

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 148**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2005 E 05794300 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1794596**

54 Título: **Patrones de lípidos estables novedosos**

30 Prioridad:

**01.09.2004 US 606224 P**

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

**28.02.2014**

73 Titular/es:

**MAINE STANDARDS COMPANY LLC (100.0%)  
765 ROOSEVELT TRAIL  
WINDHAM, ME 04062, US**

72 Inventor/es:

**HAPPE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 445 148 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

Patrones de lípidos estables novedosos.

**Antecedentes de la invención**

5 La determinación de los niveles de lípidos en un líquido corporal, particularmente la determinación de los niveles de colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), triglicéridos, apolipoproteína, fosfolípidos, esfingolípidos y ésteres de colesterol, denominados colectivamente "lípidos", ha llegado a tener rápidamente un amplio uso con el reciente desarrollo de procedimientos de determinación enzimáticos, inmunológicos, electroforéticos y de ultracentrifugación. Como resultado, ha estado aumentando la utilidad de estos lípidos en el campo del diagnóstico clínico. Por tanto, se requiere una disolución patrón apropiada para la determinación de los niveles de lípidos.

10 La mayor parte de análisis de colesterol comprenden mezclar un reactivo de trabajo cromogénico con la muestra que va a analizarse y, tras el desarrollo de color, observar la intensidad de color en un espectrofotómetro. El reactivo de trabajo contiene generalmente colesterol esterasa para convertir ésteres de colesterol en colesterol libre, y colesterol oxidasa para oxidar el colesterol libre produciendo colesteno, liberando simultáneamente peróxido de hidrógeno. La cantidad de colesterol presente se determina entonces midiendo la cantidad de peróxido de hidrógeno liberado usando el sistema peroxidasa/fenol/4-aminoantipirina, también presente en el reactivo de trabajo. Este análisis también se ejecuta con disoluciones de calibrador, que se preparan añadiendo el reactivo de trabajo a disoluciones patrón que contienen concentraciones conocidas de colesterol, de modo que puede obtenerse información cuantitativa significativa.

15 La mayor parte de análisis de colesterol HDL se realizan mediante ensayos homogéneos sin la necesidad de pretratamiento de etapas de centrifugación. El método depende de un detergente único que solubiliza sólo las partículas de lipoproteína HDL y libera colesterol HDL para reaccionar con el ensayo enzimático descrito anteriormente para producir un producto coloreado. El mismo detergente también inhibe la reacción de las enzimas de colesterol con LDL, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de tipo quilomicrones mediante la adsorción en sus superficies. Además, un polianión contenido en el reactivo potencia la selectividad para colesterol HDL complejando las proteínas LDL, VLDL y quilomicrones (véase el manual de información química de los sistemas Synchron CX de Beckman n.º 249595, mayo de 2000).

20 Los análisis de colesterol HDL también se miden mediante un método directo usando enzimas modificadas con polietilenglicol (PEG) y sulfato de dextrano. Cuando se modifican las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa mediante PEG, demuestran actividades catalíticas selectivas hacia fracciones de lipoproteínas, aumentando la reactividad en el orden: LDL < VLDL < quilomicrones < HDL. En presencia de iones magnesio, la  $\alpha$ -ciclodextrina sulfatada reduce la reactividad del colesterol, especialmente en quilomicrones y VLDL, sin la necesidad de precipitación de agregados de lipoproteínas. (Véase Roche Diagnostics Corporation, GmbH, 2002, n.º 05453101, Mannheim, Alemania). Esto permite la determinación selectiva de colesterol HDL en suero.

25 Hasta la fecha, los ensayos de colesterol LDL se han realizado aprovechando la solubilización micelar seleccionada de colesterol LDL mediante un detergente no iónico y la interacción de un compuesto de azúcar con lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). Cuando un detergente está incluido en el método enzimático para la determinación de colesterol, las reactividades relativas de colesterol en las fracciones de lipoproteínas aumentan en este orden: HDL < quilomicrones < VLDL < LDL. En presencia de cationes magnesio, un compuesto de azúcar reduce notablemente la reacción enzimática para la medición de colesterol en VLDL y quilomicrones. La combinación de un compuesto de azúcar con detergente permite la determinación selectiva de colesterol LDL en suero. (Véase Roche Diagnostics Corporation, GmbH, 2002, Publicación técnica n.º 054565801, Mannheim, Alemania). El colesterol LDL también se determina usando procedimientos descritos en boletines técnicos disponibles de, entre otros, Genzyme Corporation, Beckman Coulter, y similares.

30 La mayor parte de ensayos de triglicéridos comprenden mezclar un reactivo de trabajo cromogénico con la muestra que va a analizarse y, tras el desarrollo de color, observar la intensidad de color en un espectrofotómetro. El reactivo de trabajo contiene generalmente lipasa para convertir triglicéridos en glicerol y ácidos grasos, seguido por la reacción de glicerol y ATP catalizada por glicerol cinasa para producir glicerol-3-fosfato y ADP. El glicerol-3-fosfato se cataliza entonces con glicerofosfato oxidasa para formar dihidroxiacetona fosfato más peróxido de hidrógeno. La cantidad de triglicéridos presente se determina entonces midiendo la cantidad de color procedente de la reacción de peroxidasa que convierte sustancias cromogénicas tales como 4-aminofenazona y 4-clorofenol o 4-aminoantipirina y ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico para formar el producto final para la medición fotométrica. Este análisis también se ejecuta con disoluciones de calibrador, que se preparan añadiendo el reactivo de trabajo a disoluciones patrón que contienen concentraciones conocidas de triglicéridos, de modo que puede obtenerse información cuantitativa significativa.

35 La apolipoproteína A-1 (APO-A1) se mide usando técnicas de ensayo inmunoturbidimétricas en las que se añade muestra a un tampón Tris seguido por la adición de un anticuerpo anti-lipoproteína A-1. Los anticuerpos anti-lipoproteína A-1 reaccionan con el antígeno en la muestra para formar complejos antígeno/anticuerpo que, tras la

aglutinación, se miden de manera turbidimétrica. (Véase Roche Diagnostics Corporation, GmbH, 2002, Publicación técnica n.º 03032612, Mannheim, Alemania).

La apolipoproteína B (APO-B) se mide a menudo usando técnicas de ensayo inmunturbidimétricas en las que se añade muestra a un tampón Tris seguido por la adición de un anticuerpo anti-lipoproteína B. Los anticuerpos anti-lipoproteína B reaccionan con el antígeno en la muestra para formar complejos antígeno/anticuerpo que, tras la aglutinación, se miden de manera turbidimétrica. (Véase Roche Diagnostics Corporation, GmbH, 2002, Publicación técnica n.º 03032639, Mannheim, Alemania).

Estos procedimientos, ya sean enzimáticos, inmunológicos o turbidimétricos, todos requieren que el reactivo de trabajo, los calibradores, los materiales de control de calidad (QC, *quality control*) y las muestras sean de una matriz acuosa, tal como, pero sin limitarse a, suero, plasma, y similares. La necesidad de esta matriz específica presenta un problema con respecto a la preparación de disoluciones de calibrador, puesto que el colesterol, y la mayor parte de otros componentes denominados comúnmente "lípidos", son sustancialmente insolubles en agua. Por ejemplo, una disolución patrón de colesterol preparada en alcohol, que cuando se combina con los reactivos de trabajo acuosos, puede producir precipitación de colesterol. Esto proporciona una disolución de calibrador inaceptable. Tal precipitación puede conducir a un desarrollo de color incierto o incompatible en los materiales de calibrador, QC o verificación de calibración y/o linealidad y generalmente hace que la muestra seleccionada no sirva para correlacionar de manera fiable la intensidad de color con la concentración de colesterol. En un segundo ejemplo, la medición de triglicéridos con un método de referencia usa un patrón de triglicéridos compuesto por trioleína y/o tripalmitina en una matriz de alcohol.

Debido a su hidrofobicidad, los lípidos se disuelven generalmente en un disolvente orgánico. Estas disoluciones pueden usarse entonces en el método de referencia de Abell-Kendall para la determinación de colesterol. En esta técnica, el colesterol solubilizado en disolvente es compatible con la metodología de ensayo. Sin embargo, los lípidos en estas disoluciones patrón difieren en su estado existente y propiedad de fluido de los que se encuentran en suero. De ese modo, la reactividad entre la disolución patrón y el líquido corporal (por ejemplo, suero) difieren, dando como resultado errores en los valores determinados.

Por tanto, el colesterol de lipoproteínas purificado o de suero derivado de animal o ser humano se ha usado como la disolución patrón. Los triglicéridos pueden calibrarse de manera alternativa usando materiales tales como un glicerol soluble en agua artificial, extractos de yema de huevo de animal insolubles en agua, triglicéridos endógenos o patrones de trioleína/tripalmitina basados en disolvente (alcohol) insolubles en agua. Para la calibración de triglicéridos, el uso de glicerol no se prefieren en casos en los que pueda estar presente glicerol libre en la muestra, que necesitan por tanto una "preparación de blanco de glicerol" antes de la conversión por lipasa de los triglicéridos en glicerol en el esquema de reacción. El Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) tiene materiales de referencia patrón (SRM, *Standard Reference Materials*) disponibles para colesterol total, glicéridos totales, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL. Estos SRM (SRM 1951a y 1951b) consisten en valores de concentración de referencia que son específicos de lote. Las matrices para estos SRM consisten en "lípidos en suero humano congelado", enviados en hielo seco y son estables durante sólo una (1) semana a -20°C y a -80°C durante periodos de tiempo más largos. Estos medios presentan todos altos costes, condiciones de envío difíciles y requisitos de un congelador para el almacenamiento a -80°C tras la recepción, pueden contener impurezas desconocidas que pueden influir en los valores determinados, y presentan dificultades técnicas relacionadas con la posible presencia de agentes infecciosos. Adicionalmente, los procedimientos para purificar lipoproteínas son técnicamente complejos y costosos de realizar para análisis de rutina de amplios números de muestras.

Por consiguiente, los lípidos y/o las lipoproteínas y otros constituyentes de interés, se han solubilizado en agua que contiene un tensioactivo y usado como la disolución patrón/de referencia. Sin embargo, se requiere una gran cantidad de tensioactivo para la solubilización de lípidos en agua. Esto, a su vez, aumenta la viscosidad de la disolución haciendo que su manejo sea a veces difícil. Además, las muestras que comprenden lípidos solubilizados, y/o lipoproteínas son inestables y demuestran una corta vida útil en almacenamiento. Para combatir este problema, se han liofilizado las disoluciones de lípidos solubilizados. Sin embargo, tras la reconstitución de estas muestras, existe una pérdida subsiguiente de actividad de los constituyentes.

A pesar de las dificultades en la preparación de patrones conocidos para su uso en diversos ensayos, para convertir una señal de ensayo detectable en un resultado cuantitativo (por ejemplo, concentración del constituyente), en primer lugar debe calibrarse el ensayo. La calibración se realiza ejecutando el ensayo en primer lugar con una serie de muestras de concentraciones predeterminadas siguiendo instrucciones del fabricante del método de ensayo usado. Estas muestras se denominan "calibradores". Los resultados obtenidos mediante la lectura de las señales de los calibradores se usan para generar, usando diversos modelos de ajuste de curvas, una curva de calibración que abarque todo el intervalo de ensayo. La curva de calibración puede usarse entonces para determinar la concentración de una muestra desconocida de QC, verificación de calibración/linealidad, o muestra desconocida a partir de la señal que produce. Puesto que el calibrador responde a menudo de manera diferente que el suero del paciente u otra muestra de prueba, cambios en el calibrador con el tiempo pueden hacer que sea ineficaz o produzca resultados erróneos o inexactos. En la técnica, existe la necesidad de curvas de calibración y calibradores acuosos más estables, así como de materiales de control de calidad y verificación de calibración/linealidad para evaluar la exactitud continuada de un ensayo. La presente invención satisface estas necesidades.

**Breve resumen de la invención**

- 5 Un aspecto de la invención se refiere a una composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína (a) (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína, y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA), en la que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, oscilando el pH de dicha composición entre 6,5 y 9,0.
- 10 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir la composición de referencia anterior, comprendiendo dicho método mezclar un líquido que comprende agua, con un valor conocido de un analito sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína, para producir una mezcla y añadir además una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico a dicha mezcla, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro.
- 15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento en el que dicho instrumento está adaptado para determinar una cantidad de un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína en una disolución de prueba,
- 20 comprendiendo dicho método someter dicho instrumento a calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad con la composición de referencia anterior.
- 25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un uso de una composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína (a) (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA), en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, oscilando el pH de dicha composición entre 6,5 y 9,0, para al menos uno de calibración, control de calidad, verificación de calibración y evaluación de linealidad.
- 30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de patrón de calibración o control estable que comprende una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en la que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, comprendiendo además dicha composición un contenido predeterminado de analito sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína.
- 35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir una composición de patrón de calibración o control estable, comprendiendo dicho método mezclar una disolución acuosa con una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, y que comprende además añadir una cantidad predeterminada de un analito esencialmente puro, en el que dicho analito es al menos un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína.
- 40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un kit para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína en una disolución de prueba, comprendiendo dicho kit una composición que comprende una cantidad conocida de dicho analito y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, comprendiendo además dicho kit un aplicador y un material con instrucciones para el uso de dicho kit.
- 45 La invención incluye una composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro de valor conocido y una cantidad de estabilización de un antioxidante, tal como se definió anteriormente y en las reivindicaciones.
- 50 En un aspecto, la composición de referencia es útil para al menos un uso seleccionado del grupo que consiste en calibración, control de calidad, verificación de calibración y evaluación de linealidad, y además en la que la composición es útil en un intervalo de pH de desde 6,5 hasta 9,0.
- 55 En otro aspecto, el uso comprende un método manual, semiautomatizado o totalmente automatizado que comprende un instrumento para la medición del constituyente.

- Aún en otro aspecto, el antioxidante es ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA).
- En un aspecto adicional, la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro.
- En otro aspecto, el constituyente es un componente sustancialmente puro de al menos un constituyente seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína a (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína.
- 5 Aún en otro aspecto, el subcomponente es al menos un subcomponente seleccionado del grupo que consiste en AII, AIV, B-48, B-100, CI, CII, CIII, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, F, G, H y J.
- En otro aspecto, el valor de CHOL oscila entre 0 y 5000 mg/dl.
- 10 Aún en otro aspecto, el valor de triglicéridos oscila entre 0 y 4000 mg/dl.
- En un aspecto adicional, el valor de LDL oscila entre 0 y 5000 mg/dl.
- Aún en un aspecto adicional, el valor de HDL oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
- En otro aspecto, el valor de APO-A oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
- En un aspecto adicional, el valor de APO-B oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
- 15 En un aspecto adicional, el valor de Lp(a) oscila entre 0 y 1200 mg/dl.
- Aún en un aspecto adicional, el valor del subcomponente oscila entre 0 y 500 mg/dl.
- En otro aspecto, la composición comprende además un tampón que comprende ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) de manera que el pH de la composición oscila entre 6,5 y 8,0.
- 20 Aún en un aspecto adicional, la composición comprende además una cantidad de azida de sodio de menos del 0,09% (peso/volumen).
- En otro aspecto, la composición comprende además ProClin™ en una cantidad que oscila entre 10 partes por millón (ppm) y 100 ppm.
- Aún en otro aspecto, la composición comprende además Oxyrase™ en una cantidad que oscila entre 0,05 U/ml y 0,5 U/ml.
- 25 La invención incluye una composición de patrón de calibración o control estable que comprende una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, comprendiendo además la composición un contenido predeterminado de analito sustancialmente puro.
- La invención también incluye un método para producir una composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable, tal como se expuso anteriormente y en las reivindicaciones.
- 30 El método comprende mezclar un líquido que comprende agua con un valor conocido de un constituyente sustancialmente puro para producir una mezcla y añadir además una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico a la mezcla.
- La invención incluye un método para producir una composición de patrón de calibración o control estable. El método comprende mezclar una disolución acuosa con una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, y comprende además añadir una cantidad predeterminada de un analito esencialmente puro.
- 35 En un aspecto, la disolución acuosa se selecciona del grupo que consiste en agua, plasma, suero, una disolución que comprende albúmina sérica bovina, una disolución que comprende albúmina sérica humana y una disolución que comprende un tampón de Good.
- En otro aspecto, el método comprende además añadir a la mezcla una cantidad eficaz de un antimicrobiano.
- 40 Aún en otro aspecto, el analito es al menos un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína a (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína.
- 45 La invención incluye un método para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento en el que el instrumento está adaptado para determinar una cantidad de un constituyente en una disolución de prueba, comprendiendo el método someter el instrumento a calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad con una composición de patrón de referencia de

lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro de valor conocido y una cantidad de estabilización de un antioxidante, oscilando el pH de la composición entre 6,5 y 8,0.

5 La invención también incluye un método para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un analito en una disolución de prueba, tal como se expuso anteriormente y en las reivindicaciones.

10 La invención incluye un kit para calibración, control de calidad, verificación de calibración, o calibración de linealidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un constituyente en una disolución de prueba. El kit comprende una composición que comprende una cantidad conocida del constituyente y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico. El kit comprende además un aplicador y un material con instrucciones para el uso del kit.

En un aspecto, la composición comprende 4,0 g/l de TDPA, 0,9 g/l de azida de sodio, 40 ppm de ProClin™, y comprende además tampón HEPES a pH 7,4, en la que el pH de la composición oscila entre pH 7,2 y 7,6.

En otro aspecto, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

15 a) una composición que comprende 10 mg/dl de colesterol total, 5 mg/dl de HDL, 0 mg/dl de triglicéridos, 5 mg/dl de LDL, 15,6 mg/dl de APO-A y 3,3 mg/dl de APO-B;

b) una composición que comprende 200 mg/dl de colesterol total, 37,5 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 162,5 mg/dl de LDL, 117,2 mg/dl de APO-A y 106,9 mg/dl de APO-B;

c) una composición que comprende 400 mg/dl de colesterol total, 115 mg/dl de HDL, 500 mg/dl de triglicéridos, 285 mg/dl de LDL, 359,4 mg/dl de APO-A y 187,5 mg/dl de APO-B;

20 d) una composición que comprende 600 mg/dl de colesterol total, 177,5 mg/dl de HDL, 750 mg/dl de triglicéridos, 422,5 mg/dl de LDL, 554,7 mg/dl de APO-A y 287,0 mg/dl de APO-B; y

e) una composición que comprende 800 mg/dl de colesterol total, 200 mg/dl de HDL, 1000 mg/dl de triglicéridos, 600 mg/dl de LDL, 625 mg/dl de APO-A y 394,7 mg/dl de APO-B.

Aún en otro aspecto, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

25 a) una composición que comprende 0 mg/dl de colesterol total, 0 mg/dl de HDL, 0 mg/dl de triglicéridos, 0 mg/dl de LDL, 0 mg/dl de APO-A y 0 mg/dl de APO-B; y

b) una composición que comprende 200 mg/dl de colesterol total, 60 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 140 mg/dl de LDL, 188 mg/dl de APO-A y 92 mg/dl de APO-B.

En un aspecto adicional, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

30 a) una composición que comprende 100 mg/dl de colesterol total, 20 mg/dl de HDL, 90 mg/dl de triglicéridos, 80 mg/dl de LDL, 63 mg/dl de APO-A y 53 mg/dl de APO-B;

b) una composición que comprende 250 mg/dl de colesterol total, 50 mg/dl de HDL, 150 mg/dl de triglicéridos, 200 mg/dl de LDL, 156 mg/dl de APO-A y 132 mg/dl de APO-B; y

35 c) una composición que comprende 500 mg/dl de colesterol total, 100 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 400 mg/dl de LDL, 313 mg/dl de APO-A y 263 mg/dl de APO-B.

Aún en un aspecto adicional, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

a) una composición que comprende 100 mg/dl de colesterol total, 25 mg/dl de HDL, 50 mg/dl de triglicéridos, 75 mg/dl de LDL, 78 mg/dl de APO-A y 49 mg/dl de APO-B;

40 b) una composición que comprende 275 mg/dl de colesterol total, 48,75 mg/dl de HDL, 287,5 mg/dl de triglicéridos, 226,25 mg/dl de LDL, 152,25 mg/dl de APO-A y 150 mg/dl de APO-B;

c) una composición que comprende 450 mg/dl de colesterol total, 72,5 mg/dl de HDL, 525 mg/dl de triglicéridos, 377,5 mg/dl de LDL, 226,5 mg/dl de APO-A y 251 mg/dl de APO-B;

d) una composición que comprende 625 mg/dl de colesterol total, 96,25 mg/dl de HDL, 762,5 mg/dl de triglicéridos, 528,75 mg/dl de LDL, 300,75 mg/dl de APO-A y 352 mg/dl de APO-B; y

45 e) una composición que comprende 800 mg/dl de colesterol total, 120 mg/dl de HDL, 1000 mg/dl de triglicéridos, 680 mg/dl de LDL, 375 mg/dl de APO-A y 453 mg/dl de APO-B.

En otro aspecto, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

a) una composición que comprende 0 mg/dl de colesterol total, 0 mg/dl de HDL, 0 mg/dl de triglicéridos, 0 mg/dl de LDL, 0 mg/dl de APO-A y 0 mg/dl de APO-B; y

b) una composición que comprende más de 240 mg/dl de colesterol total, menos de 35 mg/dl de HDL, 100 mg/dl de triglicéridos, más de 190 mg/dl de LDL, más de 120 mg/dl de APO-A y menos de 120 mg/dl de APO-B.

5 Aún en otro aspecto, el kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

a) una composición que comprende 0 mg/dl de colesterol total, 0 mg/dl de HDL, 100 mg/dl de triglicéridos, 0 mg/dl de LDL, 0 mg/dl de APO-A y 0 mg/dl de APO-B; y

b) una composición que comprende más de 240 mg/dl de colesterol total, menos de 45 mg/dl de HDL, 100 mg/dl de triglicéridos, más de 190 mg/dl de LDL, más de 120 mg/dl de APO-A y menos de 120 mg/dl de APO-B.

## 10 Descripción detallada de la invención

15 La invención se refiere al descubrimiento de que el ácido 3,3'-tiodipropiónico estabiliza patrones de lípidos acuosos, de suero, plasma y otra matriz, útiles para materiales de calibración, control de calidad y verificación de calibración / linealidad para numerosos ensayos. Por tanto, la invención se refiere a composiciones y métodos novedosos para producir patrones de referencia estables que pueden usarse para, entre otros, calibración, control de calidad, entre otras cosas, en una amplia variedad de ensayos de lípidos reconocidos en la técnica. También, la invención proporciona materiales novedosos de calibración, control de calidad, verificación de calibración y linealidad que comprenden los patrones de lípidos estables novedosos de la invención.

### Definiciones

20 Tal como se usa en el presente documento, cada de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos “un/o” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

25 Por el término “aplicador”, tal como se usa el término en el presente documento, quiere decirse cualquier dispositivo incluyendo, pero sin limitarse a, una jeringa hipodérmica, una pipeta, una sonda de muestra automática y similares, para administrar los compuestos y composiciones de la invención.

30 “Material con instrucciones”, tal como se usa ese término en el presente documento, incluye una publicación, una grabación, un diagrama, folleto de producto o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de la composición y/o el compuesto de la invención en el kit para afectar, aliviar o tratar las diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o de manera alternativa, el material con instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o los trastornos en una célula o un tejido o un mamífero, incluyendo tal como se da a conocer en otra parte del presente documento.

35 El material con instrucciones del kit puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el compuesto y/o la composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el compuesto y/o la composición. De manera alternativa, el material con instrucciones puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el receptor use el material con instrucciones y el compuesto conjuntamente. De manera alternativa, el material con instrucciones puede obtenerse en Internet en un formato adecuado para la transmisión como archivo electrónico al usuario.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” significa una composición química con la que puede combinarse el principio activo y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término éster o sal “fisiológicamente aceptable” significa una forma de éster o sal del principio activo que es compatible con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, que no es perjudicial para el sujeto al que va a administrarse la composición.

45 “Cantidad de estabilización”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de una sustancia o un compuesto que, cuando se añade a una composición de referencia acuosa o de suero o plasma, estabiliza de manera detectable una composición de referencia en comparación con la estabilidad de una composición idéntica a la que no se añade la sustancia o el compuesto. Es decir, el valor conocido de un constituyente presente en la composición cambia menos en función del tiempo o las condiciones de almacenamiento en la composición que comprende la sustancia o el compuesto que el valor del constituyente idéntico presente en una composición por lo demás idéntica a la que no se añade la sustancia o el compuesto.

50 Un “constituyente”, tal como se usa en el presente documento generalmente de manera intercambiable con “analito”, se refiere a cualquier sustancia cuya presencia o cantidad es de interés y que va a evaluarse mediante cualquier

método conocido en la técnica. Preferiblemente, un constituyente se refiere a cualquier sustancia relacionada con, pero sin limitarse a, colesterol total (CHOL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicéridos, apolipoproteína A (APO-A, que abarca A1 y A2), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína a (Lp(a)), sus subcomponentes respectivos y similares. Estos, y muchos otros constituyentes de interés, se analizan en, entre otros tratados reconocidos en la técnica, Rafai y Warnick (1994, en: Laboratory Measurements of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins, Rafai y Warnick, eds., AACC Press, Washington, DC) y Rafai, Warnick y Dominiczak (2000, en: Handbook of Lipoprotein Testing, Rafai, Warnick y Dominiczak, eds. AACC Press, Washington, DC).

Por el término “composición de referencia”, tal como se usa en el presente documento, quiere decirse cualquier composición usada para calibración y/o control de calidad y/o verificación de calibración y/o evaluación de linealidad relacionada con análisis del nivel y/o la presencia de un constituyente de interés en una muestra. Tal composición de referencia puede usarse con cualquier método o dispositivo para evaluar la presencia y/o el nivel del constituyente en una muestra.

El término “sustancialmente puro”, tal como se usa en el presente documento con respecto a, entre otros, un constituyente dado, significa que el constituyente está sustancialmente libre de otros compuestos, biológicos o de otro tipo, tales como aquéllos en material celular, material viral, plasma, sangre, líquido corporal o medio de cultivo, con los que puede haberse asociado el constituyente (por ejemplo, en el transcurso de la producción mediante técnicas bioquímicas u otras o antes de la purificación de una fuente biológica natural). Por ejemplo, el constituyente sustancialmente puro es puro en al menos el 75% (por ejemplo, al menos el 80, 85, 95 o el 99%) en peso seco. La pureza puede medirse mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, análisis mediante HPLC, y similares, tal como se entiende bien en la técnica.

#### Descripción

La invención se refiere al descubrimiento de patrones de matriz (por ejemplo, suero, plasma, otra base proteica; y similares) acuosos de lípidos estables novedosos útiles para materiales de calibración, control de calidad, verificación de calibración y linealidad relacionados con diversos ensayos de lípidos conocidos en la técnica usando una amplia variedad de instrumentos conocidos en la técnica, o que se desarrollen en el futuro. Más específicamente, la invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que la adición de ácido 3,3'-tiodipropiónico a un patrón de referencia de lípidos acuoso estabiliza el patrón de manera que su vida útil se amplía enormemente. Estos resultados proporcionan además métodos novedosos para producir el patrón de lípidos acuoso estable, así como ensayos novedosos que usan el patrón, y kits relacionados con los mismos.

#### I. Composición que comprende un patrón de referencia novedoso

La invención abarca una composición de referencia de matriz (por ejemplo, suero, plasma, etc.) acuosa estable. La composición comprende un constituyente sustancialmente puro de valor conocido y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA; número de registro CAS 111-17-1), que se conoce por otros nombres diversos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido 3,3'-tiobispropanoico, ácido  $\beta,\beta'$ -tiodipropiónico, ácido dietilsulfuro-2,2'-dicarboxílico, ácido tiodihidracrílico, Tyox A, ácido 4-tiaheptanodioico, sulfuro de bis(2-carboxietilo). Esto se debe a que los datos descritos en otra parte del presente documento demuestran que una disolución acuosa que comprende TDPA y al menos un constituyente que está sometido a ensayo (por ejemplo, colesterol total, LDL, HDL, APO-A, APO-B, triglicéridos, Lp(a) y similares) puede estabilizarse dando como resultado una mayor vida útil que la disolución idéntica a la que no se añade TDPA.

Por tanto, la invención abarca una composición de patrón de calibración o control estable que comprende una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, y un contenido predeterminado de un analito, es decir, un componente específico, en una muestra de prueba, incluyendo, pero sin limitarse a, una muestra biológica (es decir, una muestra obtenida de un organismo, ya sea vivo o muerto).

Un experto en la técnica, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, apreciará fácilmente que un constituyente comprende una amplia variedad de sustancias y compuestos de interés que están sometidos a ensayo en una muestra de prueba. Es decir, la composición de referencia puede usarse para calibrar, para verificar la calibración de, y/o como muestra de control de calidad para su uso con, un instrumento que está usándose para evaluar la cantidad del constituyente de interés. Más particularmente, tal como se demuestra ampliamente en otra parte del presente documento, una composición de referencia que comprende TDPA en una cantidad suficiente para estabilizar la composición y una cantidad conocida del constituyente, puede usarse como patrón para calibrar y/o ejecutar un control de calidad en el ensayo de manera que el valor del constituyente en la muestra de prueba pueda determinarse exactamente con relación al valor conocido del mismo constituyente en la composición de referencia.

El experto en la técnica también apreciará, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, que cuando se analiza una muestra de prueba para detectar la presencia y/o cantidad de un constituyente de interés, los resultados del ensayo de la muestra de prueba son comparados generalmente con un patrón para evaluar la presencia y/o cantidad del constituyente en la muestra de prueba. Por tanto, existe la necesidad de una

composición de referencia exacta para la calibración del ensayo, para obtener una curva de calibración fiable para cualquier instrumento usado en el ensayo, y/o como control de calidad y/o verificación de calibración y linealidad para monitorizar la exactitud del ensayo. Es decir, puede usarse un patrón de referencia para calibrar un instrumento, para verificar periódicamente que el instrumento todavía está funcionando dentro de las tolerancias deseadas, o ambos. Se expone un análisis de patrones de referencia de calibración y control de calidad, por ejemplo, en la solicitud de patente europea n.º 95201336.5 (publicada como el documento EP 0 684 477A2) de Bahar *et al.*, la patente estadounidense n.º 4.239.649 concedida a Gindler *et al.*, la patente estadounidense n.º 4.363.633 concedida a Christiansen, la patente estadounidense n.º 4.643.976 concedida a Hoskins, la patente estadounidense n.º 4.701.417 concedida a Portenhouse *et al.*, la patente estadounidense n.º 4.716.119 concedida a Rehner *et al.*, la patente estadounidense n.º 4.868.139 concedida a Deeg *et al.* y la patente estadounidense n.º 6.372.503 concedida a Samsoodar.

Tal como se demuestra en el presente documento, la cantidad de estabilización de TDPA es aquella cantidad que media un aumento detectable en la estabilidad, por ejemplo, la vida útil, entre otras cosas, de una composición de referencia en comparación con la estabilidad de una composición de referencia idéntica a la que no se añade TDPA. Preferiblemente, la cantidad oscila entre aproximadamente 1,1 y 18 gramos por litro. Más preferiblemente, la cantidad oscila entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 12,0, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 3,3 y 10,5, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 3,65 y 9,75, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 4,0 y 9,0 y lo más preferiblemente, la cantidad es de 4,0 gramos por litro (g/l).

Tal como se describe en detalle en otra parte del presente documento, TDPA puede funcionar como antioxidante. En particular, TDPA puede funcionar como antioxidante para el fin de estabilizar una composición de la presente invención. Otros antioxidantes útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, monotioglicerol, ácido fumárico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), N-acetil-L-cisteína, Oxyrase™, ácido ascórbico, sal de dodecasodio del ácido fítico, y similares. El experto en la técnica, cuando disponga de la presente descripción, entenderá cómo identificar y caracterizar un antioxidante útil en la presente invención, basándose en las enseñanzas expuestas en el presente documento.

También se entenderá que pueden usarse combinaciones de dos o más antioxidantes en la presente invención. A modo de ejemplo no limitativo, pueden usarse Oxyrase™ y TDPA. Se entenderá además, basándose en la presente descripción, que pueden usarse diversas concentraciones de antioxidantes en la presente invención. Adicionalmente, se entenderá que diversas concentraciones de antioxidantes, y combinaciones de los mismos, están abarcadas por la presente invención, con respecto a diversos patrones, incluyendo, pero sin limitarse a, HDL, LDL, APO-A, APO-B, CHOL, Lp(a) y TRIG, y que puede variarse cualquier condición de ensayo o reacción, basándose en el uso y/o la aplicación pretendidos de una composición o un método de la presente invención.

También se entenderá, basándose en la invención expuesta en el presente documento, que determinados antioxidantes pueden no ser compatibles con otros antioxidantes, con otras combinaciones de antioxidantes, o con determinadas disoluciones patrón (por ejemplo, determinados lípidos, determinados triglicéridos, entre otros). A modo de ejemplo no limitativo, y tal como se expone en el ejemplo experimental 10, determinados antioxidantes, tales como ácido ascórbico, pueden interferir con uno o más ensayos posteriores llevados a cabo con la disolución patrón que contiene el ácido ascórbico, tal como un ensayo de indicador de peroxidasa. En otro ejemplo no limitativo, el monotioglicerol, cuando se usa como antioxidante en una disolución de TRIG, puede contribuir a una reacción de triglicérido hidrolasa reacción aumentando falsamente el glicerol en una reacción indicadora.

La invención abarca un amplio intervalo de valores de un componente constituyente sustancialmente puro de la composición de referencia. Es decir, tal como entenderá el experto en la técnica una vez que disponga de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, la invención abarca una composición de referencia que comprende una variedad de valores para cualquier constituyente de interés, y cualquier combinación de los mismos. Aunque no está limitada a ningún constituyente o valor de un constituyente particular, la invención abarca numerosos constituyentes tales como, pero sin limitarse a, colesterol total (CHOL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicéridos, apolipoproteína A (APO-A, que abarca A1 y A2), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína a (Lp(a)) sus subcomponentes respectivos y similares. Estos, y muchos otros constituyentes de interés, se analizan en, entre otros tratados reconocidos en la técnica, Rafai y Warnick (1994, en: Laboratory Measurements of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins, Rafai y Warnick, eds., AACC Press, Washington, DC) y Rafai, Warnick y Dominiczak (2000, en: Handbook of Lipoprotein Testing, Rafai, Warnick y Dominiczak, eds. AACC Press, Washington, DC).

El experto en la técnica apreciará, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, que la composición puede abarcar otras sustancias diversas que se sabe en la técnica que están presentes en muestras de lípidos y/o lipoproteínas, tales como, pero sin limitarse a, IDL, VLDL, quilomicrones y APO-E. Por tanto, la invención abarca una composición que comprende diversos componentes y subcomponentes que se sabe en la técnica que están presentes en una muestra de lípidos y/o lipoproteínas, o una muestra que va a someterse a prueba para ello.

Además, la invención no se limita a ningún valor particular para ninguno de los constituyentes presentes en la composición de referencia, ni a ninguna combinación de constituyentes particular. Por ejemplo, una composición de

referencia de la invención puede comprender CHOL, LDL, HDL y triglicéridos sustancialmente puros, o CHOL, LDL, HDL, triglicéridos, APO-A y APO-B. Aunque algunas de estas combinaciones de constituyentes, y valores conocidos para los mismos, se ejemplifican en otra parte del presente documento, la invención no se limita en modo alguno a estos, o a ningún otro, combinación de constituyentes o valor conocido para la misma. Más bien, los diversos constituyentes pueden usarse por separado, o en combinación con otros constituyentes útiles que van a someterse a ensayo en una muestra de prueba, también están abarcados en la invención, y la invención no se limita en modo alguno a ningún constituyente, combinación de constituyentes, o valor conocido particular de los mismos, y las composiciones de referencia a modo de ejemplo dadas a conocer en otra parte del presente documento son para fines ilustrativos y no limitan la invención en modo alguno.

En una realización, el constituyente sustancialmente puro es colesterol total y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0,0 y 5000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0,0 y 4000, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0,0 y 3000, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 2000 mg/dl. Más preferiblemente, el valor conocido para CHOL en una composición de referencia de la invención oscila entre aproximadamente 0 y 1000 mg/dl, y lo más preferiblemente, el valor de los intervalos de CHOL es el intervalo de medición analítico reivindicado para el ensayo, y/o el intervalo notificable establecido clínicamente del constituyente que está sometiéndose a ensayo tal como se conoce en la técnica.

En otra realización, el constituyente sustancialmente puro es LDL y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 5000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 4000, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 3000, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 2000, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 1000 mg/dl. Más preferiblemente, el valor conocido para LDL en una composición de referencia de la invención oscila entre aproximadamente 0 y 500 mg/dl, y lo más preferiblemente, el valor de los intervalos de LDL es el intervalo de medición analítico reivindicado para el ensayo, y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para LDL tal como se conoce en la técnica.

En otra realización, el constituyente sustancialmente puro es triglicéridos y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 4000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 3000, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 2000, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 1000, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 500 mg/dl. Lo más preferiblemente, los valores conocidos para los intervalos de triglicéridos en una composición de referencia de la invención son el intervalo de medición analítico reivindicado para el ensayo de interés y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para triglicéridos tal como se conoce en la técnica.

Además, en otra realización, el constituyente sustancialmente puro es HDL y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 1000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 900, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 800, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 700, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 600 mg/dl. Más preferiblemente, el valor conocido para HDL en una composición de referencia oscila entre aproximadamente 0 y 500 mg/dl. Lo más preferiblemente, los valores conocidos para los intervalos de HDL en una composición de referencia de la invención son el intervalo de medición analítico reivindicado para el ensayo de interés y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para HDL tal como se conoce en la técnica.

El constituyente conocido comprende APO-A sustancialmente puro y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 1000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 900, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 800, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 700, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 600 mg/dl. Más preferiblemente, el valor conocido para APO-A en una composición de referencia de la invención oscila entre aproximadamente 0 y 500 mg/dl, y lo más preferiblemente, el valor de los intervalos de APO-A son el intervalo de medición analítico reivindicado y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para APO-A tal como se conoce en la técnica.

Además, el constituyente sustancialmente puro es APO-B y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 1000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 900, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 800, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 700, e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 600 mg/dl. Lo más preferiblemente, el valor conocido para APO-B en una composición de referencia de la invención oscila entre aproximadamente 0 y 500 mg/dl, y lo más preferiblemente, los intervalos de APO-B son el intervalo de medición analítico reivindicado y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para APO-B tal como se conoce en la técnica.

Además, el constituyente sustancialmente puro es Lp(a) y el valor conocido preferido oscila entre aproximadamente 0 y 1000, más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 900, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 800, y aún más preferiblemente, entre aproximadamente 0 y 700. Lo más preferiblemente, el valor conocido para Lp(a) en una composición de referencia de la invención oscila entre aproximadamente 0 y 640 mg/dl, y lo más preferiblemente, el valor de los intervalos de Lp(a) son el intervalo de medición analítico reivindicado y/o el intervalo notificable establecido clínicamente para Lp(a) tal como se conoce en la técnica.

Los subcomponentes respectivos de APO-A y APO-B también pueden estar incluidos. Estos subcomponentes

sustancialmente puros pueden ser, pero no se limitan a, All, AIV, B-48, B-100, Cl, CII, CIII, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, F, G, H y J, entre otros. El intervalo más preferido de estos subcomponentes es de aproximadamente 0 a 500 mg/dl.

5 Sin embargo, un experto en la técnica se dará cuenta, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, de que puede usarse una serie de referencias de composición, es decir, al menos dos, para generar una curva de calibración de manera que cada muestra en una serie comprende un intervalo de valores conocidos unos con relación a otros. Por tanto, la invención abarca una serie de composiciones de referencia de la invención, que comprenden al menos dos niveles de valor conocido diferentes que se conocen de manera que el valor de delta entre las dos composiciones puede usarse para calibrar los valores teóricos para otras composiciones de referencia de diferentes valores. Por tanto, la invención abarca un kit que comprende al menos dos composiciones de referencia de valores conocidos diferentes de un constituyente de interés, en el que se conoce delta entre los dos valores como patrón de calibración o verificación de calibración. Además, la invención consiste en diversas series de tales composiciones de referencia que comprenden una amplia variedad de constituyentes, y combinaciones de los mismos, el único requisito es que el valor del constituyente se conozca para cada composición de referencia y tales conjuntos de verificación de calibración y control de calidad de múltiples niveles se ejemplifican en el presente documento aunque la invención no se limite a estos, ni a ningún otro conjunto particular de composiciones de referencia.

20 De manera similar, aunque una composición de referencia que comprende un sistema de tampón HEPES cuyo pH oscila entre aproximadamente 6,5 y 8,0, la presente invención no se limita en modo alguno a éste, ni ningún otro, sistema tamponante, o en efecto, a ningún tampón. Por tanto, el experto en la técnica apreciará, una vez que disponga de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que puede usarse una amplia variedad de tampones en la presente invención, tales como, pero sin limitarse a tampones de Good, tales como BES, MOPS, TES, Tris, tampón fosfato de Sorenson, diversos sistemas de tampones fisiológicos, y similares. (Véase Tietz, 2000, en: Fundamentals of Clinical Chemistry, 5ª ed., Burtis & Ashwood, eds., Elsevier Science Press, NY). De manera similar, se describen sistemas tampón en el sitio web de Sigma-Aldrich, tal como se enumera en el área de interés que abarca productos bioquímicos y reactivos, más específicamente, los expuestos en la parte del centro de referencia de tampones/explorador de tampones del sitio web.

30 El tampón HEPES comprende un tampón de valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, incluso más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, aún más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, el valor de pH conocido para tampón HEPES en una composición de referencia de la invención oscila entre 7,3 y 7,5.

El tampón BES comprende un valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, aún más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, incluso más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, el valor de pH conocido para BES en una composición de referencia de la invención oscila entre pH 7,3 y 7,5.

35 El tampón MOPS comprende un valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, aún más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, incluso más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, un valor de pH conocido para MOPS en una composición de referencia de la invención oscila entre 7,3 y 7,5.

El tampón TES comprende un valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, aún más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, incluso más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, un valor de pH conocido para TES en una composición de referencia de la invención oscila entre 7,3 y 7,5.

40 El tampón TRIS comprende un valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, aún más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, incluso más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, el valor de pH conocido para TRIS en una composición de referencia de la invención oscila entre 7,3 y 7,5.

45 El tampón fosfato de Sorenson comprende un valor de pH conocido que oscila entre 6,5 y 9,0, aún más preferiblemente, entre 6,8 y 8,3, incluso más preferiblemente, entre 7,0 y 8,0. Lo más preferiblemente, el valor de pH conocido para el fosfato de Sorenson en una composición de referencia de la invención oscila entre 7,3 y 7,5.

50 Tal como entenderá un experto en la técnica, la composición de referencia de la invención puede comprender, pero no es necesario, un antimicrobiano. Un ejemplo de un antimicrobiano de este tipo incluye, pero no se limita a, azida de sodio y ProClin™. La invención no se limita a estos, o ningún otro antimicrobiano. Más bien, pueden usarse numerosos antimicrobianos, tanto conocidos como que se desarrollen en el futuro, y la cantidad eficaz que va a usarse de los mismos, en la presente invención. Muchos antimicrobianos, incluyendo, pero sin limitarse a, los expuestos en la patente estadounidense n.º 5.891.734, se conocen bien en la técnica y por tanto no se citan en el presente documento.

55 Un antimicrobiano de la invención es azida de sodio. Preferiblemente, la cantidad de azida de sodio es de menos de aproximadamente el 0,09% basándose en peso por volumen (p/v). La cantidad preferida de azida de sodio es de aproximadamente 0,9 g/l.

De manera alternativa, la cantidad de ProClin™ oscila entre aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 100 ppm, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 20 ppm y aproximadamente 80 ppm, aún más

preferiblemente, la cantidad oscila entre aproximadamente 30 ppm y aproximadamente 60 ppm, y lo más preferiblemente, la cantidad de ProClin™ es de aproximadamente 40 ppm. (Véanse, por ejemplo, el boletín de Supelco n.º 900).

5 La composición de referencia también puede incluir un antioxidante secundario tal como, pero sin limitarse a, Oxyrase™. Tal como entenderá el experto en la técnica, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, Oxyrase™ no afecta a la estabilidad de una composición de referencia a un nivel de TDPA de más de aproximadamente 9,0 gramos por litro. Sin desear limitarse por ninguna teoría particular, puede ser que Oxyrase™ requiera un donador de protones (por ejemplo, ácido láctico, y similares) para funcionar como eliminador de oxígeno. Además, una composición que comprende Oxyrase™ puede comprender, pero no es necesario, NaCl. TDPA  
10 también puede actuar como inhibidor competitivo de Oxyrase™, lo que a altas concentraciones, puede reducir su eficacia.

Preferiblemente, la cantidad de Oxyrase™ oscila entre aproximadamente 0,05 U/ml y aproximadamente 0,5 U/ml, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 0,1 U/ml y aproximadamente 0,4 U/ml, aún más preferiblemente, la cantidad oscila entre aproximadamente 0,1 U/ml y aproximadamente 0,3 U/ml. Lo más preferiblemente, la cantidad de Oxyrase™ es de 0,1 U/ml. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.476.224; la patente estadounidense n.º 4.996.073; y la patente estadounidense n.º 5.240.851).

Un experto habitual en la técnica, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, entenderá que la composición de referencia de la invención se proporciona preferiblemente como una disolución acuosa que no está diluida, pero puede diluirse, para ajustar el valor conocido de al menos un constituyente conocido. Por tanto,  
20 la composición no requiere reconstitución para producir una disolución acuosa, disminuyendo de ese modo los errores de manejo y manipulaciones costosas proporcionando por tanto una mejora significativa con respecto a composiciones de referencia que se proporcionan en forma liofilizada y/o seca o en polvo, lo que requiere que se añada líquido antes de que la composición pueda usarse. Por tanto, la invención proporciona una composición de referencia de matriz de suero/plasma acuosa estable o que no requiere reconstitución y/o la adición de ningún líquido antes de que pueda usarse pero que permanece estable durante un periodo de tiempo significativo.

## II. Métodos para producir una composición de referencia

La invención incluye un método para producir una composición de referencia que comprende un constituyente sustancialmente puro de valor conocido y una cantidad de estabilización de TDPA. El método comprende una matriz de tampón de base proteica o acuosa a la que se añaden antioxidantes y antimicrobianos. Tras la disolución,  
30 entonces se lleva la disolución hasta la cantidad suficiente (c.s.), y luego se filtra a través de, por ejemplo, un filtro de 0,2 µm. Se añade un componente (es decir, un analito), tal como, pero sin limitarse a CHOL, HDL, LDL, y similares, en su cantidad seleccionada como objetivo deseada. La disolución se vuelve a filtrar entonces. La composición de referencia se somete a ensayo en el analizador químico aplicable para el que se prepara, para garantizar que se logra la concentración objetivo. Si es necesario, se realizan ajustes y la muestra vuelve a someterse a ensayo.

35 La invención abarca un método para producir una composición de patrón de calibración o control estable. El método comprende mezclar una disolución de matriz de suero/plasma o acuosa con una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico y una cantidad predeterminada de un analito sustancialmente puro.

Un experto en la técnica apreciará, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, que puede usarse una amplia variedad de disoluciones acuosas para producir el patrón de la invención. Tales disoluciones acuosas incluyen, pero no se limitan a agua, plasma humano, suero humano, una disolución que comprende albúmina sérica bovina y una disolución que comprende albúmina sérica humana, entre muchos otros. Tales disoluciones se conocen bien en la técnica y no se analizan adicionalmente en el presente documento.

## III. Métodos para usar una composición de referencia

45 La invención incluye además un método para calibración o control de calidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un constituyente en una disolución de prueba. Es decir, tal como se demuestra mediante los datos dados a conocer en el presente documento, la presente invención demuestra un método para usar la composición de referencia de la invención para calibrar y/o verificar y/o proporcionar control de calidad para un instrumento usado para evaluar la cantidad de un constituyente de interés en una muestra.

El experto en la técnica apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la invención no se limita a ningún instrumento particular, sino más bien que la invención abarca una amplia variedad de instrumentos tal como se conocen en la técnica o que se desarrollen en el futuro. Es decir, tales instrumentos para someter a ensayo la presencia y/o el nivel de un constituyente de interés conocido en una muestra incluyen, pero no se limitan a, analizadores químicos multicanal tales como, por ejemplo, el modelo CX y/o el modelo LX de Beckman Coulter (Fullerton, California), los sistemas Hitachi e Integra de Roche Diagnostics (Manheim, Alemania), los sistemas Centaur, IMS y Advia de Bayer Healthcare (Tarrytown, Nueva York), los sistemas Aeroset y Chem 8000 de Abbott Diagnostics (Abbott Park, Illinois), los sistemas Vitros y DT de Ortho's J&J Clinical Diagnostics (Raritan, Nueva Jersey), la serie Dimension de Dade Behring (Newark, Delaware) y Dade Behring Limited (R.U.), Polichem de Polimedco (Cortlandt Manor, Nueva York), ATAC de Elan Diagnostics (Mornstown, Nueva Jersey y Dublín, Irlanda),

y muchos otros. Por tanto, el experto en la técnica entenderá, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, que la invención no se limita en modo alguno a ningún instrumento particular, ni conocido ni que se desarrolle usado para examinar una muestra con respecto a una composición de referencia de la invención. Tales instrumentos, incluyendo analizadores de suero, dispositivos portátiles, dispositivos para una sola prueba, y similares, se conocen bien en la técnica y no se analizan adicionalmente en el presente documento.

Tal como entenderá un experto en la técnica, cuando disponga de la descripción expuesta en el presente documento, una composición de referencia de la invención puede usarse para calibrar un instrumento y/o un ensayo. Es decir, las composiciones de referencia y los métodos de la presente invención son útiles para pruebas de calibración, verificación de calibración, control de calidad y linealidad, entre otros usos.

El experto en la técnica sabrá, basándose en la presente descripción, que una composición de la invención puede modificarse basándose en las necesidades de una aplicación particular. A modo de ejemplo no limitativo, puede excluirse un antioxidante particular de una composición de referencia si el antioxidante tiene el potencial de interferir con el ensayo o con uno o más de otros componentes de la composición de referencia. De manera similar, el experto en la técnica sabrá, basándose en la presente descripción, que un método de la invención puede modificarse basándose en las necesidades de una aplicación particular. A modo de ejemplo no limitativo, una composición de referencia puede usarse en un ensayo de calibración de dos puntos. En otra realización de la invención, una composición de referencia puede usarse en un ensayo de calibración de cinco puntos. En un aspecto, una composición de referencia puede incluir tantos o tan pocos puntos de referencia tal como se determine que es necesario para establecer una curva de referencia válida y exacta.

Existen numerosos esquemas de calibración usados en el laboratorio clínico. Métodos más antiguos, a menudo realizados manualmente, emplean varios niveles de concentración en la totalidad del intervalo de ensayo y normalmente representan gráficamente la recuperación frente a la concentración o usan regresión lineal para calcular valores de analitos de pacientes. Estos métodos todavía pueden usarse. Sin embargo, con el uso creciente y la disponibilidad de tecnología informática, los métodos que demuestran un comportamiento lineal usan ahora a menudo uno o dos puntos de calibrador para lograr los mismos resultados. Bastante a menudo, el método de uno o dos puntos de referencia incorpora un blanco de agua destilada o solución salina como punto de referencia adicional, estando dictada esta última función por el fabricante del instrumento o reactivo. Para químicas no lineales, el enfoque tradicional proporciona cinco o seis niveles de calibrador, habitualmente fijados de un modo no lineal dictado por el modelo matemático usado en el cálculo final del resultado del paciente. Una tendencia más reciente para químicas no lineales es usar un calibrador que contiene la mayor concentración de analito medida en el ensayo. Usando este método, el sistema analítico se dirige entonces a realizar las diluciones necesarias de este valor de alta concentración para generar los puntos de referencia de calibración predeterminados sobre la marcha cuando el sistema calibra el analito.

Por tanto, en un aspecto de la presente invención, un método presenta el uso de múltiples puntos de calibrador para generar una curva de referencia. En una realización, un método presenta el uso de más de un punto. En otra realización, uno de los múltiples puntos es un punto cero. Aún en otra realización, el punto cero no está incluido como uno de los múltiples puntos, pero puede incluirse por separado en una curva de referencia. En otro aspecto de la presente invención, un método presenta el uso de un solo punto de calibración, tal como se describe en detalle en otra parte del presente documento. En una realización, un método presenta el uso de un punto cero además de un solo punto de calibración.

A modo de una serie de ejemplos no limitativos, un método de la invención puede usar una curva de referencia basándose en una sola concentración para la calibración, un método de la invención puede usar una curva de referencia basándose en una sola concentración más un punto de concentración cero para la calibración, un método de la invención puede usar una curva de referencia basándose en al menos dos concentraciones para la calibración, y un método de la invención puede usar una curva de referencia basándose en al menos dos concentraciones más un punto de concentración cero para la calibración. En un aspecto de la invención, se conoce la concentración de una muestra de calibración. En otro aspecto de la invención, no se conoce la concentración de una muestra de calibración. Aún en otro aspecto de la invención, se conoce la concentración de al menos una muestra de calibración en una mezcla que contiene al menos dos muestras de calibración.

#### IV. Kits

La invención incluye diversos kits que comprenden un patrón de lípidos de matriz de suero/plasma o acuosa estable novedoso de la invención, un aplicador, y materiales con instrucciones que describen uso del kit para realizar los métodos de la invención. Aunque se describen a continuación kits a modo de ejemplo, el contenido de otros kits útiles resultará evidente para el experto en la técnica a la luz de la presente descripción. Cada uno de estos kits está incluido dentro de la invención.

En un aspecto, la invención incluye un kit para calibración o control de calidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un constituyente en una disolución de prueba. El kit comprende una composición de referencia que comprende una cantidad conocida de un constituyente y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico. El kit se compone además de un aplicador y material con instrucciones para el uso del kit.

5 El kit se usa de conformidad con los métodos dados a conocer en la invención. Brevemente, el kit puede usarse para calibrar o verificar la calibración y/o para fines de control de calidad. Esto se debe, tal como se da a conocer con más detalle en otra parte del presente documento, a que los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que la adición de TDPA estabiliza de manera detectable una composición de referencia de lípidos acuosa y proporciona una composición de referencia estable que puede usarse para, entre otras cosas, calibración y control de calidad en un ensayo y para evaluar la presencia y/o concentración de un constituyente de interés.

10 El kit comprende además de un aplicador útil para administrar el patrón estable para su uso en el ensayo relevante. El aplicador particular incluido en el kit dependerá de, por ejemplo, el método usado para someter a ensayo un lípido, así como el equipo analizador particular usado, y tales aplicadores se conocen bien en la técnica y pueden incluir, entre otras cosas, una pipeta, una jeringa, un frasco cuentagotas, y similares. Además, el kit comprende un material con instrucciones para el uso del kit. Estas instrucciones simplemente realizan la descripción proporcionada en el presente documento.

15 El kit incluye un kit que comprende las diversas combinaciones de constituyentes en diversas cantidades conocidas tal como se da a conocer en otra parte del presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más antioxidantes, y uno o más tampones biológicos. La composición se proporciona en una cantidad apropiada tal como se expone en otra parte del presente documento.

20 Además, el kit incluye un kit que comprende a combinación de al menos dos composiciones de referencia que comprenden valores conocidos diferentes de un constituyente conocido de manera que se conoce la delta, o diferencia, entre las dos composiciones. Tales kits pueden usarse para normalizar o calibrar un instrumento, para fines de control de calidad, y para producir una curva de calibración para un instrumento tal como se analiza en otra parte del presente documento. Por tanto, la invención abarca un kit que comprende al menos dos composiciones de referencia. Aunque la invención no se limita a ningún conjunto particular, determinadas combinaciones de composiciones de referencia se ejemplifican en otra parte del presente documento.

25 Adicionalmente, la invención abarca un kit que comprende ácido 3,3'-tiodipropiónico, en el que el kit comprende al menos un constituyente, o analito, para el que se conoce el valor. Es decir, el kit comprende además un analito incluyendo, pero sin limitarse a, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, APO-A, APO-B, Lp(a) y similares, y cualquier combinación de los mismos, tal como apreciará un experto en la técnica basándose en la descripción proporcionada en el presente documento.

30 La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan para fines de ilustración únicamente, y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique de otro modo. Por tanto, la invención no debe interpretarse en modo alguno como que se limita a los siguientes ejemplos, sino más bien, debe interpretarse que abarca todas y cualquiera de las variaciones que resulten evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

**Ejemplos**

35 Ejemplo 1: Conjunto de calibradores de múltiples puntos

La tabla 1 demuestra una configuración que usa la presente invención en múltiples niveles para un esquema de calibración de múltiples puntos para métodos que requieren múltiples puntos de referencia para la calibración. Varios métodos comerciales utilizan calibración de múltiples puntos para los componentes implicados. Estos puntos de referencia se diseñan para cubrir el intervalo de medición analítico completo.

40 Tabla 1 Conjunto de calibradores de múltiples puntos

Calibrador	Unidades	Punto de referencia 1	Punto de referencia 2	Punto de referencia 3	Punto de referencia 4	Punto de referencia 5
Colesterol total	mg/dL	10	200	400	600	800
HDL	mg/dL	5	37,5	115	177,5	200
Triglicéridos	mg/dL	0	250	500	750	1000
LDL	mg/dL	5	162,5	285	422,5	600
APO-A	mg/dL	15,6	117,2	359,4	554,7	625
APO-B	mg/dL	3,3	106,9	187,5	287,0	394,7

45 Se prepararon las diversas composiciones tal como sigue. Brevemente, se produce un litro de tampón de matriz para el conjunto de calibradores tal como sigue: 25 g (2,5% p/v) de albúmina sérica humana (HSA; Seracare n.º de catálogo HS430, 20 g (2,0% p/v) de gamma-globulina humana (HGG; Seracare n.º de catálogo HS475, o equivalente), 34,42 g de HEPES de sodio (aproximadamente 0,1 M) (Sigma n.º de catálogo H7006, o equivalente), 6,4284 g (aproximadamente 8 mM) de cloruro de sodio (Sigma n.º de catálogo S9888, o equivalente), 4,0 g (aproximadamente 50 mM) de TDPA (Aldrich n.º de catálogo T3020-1, o equivalente), 2,242 g (aproximadamente 10 mM) de lactato de sodio (Sigma n.º de catálogo L7022, o equivalente), 0,90 g (aproximadamente 0,01 M) de azida de sodio (Sigma n.º de catálogo S8032, o equivalente), y 1,33 ml de Proclin™ 300 (aproximadamente 40 ppm)

(Supelco n.º de catálogo 4-8127). Una vez disueltos, se ajustó el pH a 7,3-7,5, preferiblemente, a aproximadamente 7,4, usando HCl 1N o NaOH 3N. Se enrasó la disolución hasta la cantidad suficiente. Entonces se filtró la disolución a través de un filtro de 0,2 µm usando una cápsula Sartobran P (Sartorius n.º de pieza 5231307H5, o equivalente).

5 Se preparan los puntos de referencia individualmente o a partir de una dilución del punto de referencia de nivel 5. En este caso, existe una relación lineal entre los puntos de referencia de calibrador y sería representativo de un ensayo químico manual tradicional en el que las concentraciones del patrón aparecen en la totalidad del intervalo notificable del ensayo. Este ejemplo también puede diseñarse para una química no lineal, en cuyo caso, se usa un punto de referencia de nivel 5 para fijar el límite superior o contorno matemático y se añaden puntos de referencia adicionales en la totalidad del intervalo de ensayo a tales concentraciones que puede establecerse una forma de curva óptima y un modelo matemático subsiguiente para permitir el cálculo de resultados clínicos.

10 Se diluyen concentrados de lípidos sustancialmente puros (Lee n.º de cat. 361-10, 360-10, o equivalente) hasta el intervalo analítico del método y se someten a ensayo en el instrumento apropiado. Se asigna un valor a la disolución madre concentrada. Entonces se realiza una dilución apropiada de las disoluciones madre de HDL y LDL para obtener el valor de punto de referencia deseado. Por ejemplo, si la disolución madre concentrada de colesterol total está a 4000 mg/dl, entonces se realiza una 1:5 en el tampón de matriz para producir punto de referencia n.º 5. Esto se realiza para cada punto de referencia, si se preparan los puntos individualmente.

15 APO-A es un subcomponente de HDL, mientras que APO-B es un subcomponente de LDL. Los valores obtenidos para estos constituyentes dependen por tanto de los valores para HDL y LDL. Por ejemplo, un punto de referencia de nivel 5 generó un valor de HDL de 118,7 mg/dl. El valor de APO-A obtenido era de 369,34 mg/dl. Para la misma muestra, se produjo un valor de LDL de 510,2 mg/dl, mientras que su valor de APO-B correspondiente era de 335,3 mg/dl. De manera alternativa, pueden fijarse los objetivos de APO-A y APO-B con los valores de HDL y LDL resultantes que dependen de la concentración de apolipoproteína seleccionada como objetivo.

20 Se somete entonces a ensayo cada nivel. Se realizan ajustes para garantizar que se logra la concentración seleccionada como objetivo. Se vuelven a someter a ensayo los conjuntos y una vez que se logran las concentraciones correctas, se filtran a través de un filtro de 0,2 µm los diversos niveles. Estos calibradores pueden ejecutarse y normalizarse frente al método de referencia designado, tal como la preparación de preparación IFCC SP1-01 para APO-A-1, para establecer un valor de referencia tal como se describe, por ejemplo, en el folleto de producto de Roche APO-A-1 versión 2.0, febrero de 2002. Una vez establecidos, el usuario final puede usar los puntos de referencia para calibrar un analizador clínico. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

Ejemplo 2: Conjunto de calibradores de dos puntos

25 La tabla 2 demuestra una configuración que usa dos puntos para un esquema de calibración de dos puntos para métodos diseñados para calibrarse con puntos de referencia de dos niveles. A menudo, se usa material de blanco de solución salina u otro adecuado para un punto de referencia que contiene una cantidad “cero” del componente deseado.

Tabla 2 Conjunto de calibradores de dos puntos

Calibrador	Unidades	Punto de referencia “cero”	Punto de referencia
Colesterol total	mg/dl	0	200
HDL	mg/dl	0	60
Triglicéridos	mg/dl	0	250
LDL	mg/dl	0	140
APO-A	mg/dl	0	188
APO-B	mg/dl	0	92

35 Usando el tampón expuesto previamente con relación a la tabla 1, se diluyen concentrados de lípidos sustancialmente puros y se someten a ensayo en el instrumento apropiado. Entonces se asigna un valor a la disolución madre concentrada. Entonces se realiza una dilución apropiada de las disoluciones madre de lípidos para obtener el valor de punto de referencia deseado. Se añade la cantidad apropiada de concentrados de triglicéridos, HDL y LDL y se disuelve. Una vez más, APO-A y APO-B son subcomponentes de estos constituyentes. Se someten a ensayo las disoluciones y se realiza cualquier ajuste necesario para garantizar que se cumple el punto de referencia. Entonces vuelven a someterse a prueba las muestras y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm. El punto de referencia puede ejecutarse frente a un método de referencia para la asignación de valores, de manera similar a tal como se describe con respecto a las composiciones expuestas en la tabla 1. Una vez establecidos, el usuario final puede usar los dos puntos de referencia para calibrar sus analizadores clínicos. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

Ejemplo 3: Experimentos de calibración de dos puntos adicionales

Se preparó un calibrador simulado de HDL de dos puntos para imitar los calibradores de lípidos de Beckman en el

- 5 sistema CX7 de Beckman. Se prepararon los calibradores usando una formulación para un producto lipídico, en la que se añadieron analitos a tampón a las concentraciones de analito deseadas tal como se expone en detalle en otra parte del presente documento, incluyendo, por ejemplo, tal como se expone en el ejemplo 1. Se ajustaron las concentraciones de los analitos para cumplir con los 2 puntos de referencia requeridos. Se obtuvieron 40 muestras de pacientes para análisis de lípidos y se analizaron siguiendo un protocolo EP9 modificado. Se calibró el sistema CX7 usando los calibradores de lípidos de Beckman. Se ejecutaron las muestras de pacientes por duplicado en grupos de 5-6 muestras por ejecución. Hubo aproximadamente 2 horas entre las calibraciones. Se volvió a calibrar el instrumento usando calibradores simulados y se ejecutaron las mismas muestras de pacientes por duplicado. Se ejecutó un total de 40 muestras.
- 10 Un examen de los datos estadísticos revela si los calibradores eran equivalentes. Si la  $t$  estad.  $< t$  crítica de dos colas (95%) entonces los calibradores muestran equivalencia. En el caso de HDL en el sistema CX7 se demostró equivalencia.
- 15 En este estudio con calibradores simulados, se usó la calibración del fabricante del instrumento para establecer el valor del punto de referencia de calibrador simulado. Para un producto comercial típico, se determinaría el punto de referencia con un material de referencia de NIST, según las directrices de normas nacionales.
- 20 En un estudio adicional, se preparó un calibrador simulado de CHOL de un solo punto para imitar el calibrador CFAS (*Calibrator for Automated Systems*, calibrador para sistemas automatizados) de Roche en el sistema Integra 400. Se preparó el calibrador usando una formulación para un producto lipídico tal como se describe en otra parte del presente documento, y se ajustó para cumplir con el punto de referencia requerido. Se obtuvieron cuarenta muestras de pacientes para análisis de lípidos y se analizaron siguiendo un protocolo EP9 modificado. Se calibró el sistema I400 usando el calibrador CFAS de Roche. Se ejecutaron las muestras de pacientes por duplicado en grupos de 5-6 muestras por ejecución. Transcurrieron aproximadamente 2 horas entre las calibraciones. Se volvió a calibrar el instrumento usando el calibrador simulado y se ejecutaron las mismas muestras de pacientes por duplicado. Se ejecutó un total de 40 muestras.
- 25 Un examen de los datos estadísticos revela si los calibradores eran equivalentes. Se analizaron los resultados, en parte, usando una prueba de la  $t$  de Student para resultados con igual varianza. Si la  $t$  estad.  $< t$  crítica de dos colas (95%), entonces los calibradores muestran equivalencia. En el caso de CHOL en el sistema I400, se demostró equivalencia.
- 30 En este estudio con calibradores simulados, se usó la calibración del fabricante del instrumento para establecer el valor del punto de referencia usado en la calibración. Para un producto comercial típico, se determinaría el punto de referencia con un material de referencia de NIST, según las directrices de normas nacionales.

Tabla 3: Estadística para un calibrador simulado de HDL usando el sistema CX7 de Beckman.

Estadística descriptiva:	HDL - 2 Puntos de calibración	
	Prueba	Comparativa
Media	45,25	42,70125
Mediana	42,65	40,3
Moda	41,9	40,5
D.E.	11,154655	10,6735743
CV	24,6511714	24,9959294
Máx.	88,1	80,5
Mín.	30,6	27,4
Intervalo	57,5	53,1
X-2D.E.	22,9406899	21,3541014
X+2D.E.	67,5593101	64,0483986
n	80	80
Duplicados	40	40
T = 1,03621111 *C + 1,00249024		
r = 0,9915495		
r2 = 0,98317041		
Sy/x = 1,47442215		

X = Media

D.E. = Desviación estándar de la muestra

35 CV = Coeficiente de variación

Prueba = 1,0362111 \* Comparativa + 1,00249024

## ES 2 445 148 T3

r = coeficiente de correlación

r<sup>2</sup> = coeficiente de determinación

Sy/x = error estándar de la estimación

5 Tabla 4: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos y analito de HDL

N.º de muestra	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2		
1	41,9	41,9	41,5	40,5	41,9	41
2	63,8	62,8	62,3	62,7	63,3	62,5
3	36,8	37	37,4	35,9	36,9	36,65
4	62,5	62	62,5	62,1	62,25	62,3
5	32,5	31,1	27,4	27,5	31,8	27,45
6	87,6	88,1	80,5	79,2	87,85	79,85
7	48,3	46,2	39,9	39,3	47,25	39,6
8	42,5	43,1	40,8	39,9	42,8	40,35
9	41,1	40,7	38,5	39,7	40,9	39,1
10	37,9	37,1	36,2	36,2	37,5	36,2
11	42,8	41,9	41,3	40,5	42,35	40,9
12	31,1	31,2	29,5	29,5	31,15	29,5
13	42,9	42,8	41,2	40,1	42,85	40,65
14	33,2	33,4	31,4	31,1	33,3	31,25
15	41,5	41,6	38,9	39,4	41,55	39,15
16	31,2	30,6	28,8	29,1	30,9	28,95
17	44,2	43,3	41,9	42,3	43,75	42,1
18	44,8	43,8	41,8	41,1	44,3	41,45
19	33	32,7	30,6	30,1	32,85	30,35
20	42,2	41,7	39,6	39,5	41,95	39,55
21	40,7	40,6	37,9	38,3	40,65	38,1
22	58,4	57,2	54,5	55,1	57,8	54,8
23	34,2	33,3	31,5	31,4	33,75	31,45
24	58,8	59,1	56,5	57,8	58,95	57,15
25	41,7	42,2	39,4	39,2	41,95	39,3
26	53,6	51,4	48,7	49,7	52,5	49,2
27	41,3	40,9	38	37,7	41,1	37,85
28	53,9	53,7	50,4	50,2	53,8	50,3
29	42,6	42	40,2	39,6	42,3	39,9
30	44,8	45,2	42,9	40,9	45	41,9
31	43,3	42,7	40,4	41,1	43	40,75
32	51,8	51,6	49,2	49,8	51,7	49,5
33	34,1	34,3	32	31,6	34,2	31,8
34	59,8	58,6	55,4	55,3	59,2	55,35
35	44,6	44,9	42,1	42,1	44,75	42,1
36	49	49,5	46,1	46,6	49,25	46,35
37	59,3	60,2	56,9	57,2	59,75	57,05
38	48,6	47,9	46,5	45,3	48,25	45,9
39	37,3	37,9	34,8	35,4	37,6	35,1
40	37,5	36,7	35,3	35,4	37,1	35,35

## ES 2 445 148 T3

Tabla 5: Estadística para un calibrador simulado de CHOL usando el sistema Integra 400.

Estadística descriptiva:	CHOL	
	Prueba	Comparativa
Media	202,1525	194,7875
Mediana	199,4	192,15
Moda	197,3	180,3
D.E.	47,7276131	46,334473
CV	23,6097071	23,7871901
Máx.	321,9	310,1
Mín.	106,1	101,4
Intervalo	215,8	208,7
X-2D.E.	106,697274	102,118554
X+2D.E.	297,607726	287,456446
n	80	80
Duplicados	40	40
T = 1,02966092 *C + 1,5874244		
r = 0,99925842		
r2 = 0,99851739		
Sy/x = 1,87336112		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 6: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración CFAS y analito de CHOL

N.º de muestra	Prueba		Comparativa		Prueba Media	Comparativa Media
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2		
1	106,1	106,2	101,4	102,7	106,15	102,05
2	157,4	160,8	153,7	157,7	159,1	155,7
3	217,7	218,4	208,1	213,6	218,05	210,85
4	132	131,7	126,1	128,4	131,85	127,25
5	197,3	199,1	189,8	194,5	198,2	192,15
6	305,9	307,9	293,8	307	306,9	300,4
7	133	133,7	127,3	130,2	133,35	128,75
8	199,7	200,4	191,5	192,8	200,05	192,15
9	229	230,7	219,2	218	229,85	218,6
10	241,1	239,7	229,6	228,6	240,4	229,1
11	171,4	171,7	165,4	164,6	171,55	165
12	212,9	212,1	204	200,8	212,5	202,4
13	180,9	179,1	171,9	171,1	180	171,5
14	204,8	205	196,5	196,2	204,9	196,35
15	228,3	225,7	216,3	215,9	227	216,1
16	235,2	234,4	227,4	226,6	234,8	227
17	181,4	183	174,7	173,2	182,2	173,95
18	169	169,1	161,5	160,8	169,05	161,15
19	210,1	209,6	201,7	202	209,85	201,85
20	321,8	321,9	310,1	308,7	321,85	309,4
21	130,3	130	125,8	124,6	130,15	125,2
22	287,6	287,7	277,4	274,7	287,65	276,05
23	141,3	141,5	137,5	137,1	141,4	137,3
24	218,5	217,8	211,6	208,8	218,15	210,2
25	262,4	262,7	254,2	253,9	262,55	254,05
26	187,1	186,5	182,7	180,3	186,8	181,5
27	205,6	207,5	205,2	200,9	206,55	203,05
28	232,3	231,2	224,6	223,3	231,75	223,95
29	191,9	192	188,7	186,6	191,95	187,65
30	201,3	202,9	196,3	195,4	202,1	195,85
31	153,3	159,9	145,8	147,6	156,6	146,7
32	180,2	184,3	173,8	173,8	182,25	173,8
33	207,1	205,9	199,2	199,2	206,5	199,2
34	197,3	197,7	189,9	190,9	197,5	190,4
35	245,7	246,7	237,3	237,7	246,2	237,5

## ES 2 445 148 T3

36	174,5	174,3	168,8	169,1		174,4	168,95
37	153,4	153,4	148	146,2		153,4	147,1
38	287,8	289,1	281,8	279,1		288,45	280,45
39	197,5	196,6	190,2	190,1		197,05	190,15
40	186,7	187,5	181,2	180,3		187,1	180,75

### Ejemplo 4: Calibración de dos puntos de múltiples constituyentes

5 Se prepararon calibradores simulados de múltiples constituyentes para imitar el calibrador de Roche de lípidos CFAS para HDL, LDL, y TRIG en el sistema Hitachi 911 y para APO-A y APO-B en el sistema Integra 400. Se prepararon los calibradores usando la formulación para un producto lipídico tal como se describe en otra parte del presente documento, y se ajustaron los objetivos para cumplir con el punto de referencia requerido para cada analizador. Se obtuvieron cuarenta muestras de pacientes para análisis de lípidos y se analizaron siguiendo un protocolo EP9 modificado. Se calibraron ambos sistemas 911 e I400 usando el calibrador de lípidos CFAS de Roche. Se ejecutaron las muestras de pacientes por duplicado en grupos de 5-6 muestras por ejecución. Hubo aproximadamente 2 horas entre las calibraciones. Se volvió a calibrar el instrumento usando los calibradores simulados y se ejecutaron las mismas muestras de pacientes por duplicado. Se ejecutó un total de 40 muestras.

10 Un examen de los datos estadísticos revela si los calibradores eran equivalentes. Si la  $t$  estad.  $< t$  crítica de dos colas (95%) entonces los calibradores muestran equivalencia. En el caso de HDL, LDL, y TRIG en el sistema 911 se demostró equivalencia. En el caso de APO-A en el sistema I400 se demostró equivalencia. En el caso de APO-B en el sistema I400 no se mostró equivalencia. Esto sugeriría que si aumentaba el error al 99% de confianza, entonces puede lograrse equivalencia.

15 En este estudio con calibradores simulados, se usó la calibración del fabricante del instrumento para establecer el valor del punto de referencia de calibrador simulado. Para un producto comercial típico, se determinaría el punto de referencia con un material de referencia de NIST.

20 Tabla 7: Estadística para un calibrador simulado de HDL usando el sistema Hitachi 911.

Estadística descriptiva:	HDL	
	Prueba	Comparativa
Media	50,325	49,03
Mediana	46,41	44,645
Moda	52,58	43,4
D.E.	14,6395963	14,7279808
CV	29,0901069	30,0387126
Máx.	96,19	95,7
Mín.	26,51	27,17
Intervalo	69,68	68,53
X-2D.E.	21,0458074	19,5740384
X+2D.E.	79,6041926	78,4859616
n	80	80
Duplicados	40	40
T = 0,99012578 *C + 1,77913289		
r = 0,99613133		
r <sup>2</sup> = 0,99227763		
Sy/x = 1,31107401		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

## ES 2 445 148 T3

Tabla 8: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos CFAS y analito de HDL

	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Media	Media
1	44,46	45,82	42,49	43,57	45,14	43,03
2	68,9	68,67	69,09	67,28	68,785	68,185
3	38,76	38,8	38,28	38,71	38,78	38,495
4	66,67	66,52	64,84	65,47	66,595	65,155
5	95,17	96,19	95,19	95,7	95,68	95,445
6	86,38	84,87	84,76	84,25	85,625	84,505
7	43,67	43,89	43,4	44,26	43,78	43,83
8	45,15	45,64	44,73	44,67	45,395	44,7
9	42,96	43,4	42,76	43,4	43,18	43,08
10	39,92	39,09	38,69	38,57	39,505	38,63
11	45,09	45,29	43,32	44,22	45,19	43,77
12	33,82	34,1	34,22	32,9	33,96	33,56
13	47,14	46,35	45,52	45,84	46,745	45,68
14	36,02	35,03	34,31	34,17	35,525	34,24
15	44,49	44,81	41,79	41,92	44,65	41,855
16	34,06	34,19	31,05	31,53	34,125	31,29
17	48,5	49,43	45,5	46,16	48,965	45,83
18	46,88	47,91	44,33	44,62	47,395	44,475
19	35,08	34,6	32,38	32,26	34,84	32,32
20	47,12	47,32	44,97	44,74	47,22	44,855
21	44,82	44,85	42,59	42,8	44,835	42,695
22	61,25	62,1	57,23	58,43	61,675	57,83
23	38,25	37,5	35,52	35,67	37,875	35,595
24	63,68	64,57	60,35	60,64	64,125	60,495
25	45,71	46,26	42,82	42,66	45,985	42,74
26	52,58	51,57	51,49	52,09	52,075	51,79
27	66,19	67,08	62,94	64,43	66,635	63,685
28	52,58	54,68	51,79	52,89	53,63	52,34
29	34,56	34,84	35,17	34	34,7	34,585
30	46,47	45,63	44,45	43,69	46,05	44,07
31	47,85	46,78	45,99	46,09	47,315	46,04
32	56,99	56,28	55,08	54,56	56,635	54,82
33	40,75	40,01	39,05	40,17	40,38	39,61
34	61,74	62,57	60,9	61,82	62,155	61,36
35	52,08	53,34	51,83	53,32	52,71	52,575
36	36,93	37,18	37,19	36,69	37,055	36,94
37	27,23	26,51	27,17	27,49	26,87	27,33
38	66,45	64,93	68,25	66,2	65,69	67,225
39	48,46	47,3	49,19	48,75	47,88	48,97
40	77,46	77,83	77,8	77,35	77,645	77,575

Tabla 9: Estadística para un calibrador simulado de LDL usando el sistema Hitachi 911.

Estadística descriptiva:	LDL	
	Prueba	Comparativa
Media	116,703605	113,616395
Mediana	109,17	106,305
Moda	106,91	103,95
D.E.	40,2646729	39,1815211
CV	34,5016532	34,4857984
Máx.	227,22	221,08
Mín.	46,84	46,48
Intervalo	180,38	174,6
X-2D.E.	36,1742588	35,2533532
X+2D.E.	197,232951	191,979437
n	86	86
Duplicados	43	43
T = 1,02737512 *C + -0,0230527		
r = 0,99970788		
r2 = 0,99941585		
Sy/x = 0,9906674		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 10: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos CFAS y analito de LDL

	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Media	Media
1	204,2	205,78	200,82	200,62	204,99	200,72
2	111,48	110,9	108,96	107,64	111,19	108,3
3	76,05	76,16	75,12	75,2	76,105	75,16
4	137,68	135,16	133,68	132,1	136,42	132,89
5	109,29	104,61	105,3	105,06	106,95	105,18
6	116,07	115,26	113,43	114,05	115,665	113,74
7	128	129,48	125,38	125,44	128,74	125,41
8	109,05	107,87	106,08	106,53	108,46	106,305
9	125,67	124,77	122,55	123,9	125,22	123,225
10	98,71	96,72	96,99	95,84	97,715	96,415
11	107,14	107,48	103,04	103,95	107,31	103,495
12	63,42	63,39	61,93	61,96	63,405	61,945
13	118,28	117,95	116,41	113,05	118,115	114,73
14	107,91	106,91	103,95	104,27	107,41	104,11
15	106,34	105,48	104,33	103,98	105,91	104,155
16	76,08	75,67	73,89	72,85	75,875	73,37
17	94,94	94,55	92,9	91,65	94,745	92,275
18	151,47	150,94	146,47	147,24	151,205	146,855
19	107,32	106,8	103,01	101,26	107,06	102,135
20	126,31	127,18	122,11	121,3	126,745	121,705
21	129,17	129,72	126,05	124,92	129,445	125,485
22	108,16	106,24	103,15	102,81	107,2	102,98
23	109,55	111,03	107,61	108,62	110,29	108,115
24	219,7	219,07	216,49	213,8	219,385	215,145
25	62,74	62,38	61,68	61,3	62,56	61,49
26	47,75	46,84	47,27	46,48	47,295	46,875
27	112,27	113,82	112,42	110,81	113,045	111,615
28	108,9	106,91	105,78	104,24	107,905	105,01
29	227,22	224,76	218,82	221,08	225,99	219,95
30	76,63	77,98	75	74,97	77,305	74,985
31	98,7	99,06	96,47	96,68	98,88	96,575
32	128,34	126,55	124,59	124,61	127,445	124,6
33	194,95	197,19	191,86	188,59	196,07	190,225
34	83,49	83,24	81,79	80,15	83,365	80,97
35	158,47	159,52	155,7	153,72	158,995	154,71
36	97,81	98,57	95,7	94,5	98,19	95,1

ES 2 445 148 T3

37	128,16	128,8	124,29	122,76	128,48	123,525
38	150,66	152,11	146,44	145,49	151,385	145,965
39	154,06	153,63	147,09	149,63	153,845	148,36
40	124,96	125,5	123,37	120,56	125,23	121,965
41	74,73	75,16	72,03	70,96	74,945	71,495
42	103,97	104,27	101,94	99,99	104,12	100,965
43	47,67	47,63	47,81	46,75	47,65	47,28

Tabla 11: Estadística para un calibrador simulado de TRIG usando el sistema Hitachi 911.

Estadística descriptiva:	TRIG	
	Prueba	Comparativa
Media	195,7775	191,37
Mediana	138,6	134,25
Moda	118,9	n.º ND
D.E.	194,022104	188,235364
CV	99,1033721	98,3620024
Máx.	1093,5	1026,6
Mín.	46,3	44,4
Intervalo	1047,2	982,2
X-2D.E.	-192,26671	-185,10073
X+2D.E.	583,821709	567,840728
n	80	80
Duplicados	40	40
T = 1,02983342 *C+ -1,3017213		
r = 0,99916942		
r2 = 0,99833953		
Sy/x = 8,06009802		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 12: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos CFAS y analito de TRIG

N.º de muestra	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Media	Media
1	453,1	446,8	460,4	454,3	449,95	457,35
2	96,3	98,2	97	99,3	97,25	98,15
3	157,9	155,5	160,6	158	156,7	159,3
4	155,7	158,6	155,2	155,8	157,15	155,5
5	98,7	98,6	95,8	98,4	98,65	97,1
6	97,3	97,6	98,5	97,9	97,45	98,2
7	100,8	101,7	102	101,9	101,25	101,95
8	137,4	135,3	134,4	136,4	136,35	135,4
9	172,5	173,8	169,5	173,4	173,15	171,45
10	179,4	175,9	176,2	178,9	177,65	177,55
11	125,8	125,6	129	127,9	125,7	128,45
12	234	231,9	228,8	228,5	232,95	228,65
13	81	81,3	81,3	81,5	81,15	81,4
14	119,2	118,9	117,7	117	119,05	117,35
15	78,7	80,6	76,7	77,8	79,65	77,25
16	195,8	197,2	187,7	186,7	196,5	187,2
17	81,9	83,9	81	80,1	82,9	80,55
18	228,1	225,6	215,6	214,4	226,85	215
19	363,5	360,6	355,8	352,2	362,05	354
20	136,8	136,7	132,5	128,9	136,75	130,7
21	102,3	103,2	99,5	97,3	102,75	98,4
22	118,9	121	117,1	115,3	119,95	116,2
23	134,2	135,7	131,1	131,8	134,95	131,45
24	57,4	58,2	54,7	51,7	57,8	53,2
25	181	183,9	179,3	175,4	182,45	177,35
26	46,3	49	44,4	45,6	47,65	45
27	215,3	215,9	206,2	205,8	215,6	206
28	139,8	143,7	133,5	134,1	141,75	133,8

ES 2 445 148 T3

29	236	234,5	226,1	226,9	235,25	226,5
30	1072,2	1093,5	1024,8	1026,6	1082,85	1025,7
31	177,7	176,3	170,8	167,9	177	169,35
32	231,5	229,1	217,1	219,2	230,3	218,15
33	230	233,6	224	221,7	231,8	222,85
34	97	93,7	93,5	92,5	95,35	93
35	222,3	220,5	210,3	210,8	221,4	210,55
36	163,1	161	162	163,7	162,05	162,85
37	68	67	67,2	66,2	67,5	66,7
38	83,3	84	83,7	85,1	83,65	84,4
39	831,9	815,1	823,5	834,4	823,5	828,95
40	128,5	128,4	132,3	131,5	128,45	131,9

Tabla 13: Estadística para un calibrador simulado de múltiples constituyentes de APO-A usando el sistema Integra 400.

Estadística descriptiva:	APO-A	
	Prueba	Comparativa
Media	152,97125	148,44125
Mediana	149,6	142,75
Moda	143	187,3
D.E.	22,8509047	24,44050743
CV	14,9380388	16,464768
Máx.	227,9	233,4
Mín.	111,8	108,6
Intervalo	116,1	124,8
X-2D.E.	107,269441	99,56023514
X+2D.E.	198,673059	197,3222649
n	80	80
Duplicados	40	40
T = 0,90586965 *C + 18,50282656		
R = 0,96613608		
r2 = 0,93341892		
Sy/x = 5,96187745		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 14: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos CFAS y análisis de APO-A

N.º de muestra	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Media	Media
1	152	147,1	155	143,9	149,55	149,45
2	196,7	195,3	194,5	185,9	196	190,2
3	150,6	143	135,4	132,4	146,8	133,9
4	189,9	194,1	184,6	187,3	192	185,95
5	227,9	221	233,4	219,1	224,45	226,25
6	116,4	111,8	118,7	108,6	114,1	113,65
7	189,3	200,3	188,7	196,2	194,8	192,45
8	133,4	135	133	128	134,2	130,5
9	141,8	150,7	147	139,7	146,25	143,35
10	140,4	149,1	140	150,1	144,75	145,05
11	150,7	143	150,3	134,5	146,85	142,4
12	151,4	145	147,5	142,4	148,2	144,95
13	122,9	114,3	117,5	125,2	118,6	121,35
14	153	147,7	150,2	154,1	150,35	152,15
15	119,6	123,7	129,7	130,7	121,65	130,2
16	144,7	143,1	133,2	125,7	143,9	129,45
17	123,7	125,2	114,2	110,3	124,45	112,25
18	135,2	149	127,6	128,7	142,1	128,15
19	166	157	144,8	148	161,5	146,4
20	134,9	132,5	123,2	123,2	133,7	123,2
21	155,2	161	143,2	143	158,1	143,1
22	148,6	145,8	139,6	137,7	147,2	138,65

ES 2 445 148 T3

23	174,4	171,9	166,6	168,7	173,15	167,65
24	125,9	133,6	114,3	119,7	129,75	117
25	154,8	156,9	151,4	154,4	155,85	152,9
26	145,3	147,5	141,5	138,8	146,4	140,15
27	150,5	149	141,8	141	149,75	141,4
28	148,6	148,4	141,8	142,5	148,5	142,15
29	188,3	184,8	189,3	183,7	186,55	186,5
30	152,8	154,7	145,5	141,7	153,75	143,6
31	149,6	145,2	140,1	137,8	147,4	138,95
32	156,9	148,9	146,8	147,4	152,9	147,1
33	168,6	178,1	168,1	187,3	173,35	177,7
34	133,4	124,3	122	125,5	128,85	123,75
35	162,9	164,1	159,9	170,8	163,5	165,35
36	154,5	154,5	161,1	144,4	154,5	152,75
37	165,9	168,5	162	163,1	167,2	162,55
38	168,8	167,1	177,9	178	167,95	177,95
39	149,6	151,3	142,5	143,8	150,45	143,15
40	130,4	128,7	134,5	133,6	129,55	134,05

Tabla 15: Estadística para un calibrador simulado de múltiples constituyentes de APO-B usando el sistema Integra 400.

Estadística descriptiva:	APO-B	
	Prueba	Comparativa
Media	102,5	89,5
Mediana	98,6	84,5
Moda	104,7	94,8
D.E.	28,1	28,4
CV	27,4	31,7
Máx.	186,3	170,2
Mín.	52,7	41,2
Intervalo	133,6	129
X-2D.E.	46,3	32,8
X+2D.E.	158,7	146,2
n	80	80
Duplicados	40	40
$T = 0,980 * C + 14,810$		
$r = 0,988$		
$r^2 = 0,977$		
$Sy/x = 4,344$		

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 16: Datos observados basándose en sujetos experimentales, usando referencia de calibración de lípidos CFAS y analito de APO-B

N.º de muestra	Prueba		Comparativa		Prueba	Comparativa
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Media	Media
1	137,3	136,4	129	127,3	136,85	128,15
2	90,4	92,2	85,6	78,6	91,3	82,1
3	73,5	73,9	57,9	58,1	73,7	58
4	102,2	103,2	94,8	93	102,7	93,9
5	79	76,3	65,9	70,1	77,65	68
6	185,4	186,3	162	165,7	185,85	163,85
7	106,6	104,7	97,8	85,2	105,65	91,5
8	106,1	100,2	91	88,4	103,15	89,7
9	95,8	100,2	78,1	84,8	98	81,45
10	91,7	92	84,3	78,7	91,85	81,5
11	103,3	93,2	72,7	81,3	98,25	77
12	103,4	96,9	73,9	78,5	100,15	76,2
13	83,4	77,7	66,2	65,3	80,55	65,75
14	95,1	102	81,7	80,9	98,55	81,3
15	94,6	90,6	79,4	81,2	92,6	80,3
16	107,7	99,5	84,1	90	103,6	87,05

17	83,9	80,9	69,6	66,1	82,4	67,85
18	55,3	52,7	43,2	41,2	54	42,2
19	102	104,7	95,3	87,9	103,35	91,6
20	109,8	118,9	108,1	108,2	114,35	108,15
21	85,2	85,7	78,4	75,4	85,45	76,9
22	74,4	80,3	67	71,9	77,35	69,45
23	112,9	106,5	93,1	93,1	109,7	93,1
24	96,3	97,6	86,2	85,2	96,95	85,7
25	81,5	76,9	61,6	65,5	79,2	63,55
26	129,9	127,1	117,9	114,8	128,5	116,35
27	86,1	86,7	71,7	72,3	86,4	72
28	102,3	104,7	93,2	94,8	103,5	94
29	74,4	81	65,8	62,2	77,7	64
30	122,9	115,8	108,4	108,7	119,35	108,55
31	149,3	151,6	145,2	137,4	150,45	141,3
32	117	101,9	93,5	84,6	109,45	89,05
33	149,3	155,6	145,2	141,3	152,45	143,25
34	135,5	132,3	125,4	128,3	133,9	126,85
35	114,1	113,3	96,1	98,2	113,7	97,15
36	77	80,7	70,3	67,8	78,85	69,05
37	90,8	88	84,8	79,7	89,4	82,25
38	71,3	66,6	52	51,4	68,95	51,7
39	69,6	69,2	62,2	52	69,4	57,1
40	178,1	172,3	170,2	155,4	175,2	162,8

Ejemplo 5: Conjunto de control de calidad de múltiples niveles

La tabla 17 demuestra una configuración que da a conocer tres niveles de un producto de QC usado en pruebas de QC de rutona en un laboratorio clínico. Las pruebas pueden producirse en cualquiera o todos los niveles, dependiendo de las necesidades del usuario.

5 Tabla 17 Conjunto de control de calidad de múltiples niveles

Conjunto de QC	Unidades	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Colesterol total	mg/dl	100	250	500
HDL	mg/dl	20	50	100
Triglicéridos	mg/dl	90	150	250
LDL	mg/dl	80	200	400
APO-A	mg/dl	63	156	313
APO-B	mg/dl	53	132	263

De manera similar al conjunto de calibradores de múltiples puntos dado a conocer previamente en otra parte del presente documento, puede prepararse el conjunto de control de calidad como niveles individuales o a partir de una dilución del mayor nivel. A concentrados de lípidos sustancialmente puros se les asigna un valor tras diluirse hasta el intervalo del instrumento apropiado y se someten a prueba. Usando el tampón preparado tal como se expone con respecto a las composiciones dadas a conocer en la tabla 1, se añaden las cantidades necesarias de componentes para preparar cada nivel individualmente. Entonces se filtran los niveles a través de un filtro de 0,2 µm y se someten a prueba.

Los puntos de referencia pueden usarse sin un valor asignado. En tales casos, el usuario final puede establecer sus propios valores basándose en muestras clínicas de su laboratorio. Sin embargo, estos puntos de referencia también pueden ejecutarse frente a una preparación de referencia patrón y asignársele un valor. Tras haberse calibrado un analizador, el usuario final puede ejecutar estos niveles para verificar el comportamiento del ensayo. También pueden usarse puntos de referencia de control de calidad para la localización de problemas. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

20 Ejemplo 6: Control de calidad de múltiples niveles

Para ilustrar que un producto lipídico tal como se describió anteriormente podría usarse para control de calidad, se usaron una disolución de nivel 2 y una disolución de nivel 3 a partir de una formulación tal como se describe en otra parte del presente documento como control en el sistema Integra 400 durante 43 días. Se recogieron los datos y se compararon con los resultados obtenidos actualmente con los controles Preci de Roche para TRIG y CHOL, y los controles de lípidos de Roche para HDL, LDL, APO-A y APO-B. Se ejecutaron esos controles entre 52-85 días, dependiendo del analito. Una comparación de la D.E. y el CV para cada analito demostró que el material usado era o bien equivalente a o bien mejor que el material de control del fabricante.

Además del estudio de control con el sistema Integra, se ejecutaron un producto lipídico, con disoluciones de niveles 2 y 5, de manera individual a lo largo de un periodo de 10 días en el sistema Immage de Beckman para Lp(a). La concentración de nivel 2 era representativa del intervalo de referencia, mientras que la concentración de nivel 3 estaba fuera del intervalo. Los datos de nivel 2 ilustraron un intervalo de 12,7-15,9 con una media de 14,1 mg/dl. Los datos de nivel 3 ilustraron un intervalo de 49,5-59,8 con una media de 54,2 mg/dl. Los datos están incluidos en la tabla 19 a continuación.

Tabla 18: Control de calidad de múltiples niveles usando controles de Roche

QC de nivel 2	CHOL	HDL	LDL	APO-A	APO-B	TRIG
Media	107,61	42,44	101,26	162,17	80,54	106,12
D.E.	1,74	1,24	15,41	5,64	3,43	14,22
CV	1,62	2,93	15,22	3,48	4,26	13,4
2D.E.	3,48	2,48	30,82	11,28	6,86	28,44
X-2D.E.	104,13	39,96	70,44	150,89	73,68	77,68
X+2D.E.	111,09	44,92	132,08	173,45	87,4	134,56

  

QC de nivel 3	CHOL	HDL	LDL	APO-A	APO-B	TRIG
Media	181,46	38,77	217,07	107,79	179,15	177,53
D.E.	3,07	39,11	6,93	4,24	7,2	3,67
CV	1,69	100,89	3,19	3,94	4,02	2,07
2D.E.	6,14	78,22	13,86	8,48	14,4	7,34
X-2D.E.	175,32	-39,45	203,21	99,31	164,75	170,19
X+2D.E.	187,6	116,99	230,93	116,27	193,55	184,87

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

Tabla 19: Material de control de calidad de múltiples niveles

QC de nivel 2	CHOL	HDL	LDL	APO-A	APO-B	TRIG	Lp(a)
Media	183,8	27,3	124	25,5	87,9	231,9	14,1
D.E.	3	0,7	2,3	3,1	6,4	3,6	1,0
CV	1,6	2,6	1,9	12	7,3	1,6	7,4
2D.E.	6	1,4	4,6	6,1	12,8	7,2	2,0
X-2D.E.	177,9	25,9	119,4	19,4	75,1	224,7	12,1
X+2D.E.	189,8	28,7	128,6	31,6	100,7	239,1	16,1

  

QC de nivel 3	CHOL	HDL	LDL	APO-A	APO-B	TRIG	Lp(a)
Media	368,9	51,5	249,9	69,5	178,5	455,4	54,2
D.E.	6,6	1,5	4,6	4	6,5	6,8	3,0
CV	1,8	2,9	1,9	5,7	3,6	1,5	5,5
2D.E.	13,2	2,9	9,3	8	13	13,6	6,0
X-2D.E.	355,8	48,6	240,7	61,5	165,5	441,8	48,2
X+2D.E.	382,1	54,5	259,2	77,5	191,5	469,1	60,2

(términos estadísticos definidos en otra parte del presente documento)

**Ejemplo 7: Conjunto de QC de verificación de calibración y linealidad**

10 La tabla 20 expone una configuración para un conjunto de pruebas de verificación de calibración y linealidad usando 5 niveles espaciados equitativamente para cubrir el intervalo notificable de un método que está sometándose a prueba. Las pruebas deben usar los puntos bajo, medio y alto para cubrir el intervalo necesario para verificar o confirmar la linealidad.

Tabla 20 Conjunto de QC de verificación de calibración y linealidad

Calibrador	Unidades	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Colesterol total	mg/dl	100	275	450	625	800
HDL	mg/dl	25	48,75	72,5	96,25	120
Triglicéridos	mg/dl	50	287,5	525	762,5	1000
LDL	mg/dl	75	226,25	377,5	528,75	680
APO-A	mg/dl	78	152,25	226,5	300,75	375
APO-B	mg/dl	49	150	251	352	453

5 Se someten a ensayo concentrados de lípidos sustancialmente puros y se les asigna un valor tal como se expuso previamente en otra parte del presente documento. Usando el tampón preparado según se describió previamente para la tabla 1, se preparan los niveles 1 y 5 añadiendo las cantidades apropiadas de concentrados de lípidos. Se someten a ensayo los niveles 1 y 5. Se realizan ajustes de modo que cada nivel esté en la concentración designada. Entonces vuelven a someterse a prueba los niveles y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

10 Se preparan los niveles 1 a 5 usando el método de "igual delta" preferido utilizado por la directriz EP6 de NCCLS para pruebas de linealidad. (NCCLS, 2003, en: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, Approved Guideline (Evaluación de la linealidad de procedimientos de medición cuantitativos, un enfoque estadístico, directriz aprobada), Vol. 23 (N.º 16), Wayne, PA). Se prepara el nivel 2 combinando 3 partes de nivel 1 con 1 parte de nivel 5. Se prepara el nivel 3 añadiendo partes iguales de ambos niveles 1 y 5. Se prepara el nivel 4 añadiendo 1 parte de nivel 1 y 3 partes de nivel 5. Entonces se somete a prueba cada nivel para garantizar que se alcanza la concentración objetivo. Puede ejecutarse el conjunto de verificación de calibración y linealidad frente a un método de referencia para la asignación de valores. Una vez establecidos, el usuario final puede ejecutar estos 5 niveles como muestras de pacientes y generar una curva de linealidad. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

Ejemplo 8: Puntos de corte cualitativos

20 La tabla 21 expone una configuración para un sistema de pruebas de punto de atención (POCT) en el que sólo se notifican resultados cualitativos. Se usan los materiales para establecer puntos de corte inferior y superior, o resultados negativos y positivos.

25 Se produce este material tal como se describió previamente en otra parte del presente documento tal como se expone con respecto a un conjunto de calibradores de dos puntos. La referencia negativa puede ser un material de blanco adecuado con una cantidad "cero" del componente deseado. Las composiciones demuestran estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA.

Tabla 21 Puntos de corte cualitativos

Conjunto cualitativo	Unidades	Negativo	Positivo (hombres)	Positivo (mujeres)
Colesterol total	mg/dl	0	>240	> 240
HDL	mg/dl	0	<35	< 45
Triglicéridos	mg/dl	0	100	100
LDL	mg/dl	0	> 190	> 190
APO-A	mg/dl	0	>120	>120
APO-B	mg/dl	0	<120	<120

Folleto de producto HDL-C plus de Roche 02-2002  
 Folleto de producto LDL-C plus de Roche 02-2002  
 Folleto de producto Cholesterol Gen. 2 de Roche 05-2003  
 (2001, en: Appleton & Lange's Outline Review Clinical Chemistry, Christenson, Gregory y Johnson, eds., McGraw-Hill)

Ejemplo 9: Composición representativa:

Una composición de muestra, que demuestra estabilidad ampliada en comparación con composiciones por lo demás idénticas que no comprenden TDPA, es tal como sigue:

- 30 4,0 g/l de TDPA
- 0,9 g/l de azida de sodio
- 40 ppm de ProClin™

Se añadió Oxyrase™ en un tampón que comprendía HEPES, de aproximadamente pH 7,4 (oscilando el pH entre aproximadamente 7,2 y 7,6).

35 Estabilidad de composición:

40 Se han sometido a ensayo varias formulaciones tal como se dio a conocer previamente en otra parte del presente documento para evaluar la estabilidad de la composición usando métodos bien conocidos en la técnica. Los análisis hasta la fecha demuestran significativamente menos del 10% de degradación a lo largo de pruebas en tiempo real durante un periodo de 6 meses. Se han llevado a cabo pruebas en tiempo real tanto a temperaturas refrigeradas (por ejemplo, 2 - 8°C) como a temperaturas congeladas (por ejemplo, de -10 a -20°C) como condiciones de almacenamiento.

5 Las pruebas de estabilidad continúan y las composiciones sometidas a prueba han demostrado sustancialmente menos degradación en comparación con composiciones por lo demás idénticas a las que no se añadió TDPA. La estabilidad de mercado deseada es aproximadamente de desde 12 hasta 15 meses. Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que la composición de la invención es estable en y a través del intervalo de estabilidad de mercado deseado. Se han llevado a cabo pruebas con formulaciones de entre 4 - 9 gramos por litro de TDPA con y sin Oxyrase™ presente y la estabilidad de las diversas formulaciones es aproximadamente igual.

Ejemplo 10: Uso de diversos antioxidantes en disoluciones patrón

10 Los antioxidantes elegidos y sometidos a prueba incluyeron sal de dodecasodio del ácido fítico, N-acetil-L-cisteína, BHT, ácido ascórbico, ácido fumárico, EDTA, monioglicerol, galato de propilo, hidroquinona, ácido isoascórbico, sal de dipotasio del ácido fítico y cisteamina HCl.

Tabla 22: Antioxidantes primarios

	Fenoles	“Fenoles impedidos”	Antioxidantes primarios variados
ANTIOXIDANTES PRIMARIOS (Terminar la reacción de cadena por radicales libres mediante la acción como donadores de electrones o hidrógeno para radicales libres, dando como resultado la formación de productos más estables)	Galato de dodecilo Galato de octilo Galato de propilo Hidroquinona Trihidroxibutirofenona Ácido nordihidroguayarático	BHA BHT TBHQ Tocoferol Tocofersolán Acetato de tocoferilo Linoleato de tocoferilo Nicotonato de tocoferilo Succinato de tocoferilo Goma guar Serie Ionox Vitamina E	Etoxiquina Anoxómero Trolox-C

Tabla 23: Antioxidantes secundarios o sinérgicos

	Eliminadores de oxígeno	Agentes de quelación	Antioxidantes secundarios	Antioxidantes secundarios variados
ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS / SINÉRGICOS (clasificados ampliamente como eliminadores de oxígeno y quelantes)	Ascorbil-sulfato de disodio Sulfato de hidrazina Bisulfato de sodio Metabisulfato de sodio Ácido ascórbico Ácido isoascórbico Ascorbato de alantoína Ascorbato de magnesio Ascorbato de metilsilanol Palmitato de ascorbilo Palmitato de ascorbil-metilsilanol Dipalmitato de ascorbilo Estearato de ascorbilo Ácido eritóbico Eritorbato de sodio	Polifosfatos Ácido fosfórico EDTA Ácido tartárico Ácido cítrico Ésteres de citrato Citrato de acetil-trihexilo Citrato de trietilo Ácido fítico Lecitina	3,3-TDPA Ésters de dilaurilo, diestearilo Tiodipropionato de dilaurilo, Tiodipropionato de dimiristilo, Tiodipropionato de dicetilo, Tiodipropionato de diestearilo, Tiodipropionato de ditridecilo	Nitrato de sodio Nitrito de sodio Aminoácidos Cisteína Cisteína HCl Cisteamina HCl Acetil-cisteína Clorhidrato de histidina

Tabla 24: Antioxidantes variados

4,4 Isopropilidendifenol	Ácido dihidroximaleico
Decil-mercaptometilimidazol	N,N'-Difenol-p-fenilendiamina
Diamilhidroquinona	Ácido edético
Trioleato de digaloilo	Etanotiol
Dioleil-tocoferil-metilsilanol	Ácido fumárico
Hidroxilamina HCl	Ácido gálico
Sulfato de hidroxilamina	Gosipol
Clorhidrato de lisina	Hidrazina
o-Tolil-biguanida	4'-Hidroxitubiranilida
Ácido feniltioglicólico	Hidroxilamina
Sorbitil-furfural	Isobutileno
Tiodiglicol	Morfolina
Tiodiglicolamida	1,8-Naftalendiamina
Ácido tioláctico	2-Naftol
Ácido tiosalicílico	2-Naftilamina
Fosfito de tris(nonilfenilo)	N-Nitrosodietilamina
Acrilonitrilo	N-Nitrosodimetilamina
p-Bifenilamina	Ácido reductico
p-terc-Butilfenol	Sacarosa
Cloroacetona	Tionina
Crotonaldehído	Timol
Oleato cúprico	Tocol
DBHBT	Xibornal
Disulfuro de dibencilo	Monotioglicerol

5 Se prepararon disoluciones usando una formulación para un producto lipídico tal como se describe en otra parte del presente documento, usando TDPA 22 mM, Oxyrase™ y tampón HEPES. Se clasificaron los antioxidantes (tablas 22-24) y se seleccionó uno de cada grupo. Se prepararon disoluciones de nivel 5 subsiguientes usando los antioxidantes seleccionados (sin TDPA) a la misma concentración que TDPA. Se tomaron alícuotas de las disoluciones y se almacenaron a temperatura ambiente, a 2-8°C y a de -10 a -20°C. Periódicamente, se sometieron a prueba las alícuotas almacenadas para determinar HDL, LDL, TRIG, CHOL, APO-A y APO-B. El objetivo de estas pruebas era para determinar el efecto protector que tenían los diversos antioxidantes sobre el producto lipídico a las diferentes temperaturas.

10 Tabla 25: Porcentaje de recuperación de HDL en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento. El porcentaje de recuperación se refiere a la concentración relativa a la concentración inicial para cada configuración.

HDL	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
TDPA 18 g/l	30,30%	60,00%	231,10%	552
Monotioglicerol	103,20%	109%	109,80%	504
Ácido fumárico	28,90%	96,90%	103,50%	528
EDTA	78,20%	98,70%	99,80%	528
BHT	85,00%	95,40%	98,60%	528
N-acetil-L-cisteína	90,10%	100,90%	98,00%	552
Oxyrase™	75,20%	93,40%	98%	552
Ácido ascórbico	21,40%	67,40%	95,90%	528
Sal de dodecasodio del ácido fítico	115,40%	100,20%	93,90%	552
Oxyrase™ + TDPA 4 g/l	32,20%	89,10%	93,30%	552

## ES 2 445 148 T3

Tabla 26: Porcentaje de recuperación de LDL en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento

LDL	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
Ácido fumárico	98,50%	100,10%	100,20%	528
Sal de dodecasodio del ácido fítico	100,90%	99,50%	99,50%	552
N-acetil-L-cisteína	101,70%	99,30%	99,50%	552
EDTA	100,00%	97,10%	99,20%	528
Monotioglicerol	101,20%	97%	96,20%	504
BHT	101,60%	94,90%	96,00%	528
Oxyrase™	95,00%	95,70%	96%	552
Oxyrase™ + TDPA 4 g/l	95,70%	93,40%	93,90%	552
Ácido ascórbico	44,60%	69,60%	87,80%	528
TDPA 18 g/l	82,00%	99,80%	49,50%	552

Tabla 27: Porcentaje de recuperación de APO-A en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento

APO-A	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
Ácido fumárico	24,70%	121,30%	134,00%	528
BHT	70,30%	100,00%	113,90%	528
Monotioglicerol	67,30%	100%	111,40%	504
Ácido ascórbico	54,40%	85,80%	109,80%	528
Oxyrase™ + TDPA 4 g/l	27,70%	108,30%	106,70%	552
Sal de dodecasodio del ácido fítico	64,90%	86,00%	102,90%	552
N-acetil-L-cisteína	70,30%	89,80%	97,50%	552
Oxyrase™	44,60%	82,50%	97%	552
EDTA	34,10%	78,90%	91,90%	528
TDPA 18 g/l	50,80%	90,60%	67,60%	552

5 Tabla 28: Porcentaje de recuperación de APO-B en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento

APO-B	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
Oxyrase™ + TDPA 4 g/l	102,40%	115,00%	116,90%	552
Oxyrase™	78,80%	103,20%	113%	552
N-acetil-L-cisteína	94,50%	95,70%	104,30%	552
Sal de dodecasodio del ácido fítico	82,10%	85,60%	95,10%	552
TDPA 18 g/l	44,30%	102,80%	94,50%	552
Ácido fumárico	76,70%	83,60%	87,30%	528
EDTA	56,80%	69,00%	83,10%	528
BHT	63,10%	71,60%	80,30%	528
Ácido ascórbico	58,50%	72,20%	80,30%	528
Monotioglicerol	65,60%	70%	75,90%	504

Tabla 29: Porcentaje de recuperación de CHOL en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento

CHOL	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
Ácido ascórbico	1078,30%	634,30%	215,50%	528
Monotioglicerol	205,50%	202%	148,80%	504
N-acetil-L-cisteína	208,10%	207,70%	116,70%	552
Ácido fumárico	99,80%	101,20%	102,60%	528
BHT	103,90%	103,90%	102,00%	528
EDTA	100,30%	103,00%	99,10%	528
Oxyrase™	97,50%	97,00%	99%	552
Sal de dodecasodio del ácido fítico	97,50%	94,80%	97,40%	552
Oxyrase™ + TDPA 4 g/l	94,40%	95,00%	95,10%	552
TDPA 18 g/l	92,10%	98,00%	82,60%	552

Tabla 30: Porcentaje de recuperación de TRIG en función del antioxidante a múltiples temperaturas de almacenamiento

TRIG	temperatura ambiente	4°C	-20°C	Horas
Monotioglicerol	400,40%	382%	196,80%	504
Ácido ascórbico	531,30%	212,50%	131,30%	528
N-acetil-L-cisteína	348,60%	330,50%	125,70%	552
Ácido fumárico	102,10%	103,50%	104,30%	528
EDTA	102,50%	104,20%	102,40%	528
Sal de dodecasodio del ácido fítico	105,80%	99,90%	101,10%	552
Oxyrase™	105,90%	100,90%	101%	552
BHT	110,50%	103,20%	101,10%	528
Oxyrase™+ TDPA 4 g/l	100,00%	99,90%	100,60%	552
TDPA 18 g/l	84,90%	99,60%	79,80%	552

Ejemplo 11: Caracterización de la degradación de materiales lipídicos en una combinación antioxidante-tampón

5 Se prepararon concentrados de HDL y LDL en un tampón que incluía N-acetil-cisteína y ácido fumárico. Se prepararon disoluciones de nivel 5 tal como se describió anteriormente. Se congelaron las muestras, se descongelaron y se almacenaron a las siguientes temperaturas/intervalos: 20°C (TA), 2-8°C y -20°C. Se llevaron a cabo pruebas cada 48 horas durante cuatro semanas.

10 Estudios previos mostraron que sólo se recuperó N-acetil-L-cisteína de la misma manera que la combinación de N-acetil-L-cisteína y ácido fumárico. Sólo se recuperó mejor ácido fumárico en CHOL y TRIG en estudios previos, mientras que APO-A mejoró en la presente formulación. La combinación de N-acetil-L-cisteína y ácido fumárico a -20°C se recupera mejor en la mayor partes de las pruebas.

Tabla 31: Porcentaje de recuperación de analitos específicos con una combinación de antioxidantes.

	Porcentaje de recuperación a -20°C tras 744 horas					
	HDL	LDL	APO-A	APO-B	TCHOL	TRIG
	<b>N-acetil-L-cisteína y ácido fumárico</b>	96	102,3	96,8	105,6	131,3
<b>N-acetil-L-cisteína</b>	101	99	99,8	103,2	134,7	150,5
<b>Ácido fumárico</b>	97,9	99,6	107,1	105,2	102,3	102,4

Ejemplo 12: Efecto de la composición del tampón sobre la estabilización de la disolución patrón

15 Se prepararon disoluciones usando una formulación para un producto lipídico tal como se describe en otra parte del presente documento, usando TDPA 4 g/l, Oxyrase™ y HEPES. Se prepararon disoluciones de nivel 5 subsiguientes (sin usar HEPES) usando diversas tampones (BES, MOPS y TRIS) a la misma concentración que HEPES. Se tomaron alícuotas de las disoluciones y se almacenaron a temperatura ambiente, a 2-8°C y a de -10 a -20°C. Periódicamente, se sometieron a prueba las alícuotas almacenadas para determinar HDL, LDL, TRIG, CHOL, APO-A y APO-B. El objetivo de estas pruebas era para determinar el efecto protector que tenían los diversos tampones sobre el producto lipídico a diferentes temperaturas.

20 Los datos tras ~528 horas mostraron que el tampón HEPES proporcionaba el efecto más protector. Todos los demás tampones sometidos a prueba sí proporcionaron protección, pero no al mismo nivel que el tampón HEPES.

Tabla 32: Porcentaje de recuperación de patrones en función del tampón y la temperatura. Se proporcionan los datos como un porcentaje de la concentración inicial.

Recuperación de HDL				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas
Tampón MOPS	47,50%	91,90%	98,40%	528
Tampón Tris	77,30%	97,70%	97,60%	528
Tampón BES	77,30%	93%	95,90%	528
Tampón HEPES	32,20%	89,10%	93,30%	552
Recuperación de LDL				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas

ES 2 445 148 T3

Tampón BES	100,60%	97%	378,20%	528
Tampón MOPS	102,50%	95,20%	376,70%	528
Tampón Tris	97,00%	95,40%	99,10%	528
Tampón HEPES	95,70%	93,40%	93,90%	552
Recuperación de APO-A				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas
Tampón HEPES	27,70%	108,30%	106,70%	552
Tampón MOPS	33,80%	78,30%	91,70%	528
Tampón BES	40,20%	78%	90,70%	528
Tampón Tris	33,80%	72,50%	86,10%	528
Recuperación de APO-B				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas
Tampón HEPES	102,40%	115,00%	116,90%	552
Tampón MOPS	57,80%	82,80%	89,70%	528
Tampón Tris	49,30%	71,70%	80,80%	528
Tampón BES	54,50%	71%	80,40%	528
Recuperación de CHOL				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas
Tampón BES	101,20%	97%	100,90%	528
Tampón Tris	101,10%	98,50%	100,90%	528
Tampón MOPS	100,20%	96,80%	97,30%	528
Tampón HEPES	94,40%	95,00%	95,10%	552
Recuperación de TRIG				
Tampón	temp. ambiente	4°C	-20°C	Horas
Tampón HEPES	100,00%	99,90%	100,60%	552
Tampón Tris	111,30%	102,70%	100,40%	528
Tampón BES	109,90%	103%	99,10%	528
Tampón MOPS	99,00%	97,80%	97,20%	528

5 Se llevó a cabo un estudio adicional con el fin de caracterizar la degradación de las materias primas lipídicas (concentrados de HDL y LDL) en un tampón fosfato de sodio que incluía Oxryase™ y TDPA 4 g/l. Se preparó tampón de lípidos con la adición de fosfato de sodio y se generó un nivel 5, tal como se describe en otra parte del presente documento. Se congelaron las muestras, se descongelaron y se almacenaron a las siguientes temperaturas/intervalos: 20°C (TA), 2-8°C y -20°C. Se llevaron a cabo pruebas cada 48 horas durante cuatro semanas.

10 Tras 672 horas de pruebas, se observaron los siguientes resultados. APO-A y APO-B en disoluciones de nivel 5 con tampón fosfato de sodio se degradaron a lo largo del tiempo en comparación con las disoluciones de nivel 5 que contenían HEPES, demostrado en los datos expuestos en otra parte del presente documento, que aumentaron. APO-A en tampón fosfato de sodio a -20°C se recuperó al 95% tras 624 horas mientras que APO-A en tampón HEPES recuperó al 113% tras 600 horas. APO-B en tampón fosfato de sodio a -20°C recuperó al 97% tras 624 horas mientras que APO-B en tampón HEPES recuperó al 113% tras 600 horas. Las disoluciones de nivel 5 con tampón fosfato de sodio se recuperaron bien en todas las pruebas a -20°C (~98%), seguido por a 2-8°C (~93%).

## REIVINDICACIONES

1. Composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína (a) (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína, y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA), en la que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, oscilando el pH de dicha composición entre 6,5 y 9,0.
2. Uso de una composición de patrón de referencia de lípidos acuosa estable que comprende un constituyente sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), apolipoproteína (a) (Lp(a)) y un subcomponente de una apolipoproteína y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA), en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, oscilando el pH de dicha composición entre 6,5 y 9,0, para al menos uno de calibración, control de calidad, verificación de calibración y evaluación de linealidad.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho uso comprende un método manual, semiautomatizado o totalmente automatizado que comprende un instrumento para la medición de dicho constituyente.
4. Composición de referencia según la reivindicación 1, que comprende además un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en monoglicérol, ácido fumárico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), N-acetil-L-cisteína, Oxyrase™, ácido ascórbico y sal de dodecasodio del ácido fítico.
5. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho subcomponente es al menos un subcomponente seleccionado del grupo que consiste en AII, AIV, B-48, B-100, CI, CII, CIII, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, F, G, H y J.
6. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de CHOL oscila entre 0 y 5000 mg/dl.
7. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de triglicéridos oscila entre 0 y 4000 mg/dl.
8. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de LDL oscila entre 0 y 5000 mg/dl.
9. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de HDL oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
10. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de APO-A oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
11. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de APO-B oscila entre 0 y 1000 mg/dl.
12. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de Lp(a) oscila entre 0 y 1200 mg/dl.
13. Composición de referencia según la reivindicación 1, en la que dicho valor de dicho subcomponente oscila entre 0 y 500 mg/dl.
14. Composición de referencia según la reivindicación 1, comprendiendo además dicha composición un tampón que comprende ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) de manera que el pH de dicha composición oscila entre 6,5 y 8,0.
15. Composición de referencia según la reivindicación 1, que comprende además un tampón seleccionado del grupo que consiste en:
  - un tampón que comprende ácido N,N-bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfónico (BES) de manera que el pH de dicha composición oscila entre 6,8 y 8,3;
  - un tampón que comprende ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) de manera que el pH de dicha composición oscila entre 6,8 y 8,3;
  - un tampón que comprende ácido N-[tris(hidroxiethyl)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES) de manera que el

pH de dicha composición oscila entre 6,8 y 8,3;

un tampón que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) de manera que el pH de dicha composición oscila entre 6,8 y 8,3; y

5 un tampón que comprende tampón fosfato de Sorenson de manera que el pH de dicha composición oscila entre 6,8 y 8,3.

16. Composición de referencia según la reivindicación 1, comprendiendo además dicha composición una cantidad de azida de sodio de menos del 0,09% (peso/volumen).

10 17. Composición de patrón de calibración o control estable que comprende una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en la que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, comprendiendo además dicha composición un contenido predeterminado de analito sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína.

15 18. Método para producir la composición de referencia según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método mezclar un líquido que comprende agua, con un valor conocido de un analito sustancialmente puro seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína, para producir una mezcla y añadir además una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico a dicha mezcla, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro.

20 19. Método para producir una composición de patrón de calibración o control estable, comprendiendo dicho método mezclar una disolución acuosa con una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, y que comprende además añadir una cantidad predeterminada de un analito esencialmente puro, en el que dicho analito es al menos un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína.

25 20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha disolución acuosa se selecciona del grupo que consiste en agua, plasma, suero, una disolución que comprende albúmina sérica bovina, una disolución que comprende albúmina sérica humana y una disolución que comprende un tampón de Good.

30 21. Método según la reivindicación 19, comprendiendo dicho método además añadir a dicha mezcla un antimicrobiano.

35 22. Método para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento en el que dicho instrumento está adaptado para determinar una cantidad de un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína en una disolución de prueba, comprendiendo dicho método someter dicho instrumento a calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad con la composición de referencia según la reivindicación 1.

40 23. Kit para calibración, control de calidad, verificación de calibración o evaluación de linealidad de un instrumento adaptado para determinar la cantidad de un analito seleccionado del grupo que consiste en colesterol total (CHOL), triglicéridos (TRIG), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), apolipoproteína A (APO-A), apolipoproteína B (APO-B), Lp(a) y un subcomponente de una apolipoproteína en una disolución de prueba, comprendiendo dicho kit una composición que comprende una cantidad conocida de dicho analito y una cantidad de estabilización de ácido 3,3'-tiodipropiónico, en el que la cantidad de estabilización oscila entre 1,1 gramos por litro y 18,0 gramos por litro, comprendiendo además dicho kit un aplicador y un material con instrucciones para el uso de dicho kit.

45 24. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:

50 a) una composición que comprende 10 mg/dl de colesterol total, 5 mg/dl de HDL, sin triglicéridos, 5 mg/dl de LDL, 15,6 mg/dl de APO-A y 3,3 mg/dl de APO-B;

b) una composición que comprende 200 mg/dl de colesterol total, 37,5 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 162,5 mg/dl de LDL, 117,2 mg/dl de APO-A y 106,9 mg/dl de APO-B;

c) una composición que comprende 400 mg/dl de colesterol total, 115 mg/dl de HDL, 500 mg/dl de

- triglicéridos, 285 mg/dl de LDL, 359,4 mg/dl de APO-A y 187,5 mg/dl de APO-B;
- d) una composición que comprende 600 mg/dl de colesterol total, 177,5 mg/dl de HDL, 750 mg/dl de triglicéridos, 422,5 mg/dl de LDL, 554,7 mg/dl de APO-A y 287,0 mg/dl de APO-B; y
- 5 e) una composición que comprende 800 mg/dl de colesterol total, 200 mg/dl de HDL, 1000 mg/dl de triglicéridos, 600 mg/dl de LDL, 625 mg/dl de APO-A y 394,7 mg/dl de APO-B.
25. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una composición que no comprende ninguno de colesterol total, HDL, triglicéridos, LDL, APO-A y APO-B; y
- 10 b) una composición que comprende 200 mg/dl de colesterol total, 60 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 140 mg/dl de LDL, 188 mg/dl de APO-A y 92 mg/dl de APO-B.
26. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 a) una composición que comprende 100 mg/dl de colesterol total, 20 mg/dl de HDL, 90 mg/dl de triglicéridos, 80 mg/dl de LDL, 63 mg/dl de APO-A y 53 mg/dl de APO-B;
- b) una composición que comprende 250 mg/dl de colesterol total, 50 mg/dl de HDL, 150 mg/dl de triglicéridos, 200 mg/dl de LDL, 156 mg/dl de APO-A y 132 mg/dl de APO-B; y
- c) una composición que comprende 500 mg/dl de colesterol total, 100 mg/dl de HDL, 250 mg/dl de triglicéridos, 400 mg/dl de LDL, 313 mg/dl de APO-A y 263 mg/dl de APO-B.
- 20 27. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una composición que comprende 100 mg/dl de colesterol total, 25 mg/dl de HDL, 50 mg/dl de triglicéridos, 75 mg/dl de LDL, 78 mg/dl de APO-A y 49 mg/dl de APO-B;
- 25 b) una composición que comprende 275 mg/dl de colesterol total, 48,75 mg/dl de HDL, 287,5 mg/dl de triglicéridos, 226,25 mg/dl de LDL, 152,25 mg/dl de APO-A y 150 mg/dl de APO-B;
- c) una composición que comprende 450 mg/dl de colesterol total, 72,5 mg/dl de HDL, 525 mg/dl de triglicéridos, 377,5 mg/dl de LDL, 226,5 mg/dl de APO-A y 251 mg/dl de APO-B;
- d) una composición que comprende 625 mg/dl de colesterol total, 96,25 mg/dl de HDL, 762,5 mg/dl de triglicéridos, 528,75 mg/dl de LDL, 300,75 mg/dl de APO-A y 352 mg/dl de APO-B; y
- 30 e) una composición que comprende 800 mg/dl de colesterol total, 120 mg/dl de HDL, 1000 mg/dl de triglicéridos, 680 mg/dl de LDL, 375 mg/dl de APO-A y 453 mg/dl de APO-B.
28. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 a) una composición que no comprende ninguno de colesterol total, HDL, triglicéridos, LDL, APO-A y APO-B; y
- b) una composición que comprende más de 240 mg/dl de colesterol total, menos de 35 mg/dl de HDL, 100 mg/dl de triglicéridos, más de 190 mg/dl de LDL, más de 120 mg/dl de APO-A y menos de 120 mg/dl de APO-B.
- 40 29. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho kit comprende al menos una composición seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una composición que no comprende ninguno de colesterol total, HDL, triglicéridos, LDL, APO-A y APO-B; y
- 45 b) una composición que comprende más de 240 mg/dl de colesterol total, menos de 45 mg/dl de HDL, 100 mg/dl de triglicéridos, más de 190 mg/dl de LDL, más de 120 mg/dl de APO-A y menos de 120 mg/dl de APO-B.