva de reacción tanto de VLDL No Unida como de VLDL Unida, y se demostró que el colesterol de las lipoproteínas remanentes se midió de forma selectiva. Cuando se añadieron los anticuerpos, la reactividad de VLDL Unida se redujo a aproximadamente 1/3 de modo que se suprimió la reacción enzimática.

5 Así, se encontró que la adición de los anticuerpos permite una medición más precisa de las lipoproteínas remanentes.

### 10 Ejemplo 4

#### *Comparación con el Kit Asequible Comercialmente para Medir el Colesterol en Lipoproteínas Remanentes*

15 (1) El colesterol de las lipoproteínas remanentes en la fracción VLDL se midió con un kit de medición de proteínas remanentes convencional (RLP-C II, fabricado por JIMRO Co., Ltd.) y diferentes colesterol esterasas (LP con una razón de actividad de 512 fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation, LPBP con una razón de actividad de 6296 fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation, CEBPM con una razón de actividad del 11,2 fabricada por Toyobo Co., Ltd., CEN con una razón de actividad de 14,3 fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation, COE 311 con una razón de actividad del 31,8 fabricada por Toyobo Co., Ltd.) en las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, y se  
20 determinó la correlación. El resultado se muestra en la Tabla 1.

Como resultado, se observó una correlación con el valor medido con el kit ya disponible en el mercado cuando se utilizaron las cuatro enzimas distintas de CEBPM.

25 TABLA 3

Nombre CE	Actividad CE (U/mg)	Actividad LPL (U/mg)	Razón LPL/CE	Correlación Automatizada (r)
LP	5,8	2.970	512	0,899
LPBP	0,27	1.700	6.296	0,448
CEN	153	2.190	14,3	0,520
COE311	200	6.350	31,8	0,911
CEBPM	13,5	152	11,2	0,252

Actividad Lipoproteína lipasa (LPL): medida mediante análisis de la actividad LP (emulsión de aceite de oliva).

50 Actividad colesterol esterasa (CE): medida mediante análisis de la actividad CE (suero sanguíneo de ternera).

55 (2) El colesterol de las lipoproteínas remanentes en las muestras clínicas se midió utilizando un kit de medición de proteínas remanentes convencional (RLP-C II, fabricado por JIMRO Co., Ltd.) y el método de medición de la presente invención (utilizando LP (con una razón de actividad de 512, fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation) como colesterol esterasa, y se determinó su correlación.

60 En total se midieron 99 especímenes (incluyendo 14 especímenes de sujetos sanos, 20 especímenes de pacientes con hiperlipidemia incluyendo dos pacientes con hiperlipidemia de tipo III, y 65 especímenes de pacientes con enfermedad arterial coronaria) mediante el método RLP-C II y mediante el método RLP-C directo al mismo tiempo, y se compararon y examinaron las correlaciones. Como resultado, se obtuvo una buena correlación con la recta de regresión  $y = 0,987x + 0,326$  y el coeficiente de correlación  $r = 0,962$  (véase la Fig. 5).

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para medir el colesterol en lipoproteínas remanentes en el que se utiliza una colesterol esterasa en un método para medir el colesterol en las lipoproteínas mediante la medición del peróxido de hidrógeno o una coenzima reducida obtenidos al permitir que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa o una colesterol deshidrogenasa actúe sobre una muestra de ensayo que contiene una lipoproteína **caracterizado** porque la colesterol esterasa no sólo tiene actividad esterasa, sino también actividad lipoproteína lipasa con lo que la razón de actividad de una lipoproteína lipasa con respecto a una colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 12 a 7000.

10 2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la razón de actividad de la lipoproteína lipasa con respecto a la colesterol esterasa (actividad de la lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 28 a 800.

15 3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde la colesterol esterasa se selecciona entre LP, LPBP, CEN, CE, y COE 311.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente el pretratamiento de la muestra de ensayo con un anticuerpo anti-apoB-100 y/o un anticuerpos anti-apoA-I.

20 5. Un reactivo de medición para el colesterol en las lipoproteínas remanentes, que comprende:

25 (a) una colesterol esterasa que tiene no sólo actividad esterasa sino también actividad lipoproteína lipasa con lo que la razón de actividad de una lipoproteína lipasa con respecto a un colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es de 12 a 7000; y

(b) una colesterol oxidasa o una colesterol deshidrogenasa.

30 6. El reactivo de medición de acuerdo con la Reivindicación 5, donde la razón de actividad de la lipoproteína lipasa con respecto a la colesterol esterasa (actividad lipoproteína lipasa/actividad colesterol esterasa) es 28 a 800.

7. El reactivo de acuerdo con la Reivindicación 5, donde la colesterol esterasa se selecciona entre LP, LPBP, el CEN, CE, y COE 311.

35 8. Un reactivo de medición para el colesterol en lipoproteínas remanentes, que comprende:

(i) un primer reactivo que comprende un anticuerpo anti-apoB-100 y/o un anticuerpos anti-apoA-I, y

40 (ii) un segundo reactivo que comprende el reactivo de medición de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7.

45

50

55

60

65

Fig. 1

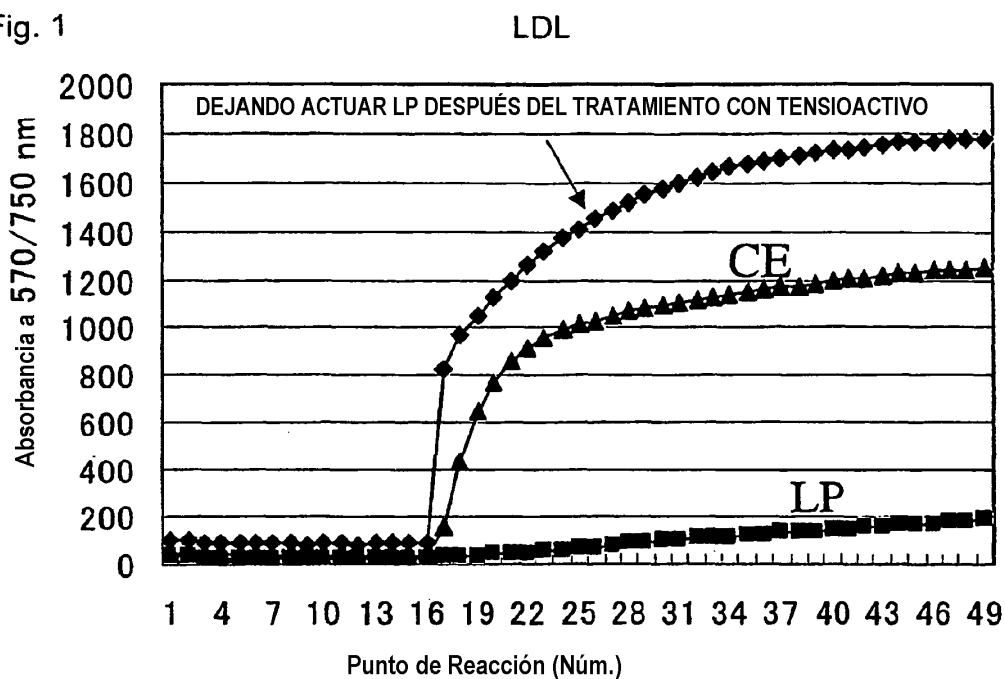


Fig. 2

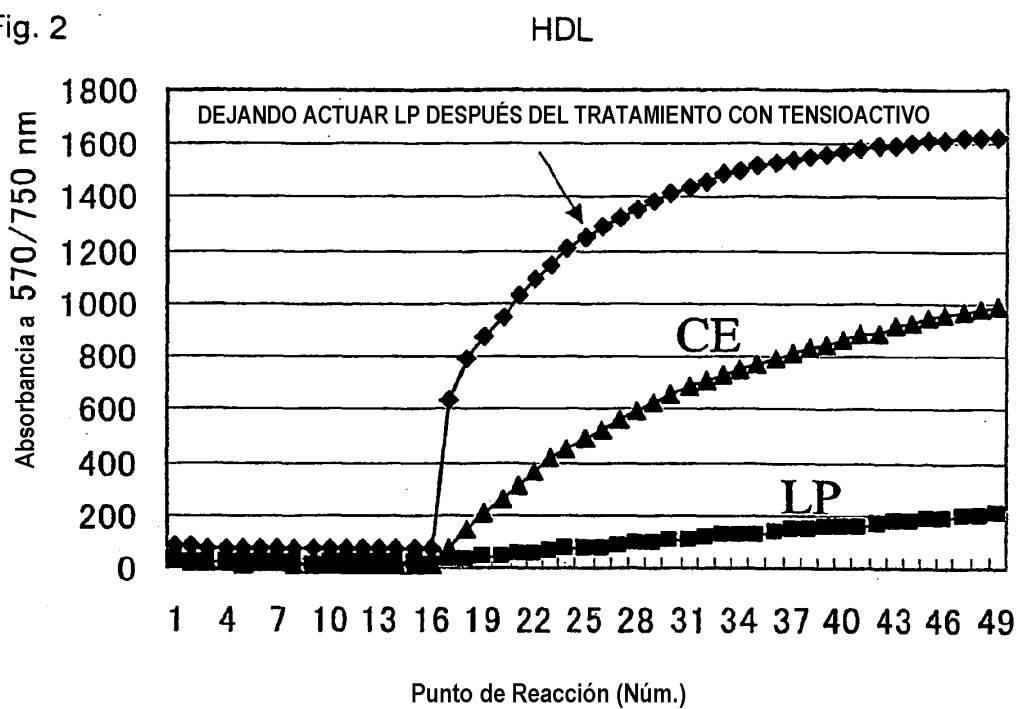


Fig. 3

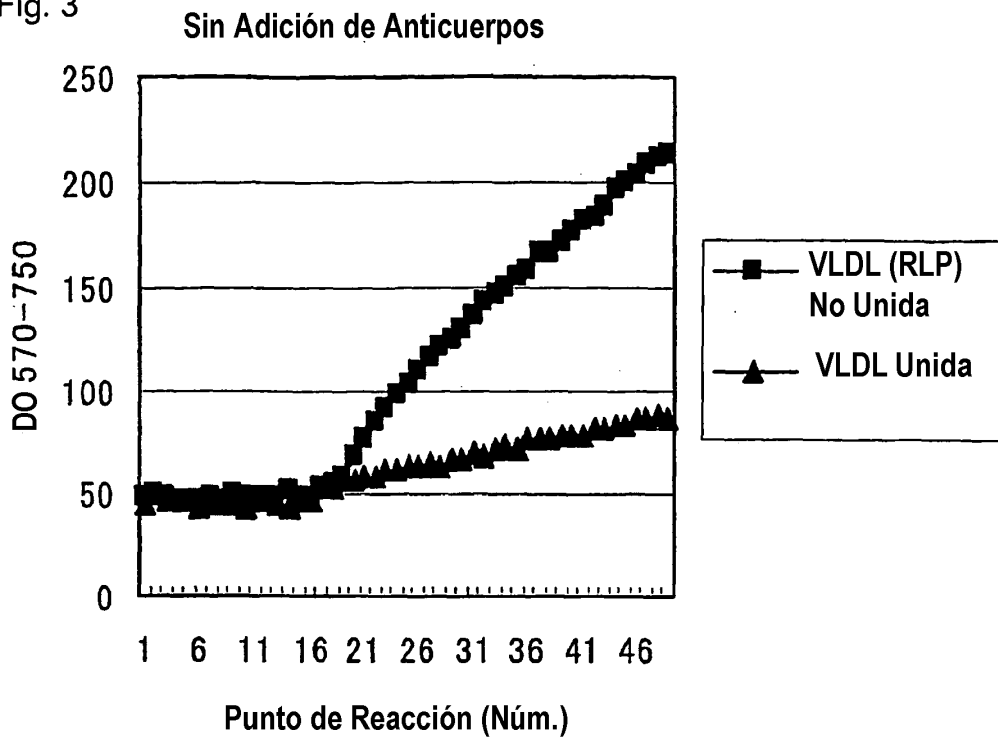


Fig. 4 Adición de Anticuerpos (JI-H:100  $\mu$ g/ml, H-12:100  $\mu$ g/ml)

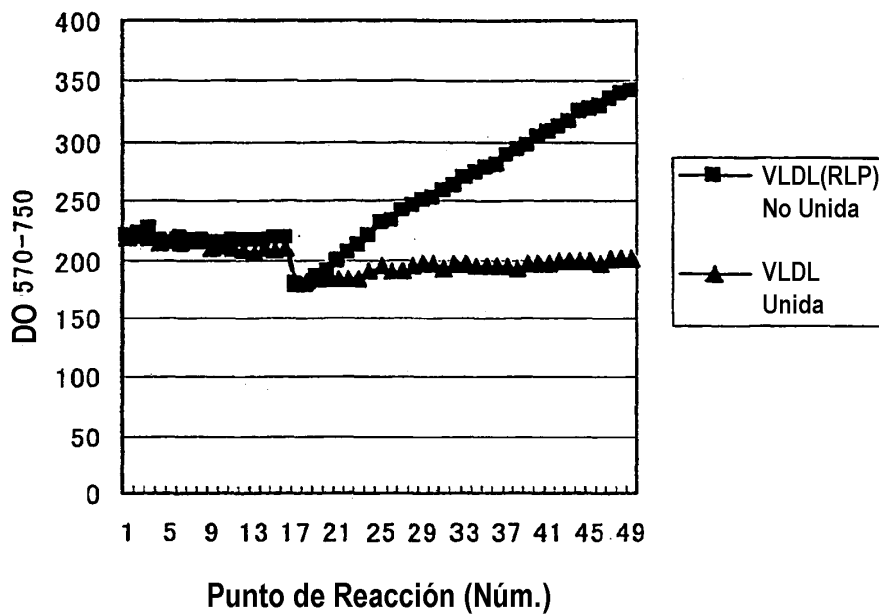


Fig. 5 Correlación entre RLP-C II y RLP-C Directo en Pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria, Pacientes con Hiperlipidemia y Sujetos sanos

