



(19) ES	(11) NUMERO 145004	(10) AI
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 32657/75	(32) FECHA 5 agosto 1975	(33) PAIS Gran Bretaña
--	-----------------------------	---------------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01M, G07C	(69) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(64) TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA EL ANALISIS DE LOS TRI-GLICERIDOS EN LOS LIQUIDOS ACUOSOS"

(71) SOLICITANTE (S) HYCEL, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 7920, Westpark Drive, HOUSTON, TEXAS 77036, USA
--

(72) INVENTOR (ES) Holvar Walter Ashløy
--

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE Don Jaime COMAS CARRERAS
--

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos serosos y más particularmente a un perfeccionamiento de la hidrólisis de los ésteres glicerinados de ácidos grasos contenidos en dichos líquidos.

5. La presente invención resulta particularmente adecuada para el análisis de los tri-glicéridos en el suero sanguíneo. Los tri-glicéridos son lípidos serosos que se conjugan con proteínas plásmáticas para formar lipoproteínas. Los tri-glicéridos se distinguen de otras lipoproteínas porque contienen fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol. El análisis de los tri-glicéridos en el suero es de gran importancia para el diagnóstico médico. Por ejemplo, se cree que los niveles altos de tri-glicéridos en el suero están relacionados con la formación de lesiones arteroscleróticas en el cuerpo.
10. El método clásico de medición de los tri-glicéridos necesita la descomposición de las lipoproteínas de tri-glicérido y la obtención de glicerol. La medición de la cantidad de glicerol producida proporciona una medida de los tri-glicéridos en el suero. También pueden utilizarse reacciones de copulación, con un indicador, para proporcionar una indicación de la cantidad de glicerol en una muestra.
15. Los métodos clásicos de análisis de los tri-glicéridos en el suero han necesitado de la hidrólisis química para la saponificación. Según dichos métodos, la fracción lipídica del suero se extrae mediante disolventes orgánicos y se eliminan los fosfolípidos, ya que durante la saponificación también proporcionan glicerol libre. Dicha extracción tenía que ser realizada con un absorbente de fosfolípidos o con un sistema de disolventes que extraía preferentemente los tri-glicéridos. Ambos métodos resultaban relativamente incómodos y no convenían a la automatización. Más recientemente, han sido desarrollados otros métodos de análisis de los tri-glicéridos. Según un mé-
- 20.
- 25.

- todo. los tri-glicéridos en el suero se hidrolizan en un sistema de enzimas copuladas en el cual, el glicerol resultante, es cuantificado por medición cinética de la reacción catalizada por deshidrogenasa de glicerol y dimoleótido de nicotinamida y adenina. En otra
5. reacción, en la cual los tri-glicéridos se hidrolizan a glicerol por saponificación alcohólica, se emplean reacciones enzimáticas para proporcionar la copulación de colores para el análisis del glicerol.
- Dichos métodos están registrados en resúmenes respectivamente numerados 013 y 014 de la página 57 del Clinical Chemistry,
10. Volumen 20, número 7, 1974. La Patente estadounidense 3.703.591 a favor de Busolo y col., de 21 de noviembre de 1972, se refiere a un análisis de tri-glicéridos en el cual los tri-glicéridos en el suero se hidrolizan tanto por una lipasa como por una proteasa y en el
15. cual se utilizan reacciones de copulación enzimática para proporcionar una indicación espectrofotométrica del glicerol producido en la región ultravioleta. La lipasa utilizada es *Rhizopus delemar* la cual, para fines de análisis, no ataca la lipoproteína de tri-glicérido sin el uso de una proteasa. La Patente estadounidense 3.759.793
20. a favor de Stork y col., de 18 de septiembre de 1973, también se refiere a la hidrólisis enzimática de tri-glicéridos en el suero en un análisis espectrofotométrico en ultravioleta.

- Mientras que los mencionados análisis producen con éxito la hidrólisis necesaria para la realización favorable de dicho análisis, los costes para realizar un análisis pueden resultar extremadamente elevados debido al precio de las necesarias enzimas particulares. Mientras que es deseable, en la preparación de reactivos y la realización de análisis, utilizar la enzima simple, una enzima simple utilizada en cantidades suficientes para efectuar la hidrólisis completa puede resultar muy costoso.
- 25.
- 30.

Las proteasas, por su índole misma, hidrolizan o destruyen las proteínas. Las enzimas que se usan aquí son proteínas. Así, las lipasas que incorporan proteasas, son menos estables. Por consiguiente, su uso resulta menos cómodo y más costoso. En la espectrofotometría hay más sustancias absorbentes que pueden interferir con los ensayos en la región ultravioleta que con los ensayos en la región visible. Los espectrofotómetros de medición en ultravioleta son más caros que los que pueden usarse en el espectro visible.

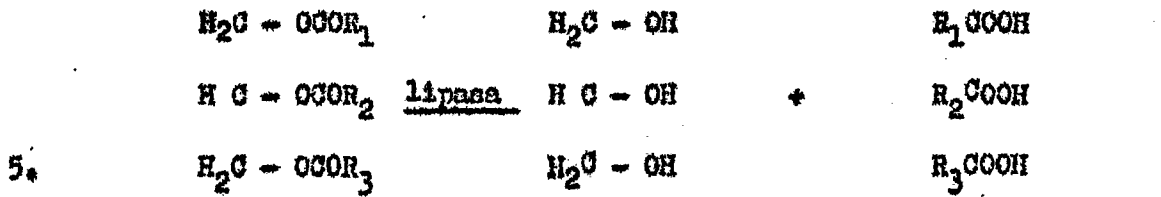
Por lo tanto, uno de los objetos de la presente invención es el de proporcionar, en un método de análisis de ésteres glicerinados de ácidos grasos en una solución acuosa en la cual se hidrolizan los ésteres, el perfeccionamiento que consiste en usar una lipasa que comprende lipasa *Rhizopus arrhizus*, y en el cual la cantidad de lipasa *Rhizopus arrhizus* necesaria para la hidrólisis puede ser reducida frente a la cantidad de lipasa *Rhizopus arrhizus* necesaria para realizar sola la hidrólisis.

Es un objeto específico de la presente invención proporcionar un método y una lipasa perfeccionados para hidrolizar las lipoproteínas de tri-glicérido en el suero sanguíneo en el cual, el perfeccionamiento, comprende el uso de una lipasa que consta de lipasa *Rhizopus arrhizus* y lipasa *Candida cylindracea*.

Resumiendo, según la presente invención, se proporciona una lipasa que consta de lipasa *Rhizopus arrhizus* y lipasa *Candida cylindracea* y se utiliza para la hidrólisis de ésteres glicerinados de ácidos grasos para hidrolizar los ésteres para producir glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol se mide por medios convencionales.

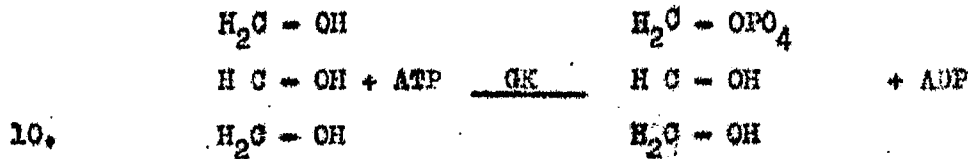
La presente invención conviene para numerosos análisis pero enfoca principalmente la hidrólisis de lipoproteínas de glicérido en el suero en un análisis de tri-glicéridos. Una de las numerosas

formas que puede tomar un análisis de tri-glicéridos se detalla a continuación:



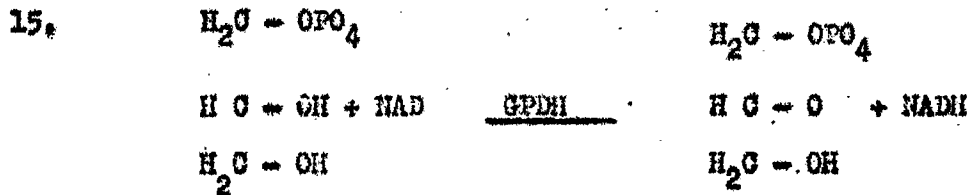
5.

El glicerol es fosforilado con trifosfato de adenosina (ATP) en presencia de glicerokinasa (GK) a 1-fosfato de glicerol:



10.

El 1-fosfato de glicerol es deshidrogenado con dinucleótido de nicotinamida y adenina a fosfato de dihidroxiacetona. Esta reacción es catalizada con deshidrogenasa de fosfato de glicerol (GPDH):



15.

El NADH reduce violeta de yodonitrotetrazolio (INT) a su formazan colorado con metosulfato de fenazina (PMS) como catalizador:

20.



El INT-formazan se mide espectrofotométricamente a 505 nm.

Se ha descubierto que resulta más conveniente separar los componentes requeridos para las susodichas reacciones en un reactivo enzimático de tri-glicérido, un reactivo tampón de tri-glicérido, un reactivo INT de tri-glicérido y un reactivo diluyente de tri-glicérido. Dichos reactivos pueden tener la constitución siguiente:

25.

Reactivo enzimático de tri-glicérido

Ingredientes reactivos (por decilitro): Lipasa *Rhizopus arrhizus*

30.

(en las cantidades expuestas en el párrafo 'Ejemplos')

25,000 unidades de deshidrogenasa de fosfato de glicerol
(músculo de conejo)

360 unidades de glicerokinasa (*C. mycoderma*).

Reactivo tampón de tri-glicérido

5. Ingresantes reactivos (p/v): 0,05% cloruro de magnesio
0,13% ATP
1,31% NAD

10. Unidades de lipasa *Candida cylindracea* (en las cantidades expuestas en el párrafo 'Ejemplos').

Ingresantes no reactivos: Tampones fosfáticos
Estabilizantes
Agente bacteriostático

Reactivo INT de tri-glicérido

15. Ingresantes reactivos (p/v): 0,03% INT
0,005% PMS

Reactivo diluyente de tri-glicérido

HCl 0,1N

Ejemplos

20. El análisis descrito más arriba se realizó con diferentes proporciones de las dos lipasas. En el primer grupo de ejemplos, la cantidad de lipasa *Rhizopus arrhizus* se fijó en 40 unidades por ensayo, un ensayo analizando 50 μ l por 0,05 ml de suero humano. "Ref. med." y "Ref. alto" se refieren respectivamente a sueros patrón de referencia normal y elevado teniendo niveles respectivos de tri-glicéridos de 140 mg/dl y de 564 mg/dl. Se obtuvieron las extinciones siguientes:

EJEMPLO	UNIDADES DE CANDIDA CYLINDRACEA POR ENSAYO	EXTINCION	
		REF. MED.	REF. ALTO
I	4,2	0,171	0,586
II	8,4	0,189	0,645
III	16,0	0,197	0,676
IV	42,0	0,201	0,673
V	63,0	0,201	0,677

La lectura de la curva frente a los susodichos datos permitió optimizar la concentración de *Candida cylindracea* a 22 unidades por ensayo, con un intervalo preferido de 16 a 40 unidades por ensayo. Este intervalo preferido se funda en el hecho de que el uso de más de 16 unidades permite realizar una hidrólisis substancialmente completa y el uso de más de 40 unidades por ensayo produce gastos innecesarios.

En los ejemplos siguientes, se siguió el procedimiento detallado más arriba y la concentración de *Candida cylindracea* se fijó a 22 unidades por ensayo. En los ejemplos siguientes, se usaron sueros patrón de referencia llamados respectivamente "ref. med." y "ref. alto" teniendo niveles normal y elevado de tri-glicéridos de 140 mg/dl y de 564 mg/dl respectivamente.

EJEMPLO	UNIDADES DE RHIZOPUS ARRHIZUS POR ENSAYO	EXTINCIÓN	
		REF. MED.	REF. ALTO
15. VI	10	0,111	0,625
VII	20	0,138	0,710
VIII	38,3	0,180	0,730
IX	48,3	0,191	0,744
X	67,6	0,194	0,743

La lectura de la curva permitió optimizar la concentración de *Rhizopus arrhizus* a 35 unidades por ensayo, con un intervalo preferido de 30 a 50 unidades por ensayo. Este intervalo se funda en una hidrólisis lo suficientemente completa al extremo inferior y sin incurrir en gastos innecesarios en el extremo superior.

Se debe prestar atención al término "unidad internacional", dado que dicha atención suele faltar en la literatura sobre patentes. En el contexto presente, una unidad internacional de actividad enzimática se define por los micromoles de producto formados por minuto y por miligramo de proteína en la enzima bajo las condiciones del ensayo. Así, las unidades internacionales pueden variar en diferentes análisis de la misma cantidad de lipasa por peso o por volumen. Por ejemplo, una cantidad de lipasa *Rhizopus*

arrhizus producida por la Boehringer Mannheim Corporation y que contienen, según la etiqueta, 66,000 unidades/ml, fué analizada en los laboratorios en los cuales se realizaron los mencionados ensayos y se determinaron 58,000 unidades/ml. Factores de conversión, teniendo cuenta las variaciones de las condiciones del ensayo, p.ej. presencia de otros enzimas o pH diferente, pueden engendrarse fácilmente.

Es de notar que la cantidad de lipasa *Rhizopus arrhizus* requerida en la presente lipasa queda muy reducida frente a la cantidad requerida en una lipasa que consta únicamente de *Rhizopus arrhizus*. No se comprende el motivo de tal fenómeno y la presente invención no puede quedar sujeta a la teoría siguiente. Sin embargo, se cree que la lipasa *Rhizopus arrhizus* ataca las posiciones alfa y alfa-primero en la lipoproteína de tri-glicérido, y la lipasa *Candida cylindracea* ataca la posición beta de dicha lipoproteína.

El término tri-glicérido se usa aquí en el sentido genérico que tiene en la química clínica. Los mono-glicéridos y los di-glicéridos también pueden hidrolizarse. Sin embargo, los tri-glicéridos constituyen la forma principal de ésteres glicerinados de ácidos grasos en el suero. La presente invención es un perfeccionamiento de la hidrólisis de las lipoproteínas de los tri-glicéridos. No hay ninguna intención de limitar el alcance de la invención por el uso de componentes particulares de reacción de copulación de colores. El perfeccionamiento descrito permite hidrolizar las lipoproteínas de tri-glicérido, al mismo tiempo que reduce el coste de un análisis mediante la reducción de la cantidad de *Rhizopus arrhizus* requerida. La literatura citada, así como cualquier otra literatura, servirá de guía a los técnicos para la preparación de otras variantes de la presente invención de las cuales no se ha hecho aquí mención específica.

N O T A

REIVINDICACIONES

Se reivindica como objeto de la presente Patente de In-
vención:

5. 1^a.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, en el que el reactivo utilizado para la hidrólisis de un éster glicerinado de ácidos grasos durante un análisis del contenido en dicho éster en un líquido acuoso, y que comprende una lipasa, se caracteriza por el hecho de que dicha lipasa
10. consta de una mezcla de lipasa *Rhizopus arrhizus* y lipasa *Candida cylindracea*.
15. 2^a.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según la reivindicación 1, cuyo reactivo utilizado para el análisis de los tri-glicéridos en el suero, se caracteriza por el hecho de proporcionar de 30 a 50 unidades de li-
pasa *Rhizopus arrhizus* para el análisis de 0,05 ml de suero.
20. 3^a.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según las reivindicaciones 1 ó 2, cuyo reactivo utilizado, se caracteriza por el hecho de proporcionar de 16 a 40 unidades de lipasa *Candida cylindracea* por cada 0,05 ml de suero,
25. 4^a.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por el hecho de utilizar una combinación de reactivos para formar un reactivo para la hidrólisis de un éster glicerinado de ácidos grasos durante un análisis del contenido en dicho éster en un líquido acuoso, que consta de un reactivo enzimático constituido por lipasa *Rhizopus arrhizus*, catalizadores de reacción, estabi-
lizante, y un reactivo tampón que comprenda lipasa *Candida cylindra-*
30. cea,

5. 54.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según la reivindicación 4, que se caracteriza por el hecho de que la combinación de reactivos para analizar una solución acuosa que comprende suero, proporciona 16 a 40 unidades de lipasa *Candida cylindracea* por cada 0,05 ml de dicho suero.

10. 64.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según la reivindicación 4 ó 5, que se caracteriza por el hecho de que la combinación de reactivos proporciona de 30 a 50 unidades de lipasa *Rhizopus arrhizus* por cada 0,05 ml de dicho suero.

15. 74.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según las reivindicaciones anteriores, cuyo método empleado para el análisis de un líquido acuoso que contiene un éster glicerinado de ácidos grasos, comprendiendo la hidrólisis de dicho éster para producir glicerol y ácidos grasos libres con lipasa y el análisis de la cantidad de glicerol producida, se caracteriza por el hecho de que la hidrólisis de dicho éster se efectúa con una lipasa que consta de lipasa *Rhizopus arrhizus* y lipasa *Candida cylindracea*.

20. 84.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según la reivindicación 7, que se caracteriza por el hecho de que el método utilizado para analizar dicho líquido acuoso comprendiendo suero, proporciona de 16 a 40 unidades de lipasa *Candida cylindracea* por cada 0,05 ml de dicha solución acuosa.

25. 94.-Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según las reivindicaciones 7 u 8, que se caracteriza por el hecho de que el método utilizado para analizar una solución acuosa comprendiendo suero proporciona de 30 a 50 unidades de lipasa *Rhizopus arrhizus* por cada 0,05 ml de dicho suero.

30.

10ª.--Procedimiento para el análisis de los tri-glicéridos en los líquidos acuosos, según las reivindicaciones 8 ó 9, que se caracteriza por el hecho de que en el método utilizado el aludido líquido acuoso y dicha lipasa se incuban durante diez minutos a 37º C.

11ª.--PROCEDIMIENTO PARA EL ANALISIS DE LOS TRI-GLICERIDOS EN LOS LIQUIDOS ACUOSOS.

Sean cuales fueren las circunstancias que concurren con la esencialidad propia de la misma.

Consta la presente Memoria descriptiva de once páginas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Barcelona, 5 agosto 1976

P. A.

J. COMAS
P. P.

