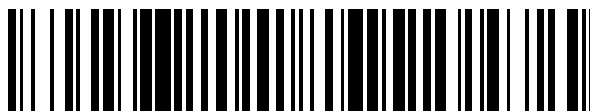


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 040**

51 Int. Cl.:

G01R 33/465 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2005 E 05753614 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 1774356**

54 Título: **Proceso para la determinación de lipoproteínas en fluidos corporales**

30 Prioridad:

01.06.2004 DE 102004026903

01.06.2004 US 576173 P

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

16.02.2015

73 Titular/es:

NUMARES AG (100.0%)

**Josef-Engert-Strasse 9
93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

**HUBER, FRITZ;
KREMER, WERNER y
KALBITZER, HANS ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 529 040 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la determinación de lipoproteínas en fluidos corporales

5 La presente invención se refiere a un proceso para la determinación de la densidad y distribución de tamaño de lipoproteínas en fluidos corporales y a un aparato para realizar este proceso.

La arteriosclerosis que, entre otras cosas, es atribuible a depósitos de colesterol en las paredes vasculares arteriales es una de las causas más frecuentes de muerte en las naciones industrializadas occidentales. Dependiendo de
10 dónde se produzcan los depósitos, pueden producirse disfunción de la circulación sanguínea en el cerebro (ictus), disfunción de la circulación sanguínea en el corazón (cardiopatía coronaria, infarto de miocardio) y enfermedades oclusivas arteriales en las arterias periféricas. Investigaciones realizadas han demostrado que el riesgo de padecer arteriosclerosis corresponde a la proporción de colesterol presente en la sangre. Este colesterol está presente en forma de partículas de lipoproteína que contienen colesterol, por ejemplo, junto con proteínas. Estas lipoproteínas efectúan el transporte de lípidos insolubles en agua en la sangre. Las lipoproteínas pueden subdividirse en
15 diferentes clases de lipoproteínas, entre otras, basándose en su densidad, componentes lipídicos y apolipoproteínas. El riesgo de padecer arteriosclerosis parece correlacionarse con un alto nivel de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad). Por otro lado, el colesterol en partículas de HDL (lipoproteína de alta densidad) parece contribuir a la eliminación de las placas arterioscleróticas en las paredes vasculares arteriales. Investigaciones posteriores indican que determinados tamaños y distribuciones de densidad dentro de las clases de lipoproteína son un buen indicador para el reconocimiento temprano de enfermedades cardiovasculares y el riesgo de padecer arteriosclerosis (Kuller *et al.*, (2002), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1175-1180; Blake *et al.*, (2002), Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women, *Circulation* 106, 1930-1937; Rosenson *et al.*, (2002), Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of arteriosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I Trial), *Am. J. Cardiol.* 90, 89-94; Rosenson *et al.*, (2002), Effects of pravastatin treatment on lipoprotein subclass profiles and particle size in the PLAC-I trial, *arteriosclerosis* 160, 41-48). Por esta razón, se realizan numerosas determinaciones de lipoproteínas en sangre para un reconocimiento precoz de enfermedades cardiovasculares. Se supone que el objeto de hasta 60-80 % de los ensayos de sangre de diagnóstico en el laboratorio es, al menos parcialmente, la determinación de lipoproteína.

A partir del documento EP 0 361 214 B1, se conoce un proceso para la determinación de la concentración de cuatro lipoproteínas en una muestra plasmática sanguínea por mediciones de RMN. En este proceso, el contorno de línea de un espectro de RMN de una muestra plasmática a analizar se ajusta por una combinación lineal ponderada de los cuatro espectros de referencia de lipoproteína. Refinando los coeficientes de ponderación de los espectros de referencia individuales, pueden calcularse las concentraciones de los cuatro componentes de lipoproteína. En el caso de este proceso, sin embargo, no puede determinarse ninguna distribución de tamaño ni ninguna distribución de densidad dentro de una clase de lipoproteínas.

En el artículo de revisión "Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interaction", *Journal of chromatography B*; 725 (1999), páginas 79-90, se desvela un proceso complicado para investigar interacciones entre proteína-ligando y en cuyo caso se usan las proteínas marcadas específicamente con $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ para espectroscopia RMN, aparte de RMN de gradiente de campo pulsado.

El documento US 6.617.167 B2 describe un método de exploración de un sujeto para detectar la presencia de lipoproteína X. También se describen métodos de clasificación de lipoproteínas. Mediante los mismos, solamente se desvela una clasificación general en clases tales como VLDL, LDL, HDL y quilomicrones.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso para una clasificación y una cuantificación de lipoproteínas en fluidos corporales más fina y precisa que la conocida en la técnica anterior y un aparato para realizar este proceso que está mejorado con respecto a las desventajas mencionadas anteriormente.

55 Este objeto se consigue de acuerdo con la invención mediante un proceso según la reivindicación 1. Aspectos ventajosos del proceso son la materia objeto de las reivindicaciones adicionales.

El proceso de acuerdo con la invención es un proceso para determinar concentraciones de subclases de lipoproteínas $k = 1 \dots N$ en un fluido corporal, caracterizándose cada subclase por una distribución de densidad y una distribución de tamaño seleccionadas respectivas; comprendiendo el proceso las etapas de

a) registrar o calcular un espectro de RMN de referencia para cada una de dichas subclases de lipoproteína para M condiciones de medición diferentes $i = 1 \dots M$ que son diferentes con respecto a la fuerza de un gradiente de campo magnético de sensibilización por difusión y/o la temperatura,

65

b) determinar una función de subclase $f_{i,k}$ para cada subclase de lipoproteína k y cada condición i de medición que describe el espectro de RMN de referencia de la subclase de lipoproteína k en las condiciones de medición i ,

5 c) medir los espectros de RMN $S_{i=1...M}$ de la muestra de fluido corporal a analizar en las mismas M condiciones de medición diferentes que las aplicadas en la etapa a),

d) ajustar las funciones de clase $f_{i,k}$ determinadas en la etapa b) al espectro de RMN S_i usando N factores de ponderación c_k de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$S_i = \sum_k^N c_k f_{i,k}$$

10 e) obtener la concentración de cada subclase de lipoproteína en la muestra de fluido corporal usando el correspondiente factor de ponderación c_k .

15 También se desvela un proceso para la determinación, en particular la clasificación y cuantificación, de lipoproteínas en fluidos corporales. Para esta finalidad, se miden espectros de RMN de una muestra de fluido corporal a analizar en diferentes condiciones de medición. Las diferentes condiciones de medición se seleccionan de tal manera que se permite la separación de líneas de resonancia RMN homogéneas superpuestas de diferentes subclases de lipoproteína. Modificando las condiciones de medición, se implementa una espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) multidimensional y unidimensional ponderada por difusión con gradientes de campo magnético pulsado. Estas condiciones diferentes de medición se seleccionan de diferentes gradientes de campo magnético y diferentes temperaturas. Para esta finalidad, se registran diversos espectros de RMN, por ejemplo, para una muestra plasmática o en suero a diferentes gradientes de campo magnético y/o diferentes temperaturas en cada caso. Los efectos cambiantes de los diferentes gradientes de campo magnético y de las diferentes temperaturas en la forma de señal, por ejemplo, la intensidad y/o la anchura de las señales de RMN de las subclases de lipoproteína individuales se determinan posteriormente y se asigna una determinada distribución de densidad y distribución de tamaño a las subclases de lipoproteína individuales basándose en los efectos diferentes.

20 Es posible mejorar el proceso modificando otros parámetros tales como la composición de la muestra (disolvente, modificaciones químicas). Para esta finalidad, se registran y se analizan conjuntamente diversos espectros de RMN, como norma, en diferentes condiciones.

25 El proceso puede usarse para analizar una amplia diversidad de diferentes especímenes de fluidos corporales, por ejemplo, muestras de plasma sanguíneo y suero en sangre de un origen deseado. Los fluidos corporales adecuados en este aspecto son todos los fluidos corporales que contengan lipoproteínas de diferentes orígenes, por ejemplo, sangre, linfa o fluido de médula espinal. El proceso permite el análisis de señales de RMN de una composición no homogénea en espectros de RMN atribuibles a diversa distribución no homogénea dentro de las subclases de lipoproteínas. Por tanto, las proporciones de colesterol, la distribución de densidad y distribución por tamaño de las partículas dentro de la subclase de lipoproteínas pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la constitución de un paciente.

30 La distribución del tamaño de las partículas de lipoproteína dentro de una subclase de lipoproteínas, por ejemplo, partículas HDL o LDL, puede determinarse de acuerdo con un aspecto de la invención aplicando diferentes gradientes de campo magnético, adicionalmente a los pulsos de alta frecuencia para producir espectros de RMN ponderados por difusión de la muestra a analizar, por ejemplo, una muestra de sangre. Esto puede realizarse produciendo un campo magnético adicional localmente diverso en la muestra, por ejemplo, usando espirales de gradiente además del campo magnético ya presente en el espectrómetro de RMN.

35 Un experimento eco de espín, en el que se produce además un gradiente de campo magnético se muestra esquemáticamente en la Figura 2 como meramente un posible ejemplo de espectroscopia RMN ponderada por difusión. Durante este experimento de eco de espín, la magnetización causada por los espines de los átomos de hidrógeno se rota primero en el plano de detección por un denominado pulso de 90° ($\pi/2$) y se detecta. En este plano de detección, la magnetización de paquetes de espín individuales se desfasa posteriormente. Las partículas de lipoproteína, por ejemplo, se difunden en diferente grado debido a sus diferentes tamaños. Si durante este período se aplica un gradiente de campo magnético a lo largo del campo z de la muestra, además del campo magnético existente, las diferentes partículas de lipoproteína se someten a la influencia de fuerzas de campo magnético diferentes como resultado de su tamaño diferente y por consiguiente su comportamiento de difusión diferente. Si se aplica un pulso de 180° , un pulso π , la magnetización de los espines de aquellas proteínas (las partículas de lipoproteínas más grandes, por ejemplo, partículas VLDL = lipoproteínas de muy baja densidad) se refocalizan sin demasiada difusión durante el desfase de los espines. Las partículas de lipoproteína más pequeñas, partículas HDL por ejemplo, ya se han difundido adicionalmente durante este período y se someten a la influencia de otra fuerza de campo z tal como su magnetización por el pulso de 180° que puede refocalizarse únicamente de

manera insuficiente o, dependiendo de la fuerza del gradiente de campo magnético, no del todo. Esto tiene la consecuencia de que, en función del gradiente de campo magnético aplicado, las señales de RMN de las partículas de lipoproteína más pequeñas pueden suprimirse selectivamente y/o la intensidad de estas señales puede reducirse de una manera definida (véanse, por ejemplo, también las Figuras 3 y 6). Además de ese experimento de eco de espín, son posibles una gran variedad de otras secuencias de pulso en el caso de variantes de los procesos de acuerdo con la invención. Por tanto, el gradiente aplicado es un gradiente de campo magnético sensibilizado por difusión.

A partir de la Figura 10, se puede observar que, dentro de una subclase de lipoproteína, el tamaño de las partículas de lipoproteína varía (por ejemplo en el caso de la subdivisión de las subclases de LDL [A] a LDL [C] seleccionada por los inventores). El método de medición del gradiente de campo magnético ponderado por difusión mencionado anteriormente también ofrece una posibilidad para determinar la distribución de tamaño dentro de las subclases de lipoproteínas. Esta distribución por tamaño también puede ser un indicador del riesgo personal de enfermedades cardiovasculares (Kuller *et al.*, (2002), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1175-1180; Blake *et al.*, (2002), Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women, *Circulation* 106, 1930-1937; Rosenson *et al.*, (2002), Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of arteriosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I Trial), *Am. J. Cardiol.* 90, 89-94; Rosenson *et al.*, (2002), Effects of pravastatin treatment on lipoprotein subclass profiles and particle size in the PLAC-I trial, *Arteriosclerosis* 160, 41-48).

A través de una realización de un proceso de acuerdo con la invención, durante el cual se aplican diferentes gradientes de campo magnético a la muestra a analizar, también es posible, por ejemplo, detectar subclases de lipoproteínas que previamente han sido difíciles de detectar, por ejemplo, Lp(a) y LDL densa pequeña que se clasifican por ser altamente peligrosas con respecto al riesgo de enfermedades cardiovasculares (compárese también la Figura 1).

Además, en una realización de un proceso de acuerdo con la invención, es posible modificar las temperaturas de medición como condiciones de medición adicionales. Las variaciones en la medición de temperaturas ejercen, por encima de todo, una influencia en la anchura de línea de las señales de RMN de las partículas de lipoproteína y sus componentes. A una temperatura elevada, la anchura de línea de las señales de RMN puede estrecharse (cambio en el tiempo de relajación transversal T2) dado que las partículas de lipoproteína se hacen más móviles a temperaturas elevadas, y el tiempo de relajación longitudinal T1 y el tiempo de relajación transversal T2 normalmente se hacen más elevados. Dependiendo de la secuencia de pulso de gradiente seleccionada, puede introducirse una ponderación de T1 y T2 de una manera definida además de la ponderación por difusión. En el caso de partículas empaquetadas particularmente densas, por ejemplo partículas de HDL, un aumento de temperatura generalmente no ejerce una fuerte influencia como es el caso de partículas empaquetadas menos densamente, por ejemplo partículas de LDL o VLDL. Esto tiene la consecuencia de que, en el caso de diferentes partículas de lipoproteína empaquetadas densamente, un cambio de temperatura tiene un diferente efecto sobre el cambio de las anchuras de línea de las señales de RMN de las partículas de lipoproteína implicadas. Por tanto, es posible determinar mediante una realización de acuerdo con la invención una distribución de densidad dentro de las subclases de lipoproteínas. Las temperaturas de medición típicas serían en este caso temperaturas de aproximadamente 278 K, 298 K, 308 K y 318 K.

En una realización de un proceso de acuerdo con la invención es posible cambiar simultáneamente el gradiente del campo magnético y la temperatura de medición. Sin embargo, también es posible cambiar solamente el gradiente de campo magnético a temperatura constante o viceversa para cambiar solamente la temperatura de medición con un campo magnético constante. Aparte del método de eco de espín descrito anteriormente, todos los métodos descritos en la bibliografía tales como PFG-STE, PFG-LED etc. pueden usarse para la ponderación por difusión.

Es posible determinar un conjunto multidimensional de parámetros de referencia característicos de un espectro de RMN para cada subclase de lipoproteínas (véase, por ejemplo, la Figura 9). Este conjunto multidimensional puede determinarse, por ejemplo, a partir de una serie de espectros de RMN adecuadamente registrados – registrándose un espectro para cada subclase de lipoproteína en un caso límite. Los parámetros de referencia característicos se seleccionan entre las distribuciones de los desplazamientos químicos, las distribuciones de las intensidades de señal de RMN, las distribuciones de las anchuras de línea de RMN y de las formas de línea en función de los gradientes de campo magnético u otros parámetros externos posibles tales como la temperatura. Mediante estos parámetros de referencia característicos, es posible calcular los espectros de RMN y ajustarlos a espectros experimentales mediante procesos de optimización multidimensionales conocidos en la bibliografía.

Dado que se conocen o se han determinado los parámetros de referencia, es posible determinar, en primer lugar, la concentración de las partículas de lipoproteína de las diferentes subclases a partir de los mismos. En segundo lugar, es posible determinar propiedades físicas y químicas adicionales dentro de una subclase tal como la composición lipídica y el tamaño exacto de las partículas de lipoproteína.

Es posible obtener una función de subclase denominada $f_{i,k}$, ($G, (\delta, p_1, \dots, p_N)$), que es dependiente de la fuerza del gradiente G , del desplazamiento químico δ y de otros parámetros experimentales p_j tales como la temperatura T , la secuencia de pulsos usada y la fuerza del campo magnético externo para cada subclase k de lipoproteína en las i condiciones de medición seleccionadas.

5 A continuación se construye la función de subclase $f_{i,k}$ a partir de las N funciones base g_k como

$$f_{i,k} = \sum_k^N g_k = \sum_k^N a_k(G, \delta_k, p_1, \dots, p_n, T_1^k(p_1, \dots, p_n), T_2^k(p_1, \dots, p_n)) \otimes L(\delta, \Delta\delta_{1/2}^k)$$

(1)

10 siendo a_k una función de valor complejo que describe la interacción entre la anchura y la fase de los parámetros y $L(\delta)$ una función de forma lineal centrada alrededor de $\delta = 0$ (por ejemplo, una función de Gauss o Lorentz con anchura $\Delta\delta_{1/2}^k$). A continuación se puede describir el espectro experimental completo S_i para las M condiciones de medición diferentes $i = 1 \dots$ para las N subclases con una concentración c_k mediante:

$$S_i = \sum_k^N c_k f_{i,k} \quad (2)$$

15 Para partículas y moléculas individuales libres de (aproximadamente) igual tamaño, el efecto de la intensidad de gradiente G en las funciones de subclase puede separarse mediante

$$f_i = \tilde{f}_i \bullet h_i(G) \quad (3)$$

20 En una simplificación normalmente aplicable, el efecto dependiente del tamaño de partícula (más exactamente de la constante de difusión correspondiente D_i) del gradiente de intensidad G es aproximadamente de

$$h_i = e^{-AD_i G^2} \quad (4)$$

25 La ventaja de este proceso consiste en que los parámetros de referencia característicos caracterizan en cada caso la subclase de lipoproteína pura y pueden adaptarse directamente a los parámetros del espectrómetro de RMN usados para registrar los espectros de RMN tales como la frecuencia de medición y la fuerza de campo magnético basándose en las consideraciones físicas básicas. Por otro lado, en el caso del proceso de medición mencionado anteriormente descrito en el documento EP 0 361 214 B1, los espectros de los componentes de lipoproteína pura medidos en un espectrómetro de RMN específico se someten a un sumatorio usando métodos matemáticos sencillos y se varían para reconstruir de esta manera el espectro experimentalmente medido de la muestra de sangre a analizar. Por consiguiente, este proceso es mucho más fuertemente dependiente de las condiciones de medición específicas, en particular de los parámetros, del espectrómetro de RMN usado. Por otro lado, el presente proceso, puede realizarse sin problemas en diferentes espectrómetros de RMN con diferentes frecuencias debido a la parametrización usando los parámetros de referencia característicos. Los parámetros de referencia característicos son independientes de los parámetros del aparato usado para registrar los espectros, por ejemplo, el espectrómetro de RMN.

40 Esta variante del proceso de acuerdo con la invención se basa en la consideración de que las partículas de una subclase de lipoproteína determinada se construye a partir de diferentes componentes químicos con diferentes patrones de desplazamientos químicos y tiempos de relajación y por consiguiente se caracterizan por unas líneas de resonancia no homogéneas pero en aquellas partículas del mismo tamaño proporcionan la misma respuesta a la variación de los gradientes de campo magnético. Esto se aprovecha particularmente bien mediante el proceso anterior para separar espectroscópicamente las subclases de lipoproteína y describirlas matemáticamente mediante el proceso descrito anteriormente. En condiciones experimentales determinadas, solamente las concentraciones de partículas c_k (véase la ecuación 2), requiere ajustarse entonces. Esto puede realizarse fiablemente mediante casi cualquier proceso de optimización deseado.

50 Además, se desvela un proceso que comprende las siguientes etapas de proceso:

A) determinar un modelo de referencia de RMN parametrizado para cada subclase de lipoproteína a analizar, que contiene los parámetros de referencia característicos de la subclase de lipoproteína y su comportamiento en las diversas condiciones de medición en cada caso.

5 Por lo tanto, también se calculan los efectos de las diferentes condiciones de medición en la intensidad de señal y/o la anchura de línea de cada subclase de lipoproteína (véanse, por ejemplo, los efectos de los gradientes del campo magnético sobre la intensidad de señal en el conjunto de datos de la Figura 9).

10 Posteriormente, los espectros de RMN de una muestra de plasma o de suero a analizar se registran en una etapa de proceso B) en las diferentes condiciones de medición usadas en A). En una etapa de proceso C), la distribución de intensidad y/o distribución de tamaño se determinan posteriormente para cada subclase de lipoproteína basándose en una ponderación de los parámetros de referencia.

15 En la Figura 9 se muestra un conjunto de datos de referencia de RMN determinado en la etapa del proceso A) para la subclase de lipoproteínas LDL [A] denominada así por los inventores. Dicho conjunto de datos de referencia de RMN puede obtenerse, por ejemplo, registrando los espectros de referencia de RMN para cada subclase de lipoproteína a analizar en diferentes condiciones de medición, es decir, por ejemplo, en diferentes gradientes de campo magnético en la etapa de proceso (A) y calculando posteriormente los espectros de RMN y ajustándolos a los espectros de referencia de RMN mediante funciones de Gauss y Lorentz, obteniendo de este modo una función matemática para los parámetros de referencia característicos de los espectros de referencia. Al registrar los espectros de referencia de RMN para cada subclase de lipoproteína individual, debe conocerse la concentración de esta subclase de lipoproteína en la muestra de referencia. También es posible determinar los parámetros de referencia de las subclases de lipoproteínas individuales para varias muestras de referencia en el caso de concentraciones desconocidas, usando métodos estadísticos.

25 Como alternativa, también es posible calcular los parámetros característicos para cada subclase de lipoproteína mediante modelos matemáticos en lugar de a partir de muestras de referencia ((Gounarides *et al.*, Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interaction, Journal of chromatography B; 725 (1999), páginas 79-90).

30 Ventajosamente, se obtiene una función matemática, la función base, que describe los parámetros de referencia característicos en el caso de ambos métodos alternativos para la determinación de los parámetros de referencia característicos. En la etapa del proceso B), los espectros de RMN de la muestra de plasma o de suero a analizar pueden registrarse en las mismas condiciones de medición (idénticos gradientes de campo magnético y/o idéntica temperatura de medición) como era el caso de las muestras de referencia o en el caso del cálculo de los parámetros de referencia mediante modelos matemáticos, dado que las condiciones de medición se establecieron correspondientemente en los modelos matemáticos.

35 En la etapa de proceso C), los espectros de RMN calculados se ajustan a los espectros determinados en B) mediante una ponderación de los parámetros de referencia de cada subclase de lipoproteína. Esta ponderación puede realizarse modificando las funciones base para cada subclase de lipoproteína, describiendo las funciones base los parámetros de referencia característicos de cada subclase de lipoproteína, mediante factores de proporcionalidad para cada función base de tal manera que los espectros de RMN calculados puedan ajustarse a los espectros de RMN medidos. Estos factores de proporcionalidad se multiplican después por factores de ponderación, factores de calibración, a partir de los cuales pueden extraerse conclusiones directas sobre la concentración de la subclase de lipoproteína en cuestión y sus tamaños y/o distribuciones de densidad. De esta manera, pueden determinarse en conjunto ventajosamente las concentraciones de partículas de las subclases de lipoproteína individual, su composición y distribución de densidad y/o distribución de tamaño en la muestra de plasma sanguíneo y suero en sangre.

40 En las etapas de proceso A) y B), se detecta ventajosamente un espectro de RMN de protón unidimensional de las muestras de referencia y de las muestras de plasma de sangre o suero a analizar por razones de simplicidad. En el caso un espectro de RMN unidimensional, la disminución en la magnetización transversal, en concreto el decaimiento de inducción libre (FID), se detecta durante la transformación de Fourier del pulso de RMN, estando presente sólo una variable de frecuencia a diferencia de los espectros de RMN multidimensionales (Hesse, Meier, Zeeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (Spectroscopic methods in organic chemistry); 4^a edición 1991 Thieme-Verlag, página 132). Por tanto, los espectros de RMN 1-D son más fáciles de registrar que los espectros multidimensionales. Sin embargo, también es posible usar espectros de RMN multidimensionales, por ejemplo, secuencias de pulso HSQC (espectroscopia de coherencia cuántica heteronuclear sencilla) usando no sólo núcleos ¹H, sino también núcleos ¹²C y ¹⁵N en una variante de un proceso de acuerdo con la invención. Los espectros multidimensionales son más laboriosos de registrar pero son capaces de proporcionar una información más detallada sobre las propiedades de las partículas.

45 Es posible, mediante una variante de un proceso de acuerdo la invención, detectar también las concentraciones de componentes no lipoproteína en la muestra plasmática o la muestra de suero, además de la clasificación de las lipoproteínas, la determinación de la concentración y la composición de las partículas de lipoproteína de las

5 subclases individuales y su distribución de tamaño y/o distribución de la densidad. Para esta finalidad, se registran los conjuntos de datos de referencia de RMN para cada componente no lipoproteína de concentración conocida, de una manera similar a las subclases de lipoproteína, con las mismas condiciones de medición que las de la etapa de proceso b) y después se determinan los parámetros de referencia característicos de cada componente no lipoproteína en cuestión de una manera similar a la de los componentes de lipoproteína. Estos parámetros de referencia se seleccionan, de forma similar a las lipoproteínas, entre las anchuras de línea, los desplazamientos químicos de las señales de RMN y las intensidades de las señales de RMN en función de los gradientes de campo magnético. Si además se encuentran disponibles los conjuntos de datos de referencia de RMN de estos componentes no lipoproteína, las concentraciones de estos componentes no lipoproteína pueden determinarse además en la etapa de proceso C), junto con una concentración de los componentes de lipoproteína. Los componentes no lipoproteína pueden en este caso seleccionarse a partir de metabolitos, por ejemplo, lactato, alcoholes, en particular etanol, ácidos grasos, carbohidratos, compuestos farmacéuticos y proteínas. Además, pueden determinarse ácidos nucleicos tales como ADN y ARN como cadenas dobles o sencillas.

15 Si además de los parámetros de referencia de los componentes de lipoproteína se usan los parámetros de referencia de los componentes no lipoproteína en la etapa de proceso C) para ajustar los espectros de RMN calculados a los espectros de RMN a analizar, entonces la precisión del proceso de ajuste puede aumentarse. Esto tiene la consecuencia de que pueden obtenerse resultados más precisos con respecto a las concentraciones y distribución de densidad y/o distribución del tamaño de los componentes de lipoproteína y de los componentes no lipoproteína de la muestra de sangre la etapa de proceso C).

25 En el caso de una variante de un proceso de acuerdo con la invención, se varían exclusivamente los gradientes del campo magnético como condición de medición y las muestras de sangre a analizar se miden a una temperatura constante. Durante este proceso, se determinan los diferentes efectos de los diversos gradientes de campo magnético en la intensidad de las señales de RMN de las subclases de lipoproteína individuales. En este caso, es ventajoso registrar cuatro espectros de RMN unidimensionales de una muestra RMN a analizar sin gradientes de campo magnético y con la variación de los gradientes de campo magnético. Sin embargo, también pueden registrarse menos de cuatro o más de cuatro espectros de RMN unidimensionales.

30 Además, es posible usar las diferencias en los tiempos de relajación longitudinal y transversal variando las condiciones de medición para discriminar entre las lipoproteínas.

35 La presente invención también se refiere a un sistema dispuesto para realizar el proceso de acuerdo con las explicaciones anteriores, comprendiendo el sistema:

- un espectrómetro de RMN dispuesto para realizar la etapa a) de la reivindicación 1,
- un espectrómetro de RMN dispuesto para realizar la etapa c) de la reivindicación 1,
- una instalación de procesamiento de datos dispuesta para realizar las etapas de proceso b), d) y e), cuando se le proporcionan los datos resultantes de la ejecución de las etapas a) y c) de la reivindicación 1.

40 A continuación, la invención se explicará con mayor detalle a modo de realizaciones y figuras.

Figura 1 muestra una clasificación de las diferentes lipoproteínas en subclases de lipoproteínas en la sangre humana que puede determinarse mediante un proceso de acuerdo con la invención.

Figura 2 muestra esquemáticamente la evolución de un experimento de eco de espín con un gradiente de campo magnético.

Figura 3 muestra el comportamiento de la intensidad de las señales de RMN de diferentes subclases de lipoproteínas bajo la influencia de ningún gradiente de campo magnético o gradientes de campo magnético de diferente fuerza.

Figura 4 muestra diferentes espectros de RMN ¹H unidimensionales de una muestra plasmática en sangre con y sin gradientes de campo magnético.

Figuras 5 y 6 muestran la región de las señales de metilo y metileno de los espectros de RMN¹H de una muestra plasmática en sangre registrada con y sin gradientes de campo magnético.

Figuras 7 y 8 muestran el ajuste de un espectro calculado a un espectro de RMN a analizar mediante una ponderación de las funciones de subclase de las subclases de lipoproteína individuales.

Figura 9 muestra, como un ejemplo, un conjunto de datos de referencia de RMN con parámetros de referencia característicos para una subclase de lipoproteína.

Figura 10 muestra en forma de tabla los desplazamientos químicos, los tamaños y las densidades de las subclases de lipoproteína y los componentes no lipoproteína que pueden determinarse mediante

un proceso de acuerdo con la invención.

La Figura 1 muestra la distribución del tamaño de partícula y distribución de la densidad de diferentes lipoproteínas detectables en la sangre mediante el proceso de acuerdo con la invención. El diámetro de partícula es en μm , en este caso, representado en el eje x y la densidad de las partículas en g/cm^3 en el eje y. La densidad de las partículas de lipoproteína de diferentes subclases se determina esencialmente por su composición lipídica. Las áreas indicadas por 1 caracterizan los quilomicrones, las áreas indicadas por 2 los restos de quilomicrones, las áreas indicadas por 3 las partículas de VLDL (lipoproteína de muy alta densidad), las áreas indicadas por 4 las partículas de IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), las áreas indicadas por 6 caracterizan la distribución de la densidad y la distribución del tamaño de partícula de las partículas de LDL, el área indicada por 5 la distribución de densidad y la distribución de tamaño de partícula de partículas de LDL densa pequeña y las áreas indicadas por 8 y 9 la distribución de la densidad y la distribución del tamaño de partícula de las partículas de HDL2 y HDL3. El área indicada por 7 caracteriza las partículas Lp(a).

La clasificación de las lipoproteínas en la sangre en las clases de lipoproteína se ha descrito entre otras en las siguientes publicaciones: Kuller *et al.*, (2002), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1175-1180; Blake *et al.*, (2002), Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women, *Circulation* 106, 1930-1937; Rosenson *et al.*, (2002), Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of arteriosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I Trial), *Am. J. Cardiol.* 90, 89-94; Rosenson *et al.*, (2002), Effects of pravastatin treatment on lipoprotein subclass profiles and particle size in the PLAC-I trial, *Arteriosclerosis* 160, 41-48. La clasificación de las diferentes lipoproteínas en subclases de lipoproteínas basándose en su distribución de densidad y distribución de tamaño y componentes de apoproteína varía, dependiendo de la referencia bibliográfica, habiéndose realizado la clasificación mostrada en el presente documento por los inventores. Dependiendo de las necesidades (por ejemplo, clasificación más detallada de las partículas de HDL en más de dos subclases de HDL, HDL 2 y HDL3, para análisis más detallados), las clasificaciones pueden cambiarse.

A modo de un proceso de acuerdo con la invención, todas las partículas mostradas en la Figura 1, en particular, por ejemplo, Lp(a) y LDL densa pequeña que pueden clasificarse como altamente peligrosas con respecto al riesgo para enfermedades cardiovasculares, pueden determinarse de una manera particularmente fiable. Las señales de RMN de todas estas subclases de lipoproteína presentan un comportamiento moderado en los gradientes de campo magnético que depende de la distribución del tamaño. En este respecto, los quilomicrones son tan grandes que las intensidades de sus señales en los espectros de RMN de las muestras de sangre no se pueden influenciar por la aplicación de gradientes de campo magnético, o casi nada.

La Figura 2 muestra esquemáticamente la evolución de un experimento de eco de espín con un gradiente de campo magnético aplicado. Dicho experimento puede usarse en una variante del proceso de acuerdo con la invención para la supresión selectiva o atenuación de las señales de RMN de las subclases de lipoproteínas más pequeñas. La Figura 2A muestra cómo se aplica un pulso $\pi/2$, un pulso de 90° , haciendo girar los espines de los átomos de hidrógeno de la dirección z al plano de detección, el plano x'-y'. En la muestra está presente un campo magnético B_0 en la dirección z.

La Figura 2B muestra cómo los espines presentan una precesión inmediatamente después del pulso $\pi/2$ con una frecuencia ligeramente diferente en el plano x'-y'. Mientras tanto, tiene lugar la relajación transversal, la descomposición del FID (decaimiento de inducción libre), en el plano x'-y' que está descrita por el tiempo de relajación transversal T_2 . Este FID en el dominio de tiempo puede convertirse, mediante una transformación de Fourier conocida por un experto en la técnica, en un espectro de RMN convencional en el dominio de frecuencia.

Si, durante la divergencia del espín en el plano x'-y', se aplica un gradiente de campo magnético B_0' a lo largo del eje z, además del campo magnético B_0 , los espines de las diferentes partículas de lipoproteína se sitúan en los diferentes campos magnéticos, dependiendo de su localización (Fig. 2C). Las partículas de lipoproteína más pequeñas y más compactas (por ejemplo, las partículas de HDL) se desplazan más rápidamente, debido a su difusión aumentada, que las partículas de lipoproteína más grandes correspondientes (por ejemplo, partículas de VLDL o LDL). La Figura 2C muestra esquemáticamente que los espines 10, 30 de las partículas de lipoproteína más pequeñas se mueven más rápidamente como resultado de su difusión aumentada en comparación con los espines 15, 20 de correspondientes partículas de lipoproteína más grandes. Por consiguiente, durante el decaimiento de la magnetización cruzada en el plano x'-y', las diferentes partículas de lipoproteína se sitúan en diferentes sitios como resultado de las diferentes velocidades de difusión y están por consiguiente bajo la influencia de las diferentes intensidades del campo magnético z. En particular, las fases de precesión de los espines de las partículas de lipoproteína más pequeñas que, debido a su difusión más rápida, están en un área con otro campo magnético, no pueden reenfocarse completamente mediante un pulso posterior de 180° , un pulso π , como se muestra en Figura 2D. Como resultado, como se muestra esquemáticamente en la Figura 2D, únicamente los espines 15, 20 de las partículas de lipoproteína más grandes se inclinan más de 180° cuando se aplica un pulso de 180° de tal manera que solamente estas se reenfocan dando como resultado un eco de espín, como se muestra en la Figura 2E. Por

otro lado, los espines 10, 30 de las partículas de lipoproteína más pequeñas que ya están en otro campo magnético, no se reenfozan. La consecuencia de esto es que, dependiendo de la intensidad de los gradientes de campo magnético aplicada, las señales de RMN de las partículas de lipoproteína más pequeñas que presentan una velocidad de difusión más alta que las partículas de lipoproteína más grandes pueden debilitarse selectivamente o incluso suprimirse completamente.

La Figura 3 muestra la disminución de las señales de RMN de diferentes subclases de lipoproteínas bajo la influencia de los efectos de gradientes de diferentes fuerzas. La intensidad de señal relativa se representa en el eje y, y el efecto de gradiente (tiempo x de fuerza de gradiente) se representa en el eje x. La curva indicada por 40 caracteriza la disminución en la intensidad de señal de las señales de los quilomicrones, la curva indicada por 50 la disminución en la intensidad de señal de señales de RMN de las partículas de VLDL y la curva indicada por 60 la disminución de la intensidad de señal de RMN de las partículas de LDL. La curva indicada por 70 es la intensidad de señal de las partículas de HDL y las curvas indicadas por 80 y 85 la disminución en la intensidad de señal de las partículas de HDL2 y HDL3 en función de la fuerza de los gradientes de campo magnético.

Para propósitos de claridad, la disminución en las intensidades de señal de algunas otras sustancias contenidas en el suero, que no pertenecen a la fracción de lipoproteína, se han caracterizado por 86. Estas sustancias podrían encontrarse en experimentos en un suero sin lipoproteína (LPDS = suero con déficit de lipoproteína). Puede observarse claramente a partir de las curvas que la atenuación de las señales de RMN aumenta con una disminución de tamaño de las partículas de lipoproteína y un aumento del gradiente de campo magnético.

La Figura 4 muestra diferentes espectros de RMN ^1H unidimensionales de una muestra de plasma sanguínea registrada sin y con gradientes de campo magnético. En la Fig. 4 y en todas las figuras posteriores que muestran espectros de RMN, el desplazamiento químico se representa en ppm en el eje x y la intensidad en el eje y. El espectro de RMN unidimensional indicado por 90 se registró sin gradientes de campo magnético y los espectros de de RMN indicados por 100 y 110 con gradientes de campo magnético aumentando desde 100 hasta 110. Puede observarse que aumentando los gradientes de campo magnético, las señales de todas las sustancias pequeñas disueltas en la sangre (proteínas, sales, aminoácidos) que son menores que 1 nm, pueden suprimirse casi completamente.

Las Figuras 5 y 6 muestran la misma región de 1,4 ppm a 0,8 ppm en un espectro de RMN ^1H , el área de los picos de metilo y metileno de las subclases de lipoproteína presentes en la sangre. En la Figura 6, el área mostrada en la Figura 5 se ilustra ampliada. El espectro indicado por 120 se registró sin gradientes de campo magnético y los espectros indicados por 130, 140 y 150 con gradientes de campo magnético crecientes. Puede observarse claramente que la intensidad de señal de todas las señales disminuye con un aumento de gradiente de campo magnético. En la Figura 6, las señales de RMN caracterizadas por 130A representan los picos de metilo y metileno de las partículas de VLDL y las señales caracterizadas por 130B los picos de metilo y metileno de las partículas de HDL. En este caso, las partículas de HDL son mucho más pequeñas que las partículas de VLDL (véase, por ejemplo, la Fig. 1). La Figura 6 muestra claramente que la intensidad de las señales de HDL disminuye más fuertemente con un aumento del gradiente de campo magnético que la intensidad de las señales de VLDL correspondientes. En el caso del espectro indicado por 150, que se registró en el gradiente de campo magnético más fuerte, las señales de HDL están casi completamente suprimidas.

La Figura 7 muestra la aproximación de un espectro calculado 210 con respecto a un espectro de una muestra de plasma en sangre o muestra de suero 200 a analizar. En este caso, la aproximación se realiza mediante variación y adición de diferentes funciones base 220 para las subclases de lipoproteína individuales. La línea indicada por 230 muestra el fondo de la medición, que es aún bastante fuerte en la Figura 7 dado que el espectro de RMN se registró sin gradiente de campo magnético.

La Figura 8 muestra el espectro de RMN ya mostrado en la Figura 7 aunque bajo la influencia de gradientes de campo magnético pequeños. La intensidad del fondo 230 ha disminuido correspondientemente dado que la intensidad de señal de las señales de RMN de las sustancias pequeñas disueltas está casi completamente suprimida.

La Figura 9 muestra como ejemplo el conjunto de datos de referencia de RMN de una subclase LDL[A] de lipoproteína, que contiene los parámetros de referencia característicos de esta subclase de lipoproteínas. La línea caracterizada por "patrón sin gradiente" indica la intensidad de señal de las señales de metilo y metileno sin gradiente de campo magnético, mientras que "gradiente patrón [A]" a "gradiente patrón [C]" muestran los parámetros de referencia correspondientes a la intensidad de señal de las señales de RMN con tres gradientes de campo magnético que aumentan de [A] a [C]. Un parámetro de referencia característico adicional es la anchura de línea y el desplazamiento químico, en ppm. Además, se indica la proporción de las funciones de Lorentz y Gauss en la función base. Dicho conjunto de datos de referencia de RMN puede extraerse para cada subclase de lipoproteínas. También se pueden extraer conjuntos de datos de referencia análogos para componentes no lipoproteína de la muestra de plasma en sangre o de la muestra de suero, por ejemplo lactato y otras proteínas.

La Figura 10 muestra un listado de 15 subclases de lipoproteínas y sus tamaños máximos y mínimos respectivos en nm, las densidades mínimas y máximas en g/ml y los desplazamientos químicos correspondientes de sus señales de RMN de metilo y/o metileno. La clasificación de las lipoproteínas en subclases de lipoproteína, por ejemplo HDL, y en subclases de lipoproteína adicionales, por ejemplo, HDL2 y HDL3, basándose en distribuciones de densidad y distribuciones de tamaño se ha realizado por los inventores. Dichas clasificaciones de subclase pueden subdividirse y/o incluso simplificarse adicionalmente, dependiendo de las necesidades. Mediante un proceso de acuerdo con la invención, pueden determinarse la distribución de tamaño y las distribuciones de densidad exactas para cada subclase de lipoproteína, lo que también puede ser un indicador de la susceptibilidad para determinadas enfermedades cardiovasculares. Además, también pueden determinarse otros constituyentes, por ejemplo, el LPDS más pequeño con un diámetro de < 1 nm, que están disueltos en la sangre. Adicionalmente, se indican el lactato y ácidos grasos insaturados [A] y ácidos grasos insaturados [B].

Realización:

En condiciones estandarizadas (por ejemplo, después de 12 horas de ayuno, antes o después de la aplicación de sustancias activas), se extrae > 1 ml de sangre del candidato y se mantiene enfriada en hielo. Usando métodos convencionales, se obtienen plasma sanguíneo y suero en sangre, y el suero en sangre se conserva en condiciones de frío (a 277 K). Antes de medir, se añaden 50 µl de una mezcla patrón A (DSS 0,01 M en D₂O) a 400-450 µl de plasma sanguíneo o suero plasmático en pipetas Eppendorf y se mezclan. Esta mezcla se transfiere después a un tubo de RMN de 5 mm y se coloca en el espectrómetro de RMN. Como alternativa, también pueden usarse sistemas de flujo continuo en cuyo caso un robot pipeteador proporciona la mezcla patrón a través de una pipeta y la transfiere en una cantidad definida al espectrómetro de RMN. Durante este proceso, la temperatura de medición se establece simultáneamente. Las muestras se miden después a 308 K. Se registra un espectro de RMN ¹H 1D en el espectrómetro de RMN (resolución: 32768 puntos de datos con 0,37 Hz/punto, anchura espectral de 12.000 Hz, pulso de 90° de 10 µs, retraso d1 de 0,7 s y tiempo de registro de 1,36 s). Usando los mismos parámetros espectrales, se realizan otras 3 mediciones de RMN ¹H 1D ponderadas por difusión con una secuencia de pulso STE-LED (eco estimulado y retraso de corriente Eddy longitudinal) modificada. Los gradientes ponderados por difusión representan en este caso el 40 % (40 G/m) con una longitud de 2 ms (experimento 2) 80 % (80 G/cm) con una longitud de 2 ms (experimento 3) y 80 % (80 G/cm) con una longitud de 3 ms (experimento 4). Los FID (decaimiento de inducción libre) medidos se filtran digitalmente, se realiza la transformación de Fourier y se procesan con un programa informático específico del espectrómetro (corrección de fase y corrección de línea base). Después estos espectros se convierten en un formato ASCII, y a continuación se cargan en un PC. En este momento se evalúan con las funciones de subclase multidimensionales ponderadas en concentración. Las concentraciones de partícula de las diferentes subclases de lipoproteína que se obtienen se imprimen después junto con otros parámetros (por ejemplo, composición de lípidos).

El alcance de la protección de la invención no está limitado a los ejemplos dados anteriormente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

5 1. Proceso para determinar concentraciones de subclases de lipoproteína $k = 1...N$ en un fluido corporal, estando cada subclase **caracterizada por** una distribución de densidad y una distribución de tamaño seleccionadas respectivas; comprendiendo el proceso las etapas de

- 10 a) registrar o calcular un espectro de referencia de RMN para cada una de dichas subclases de lipoproteína para M condiciones de medición diferentes $i = 1...M$ que son diferentes con respecto a la fuerza de un gradiente de campo magnético de sensibilización por difusión y/o la temperatura,
- 10 b) determinar una función de subclase $f_{i,k}$ para cada subclase de lipoproteína k y cada condición de medición i que describe el espectro de referencia de RMN de la subclase de lipoproteína k en las condiciones de medición i ,
- 10 c) medir los espectros de RMN $S_{i=1...M}$ de la muestra de fluido corporal a analizar en las mismas M condiciones de medición diferentes que las aplicadas en la etapa a),
- 15 d) ajustar las funciones de clase $f_{i,k}$ determinadas en la etapa b) a los espectros de RMN S_i usando N factores de ponderación c_k de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$S_i = \sum_k^N c_k f_{i,k}$$

20 e) obtener la concentración de cada subclase de lipoproteína en la muestra de fluido corporal usando el correspondiente factor de ponderación c_k .

2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de fluido corporal es una muestra de plasma o de suero.

25 3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se detectan espectros de RMN 1D de muestras de referencia y muestras de suero o muestras de plasma en sangre a analizar.

30 4. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que las subclases de lipoproteína se seleccionan entre: quilomicrón-A, quilomicrón-B, quilomicrón-C, restos de quilomicrón, VLDL-A, VLDL-B, VLDL-C, IDL, LDL densa pequeña, LDL-A, LDL-B, LDL-C, HDL-2, HDL-3 y Lp(a).

5. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, en el que se determinan además las concentraciones de componentes no lipoproteína en la muestra de plasma o la muestra de suero.

35 6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que los componentes no lipoproteína se seleccionan entre moléculas orgánicas, en particular lactato, alcohol, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, en particular ADN y ARN, ácidos grasos, carbohidratos, compuestos farmacéuticos y proteínas.

40 7. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el gradiente de campo magnético varía exclusivamente como condición de medición.

8. Proceso de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que se registran al menos cuatro espectros de RMN 1D de una muestra de RMN a analizar con diferentes gradientes de campo magnético en cada caso.

45 9. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se determinan la distribución de densidad y/o la distribución de tamaño y la concentración de otras partículas no homogéneas distintas de las lipoproteínas.

50 10. Sistema dispuesto para realizar el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el sistema:

- un espectrómetro de RMN dispuesto para realizar la etapa a) de la reivindicación 1,
 - un espectrómetro de RMN dispuesto para realizar la etapa c) de la reivindicación 1,
 - una instalación de procesamiento de datos dispuesta para realizar las etapas de proceso b), d) y e), cuando se
- 55 le proporcionan los datos resultantes de la ejecución de las etapas a) y c) de la reivindicación 1.

FIG 1

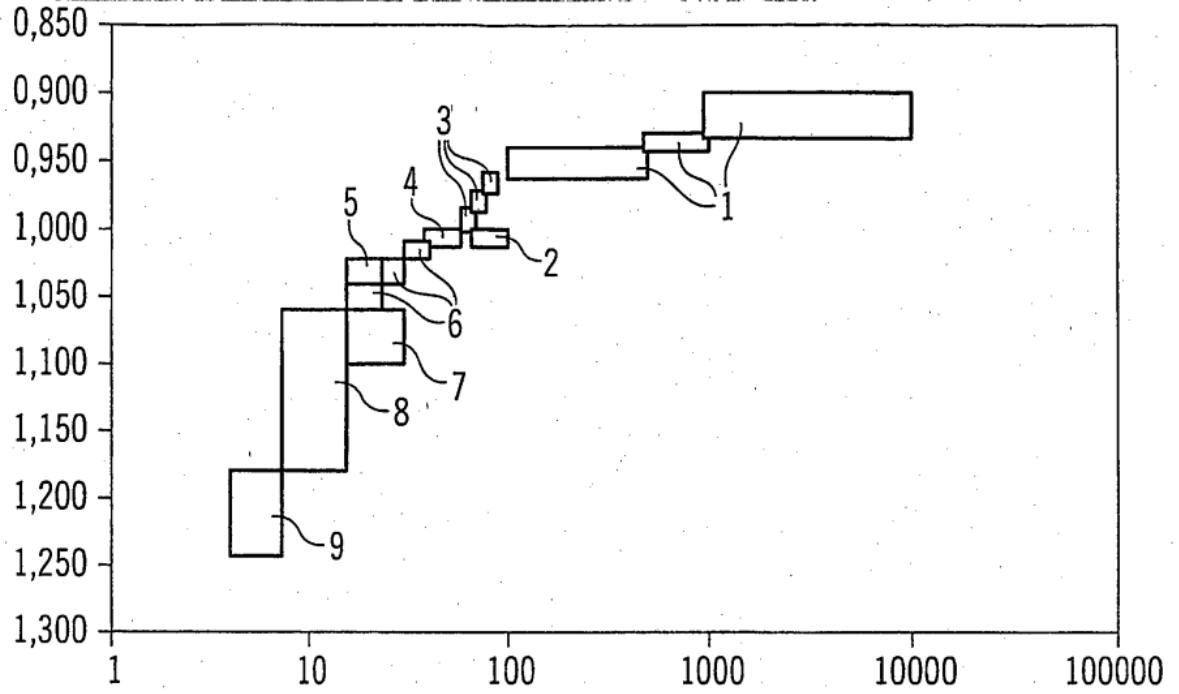


FIG 2A

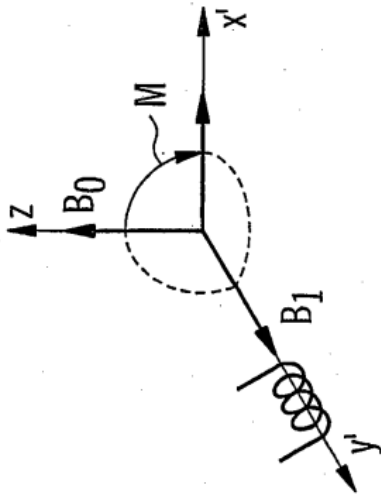


FIG 2B

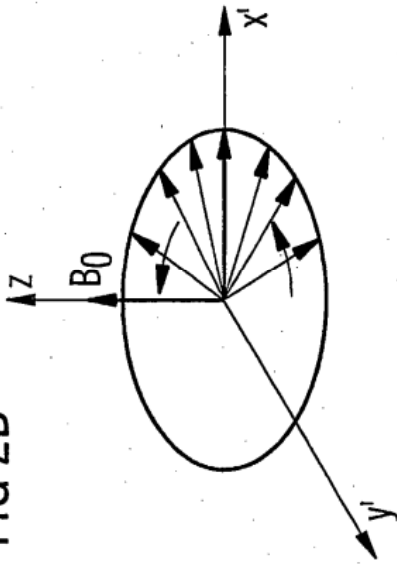


FIG 2C

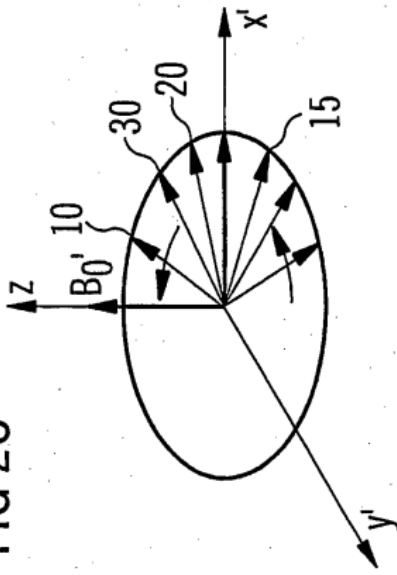


FIG 2D

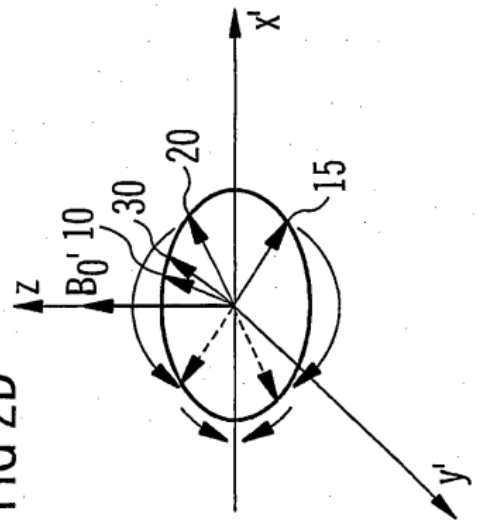


FIG 2E

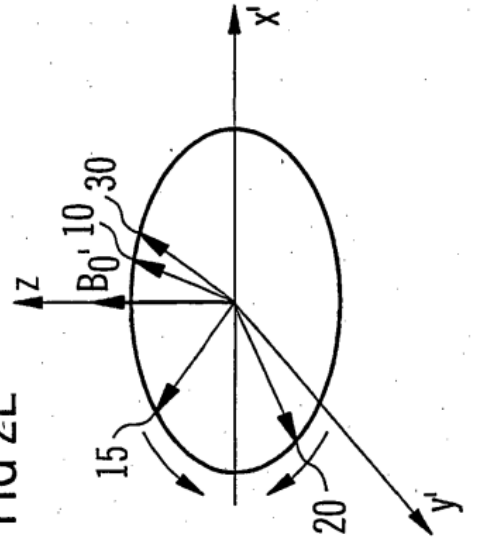


FIG 3

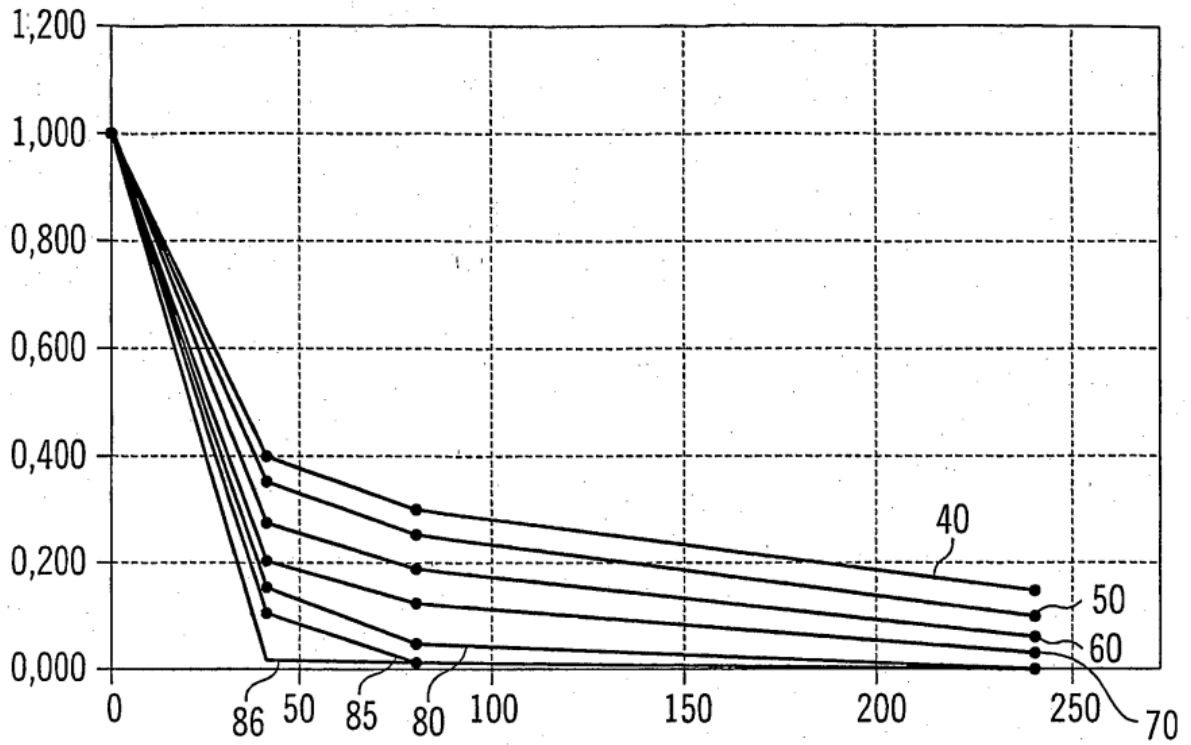


FIG 4

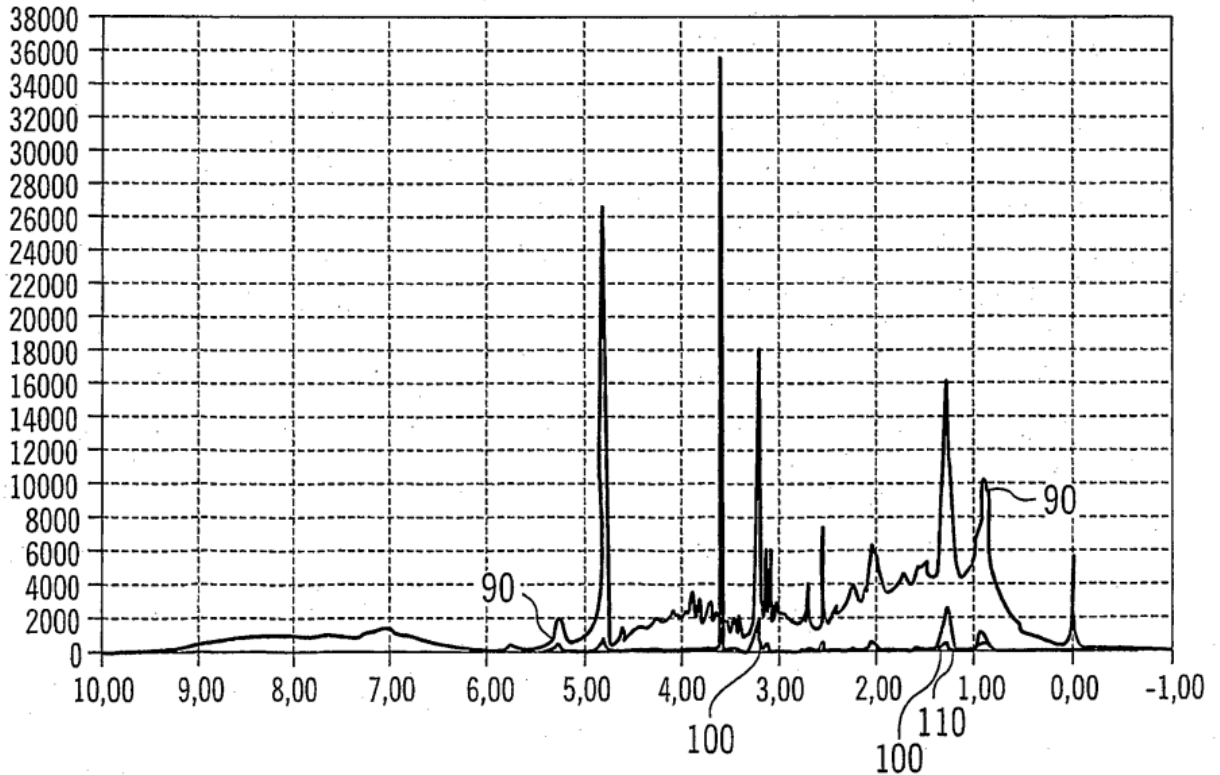


FIG 5

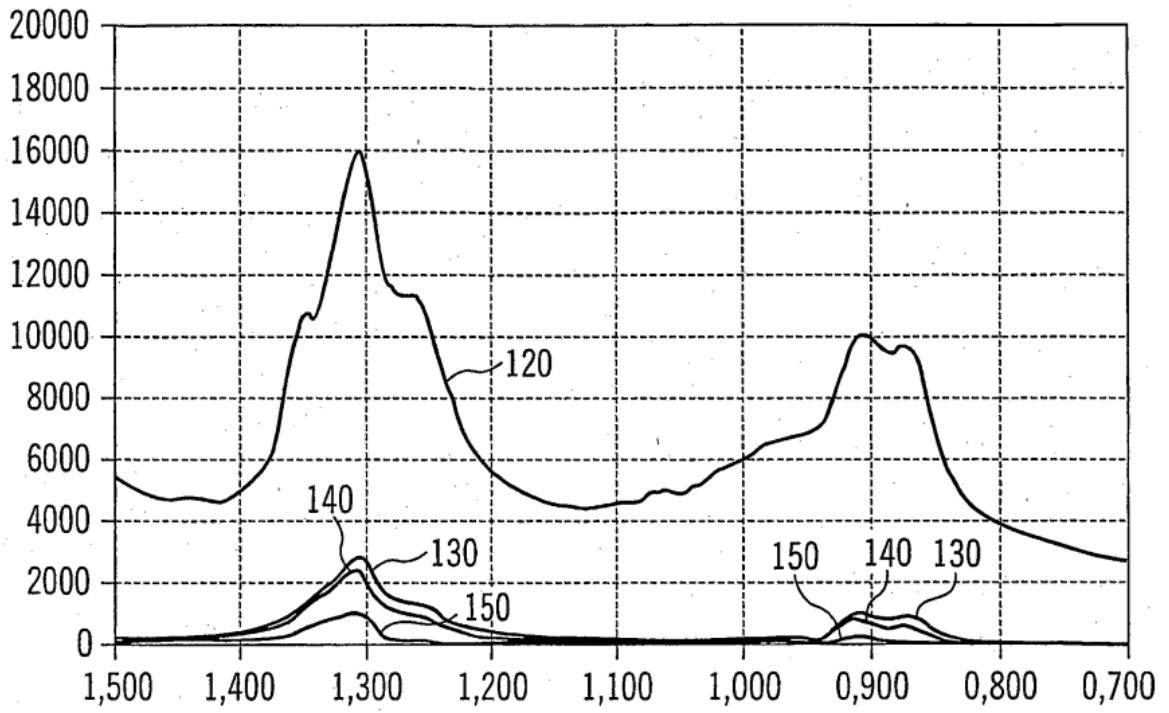


FIG 6

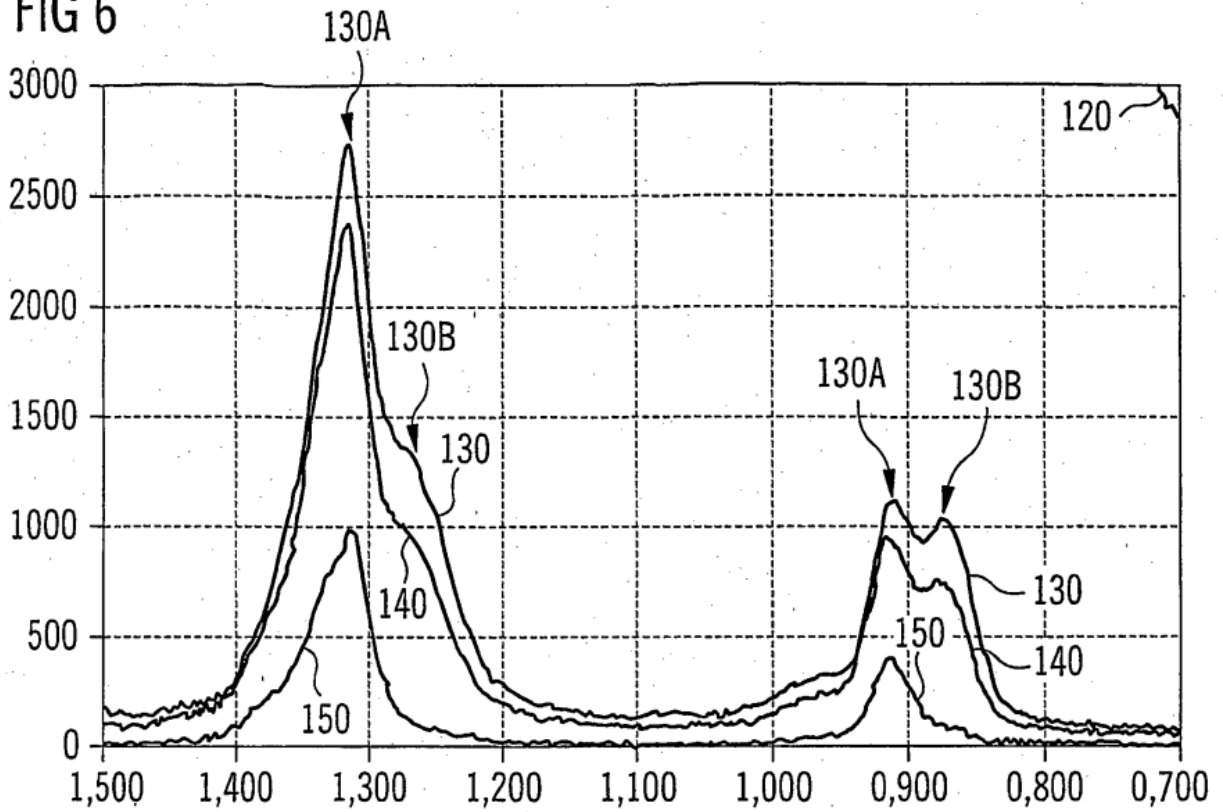


FIG 7

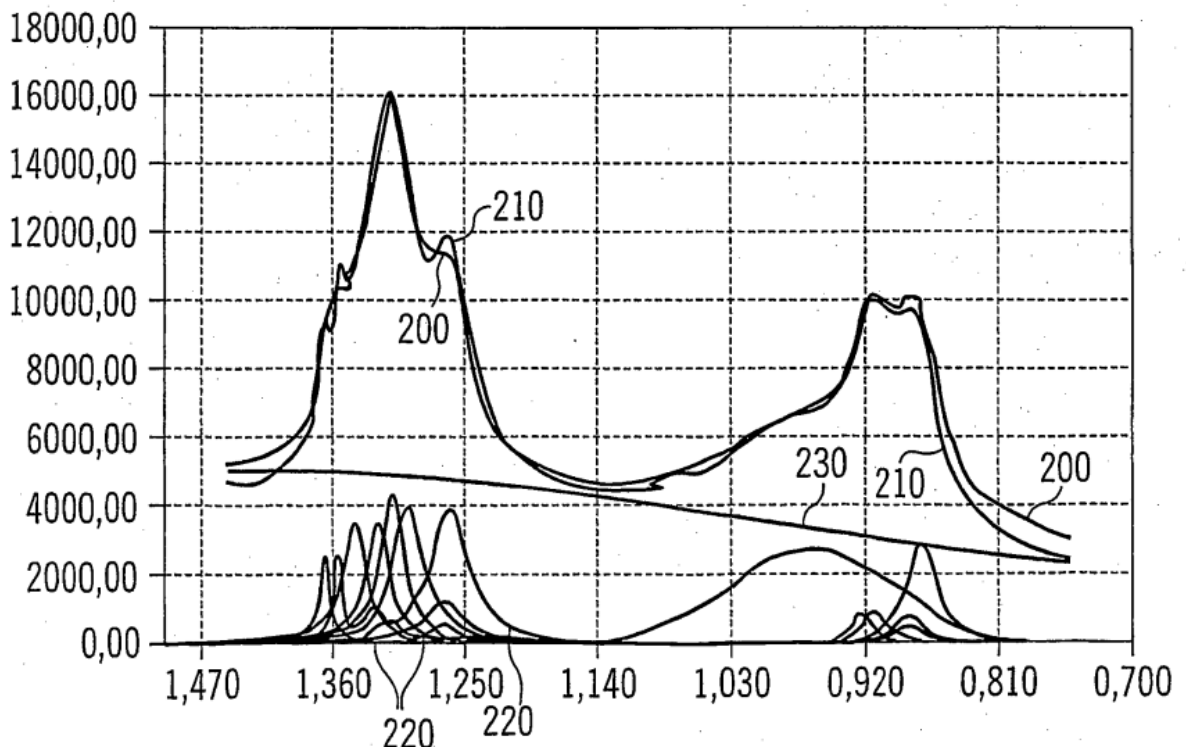


FIG 8

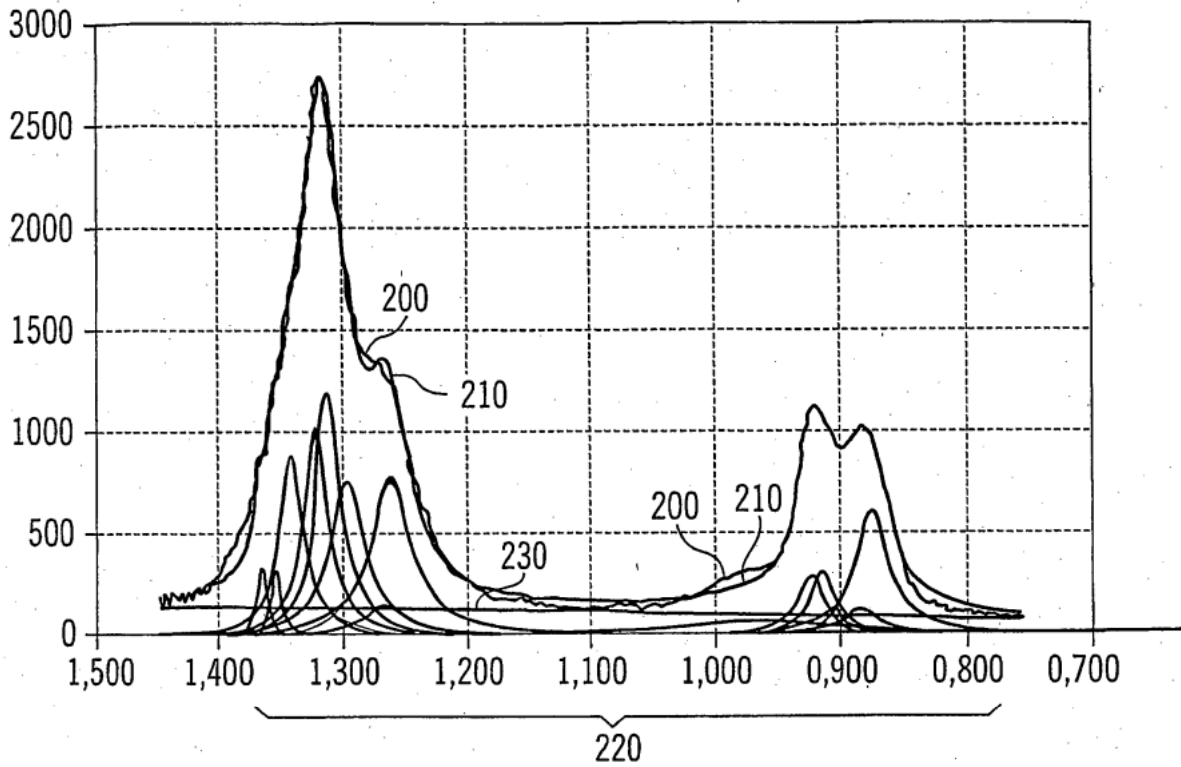


FIG 9

	LDL [A]	
	Metilo	Metileno
Patrón sin gradiente	1,000	1,150
Gradiente patrón [A]	0,200	0,230
Gradiente patrón [B]	0,120	0,138
Gradiente patrón [C]	0,030	0,035
Anchura de línea	0,017	0,017
Desplazamiento [ppm]	0,885	1,285
Prop. línea Lorentz	100%	100%
Prop. línea Gauss	0%	0%

FIG 10

Clases y subclases de lipoproteína	Concentración relativa	Despl. metilo	Despl. metileno	Tamaño [nm]		Densidad [g/ml]	
				min.	max.	max.	min.
Quilomicrón [C]	1,93	0,930	1,350	1000	10000	0,930	0,900
Quilomicrón [B]	40,80	0,920	1,340	500	1000	0,940	0,930
Quilomicrón [A]	37,34	0,910	1,320	100	500	0,960	0,940
Restos de quilom.	2,07	0,900	1,310	70	100	1,010	1,000
VLDL [C]	38,93	0,920	1,320	80	90	0,970	0,960
VLDL [B]	41,17	0,910	1,310	70	80	0,985	0,970
VLDL [A]	23,70	0,900	1,300	60	70	1,000	0,985
IDL	8,72	0,897	1,297	40	60	1,010	1,000
LDL [C]	26,34	0,895	1,295	32	40	1,020	1,010
LDL [B]	20,05	0,890	1,290	24	32	1,040	1,020
LDL [A]	18,96	0,885	1,285	16	24	1,060	1,040
LDL (densa peq.)	5,77	0,885	1,270	16	24	1,040	1,020
Lp(a)	4,53	0,880	1,265	16	30	1,100	1,050
HDL2	98,16	0,880	1,265	7	16	1,180	1,060
HDL3	153,59	0,870	1,260	4	7	1,240	1,180

Otros componentes	Concentración relativa	Despl. [A]	Despl. [B]	Tamaño [nm]		Densidad [g/ml]	
				min.	max.	max.	min.
LPDS 1	10194,54	1,380	-	0,1	4	0,95	1,1
LPDS 2	510,01	0,960	-	0,1	4	0,95	1,1
LPDS 3	0,00	0,000	-	0,1	4	0,95	1,1
Lactato	38,38	1,365	1,350	0,1	0,1	1	1
AG insaturado [A]	56,234	1,620	-	-	-	-	-
AG insaturado [B]	35,278	2,050	-	-	-	-	-