

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 323**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

G01R 33/465 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2014 PCT/EP2014/075873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15079000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2014 E 14805577 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3074775**

54 Título: **Método para la caracterización de lipoproteínas**

30 Prioridad:

27.11.2013 EP 13382478

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2018

73 Titular/es:

INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI (50.0%)

Escorxador, s/n

43003 Tarragona, ES y

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (50.0%)

72 Inventor/es:

MALLOL PARERA, ROGER;

AMIGÓ GRAU, NÚRIA;

CORREIG BLANCHAR, XAVIER;

MASANA MARÍN, LLUÍS;

RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, MIGUEL ÁNGEL;

HERAS IBÁÑEZ, MERCEDES;

PLANA GIL, NÚRIA y

RIBALTA VIVES, JOSEP

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 689 323 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

Método para la caracterización de lipoproteínas

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la caracterización de las lipoproteínas y es aplicable en el campo de la biomedicina.

10 **Estado de la técnica**

Los lípidos están principalmente presentes en la sangre en forma de lipoproteínas, que son partículas sintetizadas en el hígado y los intestinos que transportan el colesterol, los triglicéridos y otros lípidos a través del torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos. Los niveles anómalos de lípidos en la sangre pueden ser indicativos de enfermedades cardiovasculares. Para evaluar el riesgo cardiovascular, generalmente se utiliza un panel de lípidos estándar, que incluye la concentración de triglicéridos en plasma, colesterol total, el colesterol LDL y el colesterol HDL. Todos estos parámetros se miden experimentalmente salvo el colesterol LDL, que se calcula mediante la fórmula de Friedewald. Una limitación crítica de esta fórmula es su inexactitud bajo ciertas condiciones. Además, la medida de la cantidad de colesterol en las fracciones de lipoproteínas HDL y LDL no es suficiente para predecir el riesgo cardiovascular en todos los casos, ya que también el tamaño y número de partículas de lipoproteínas pueden ser relevantes para un correcto diagnóstico de enfermedades relacionadas con los lípidos. Por lo tanto, las partículas de lipoproteínas desempeñan un papel principal en las enfermedades cardiovasculares y en los trastornos metabólicos.

Las lipoproteínas se dividen en cinco partes principales en función de su tamaño y densidad: quilomicrones (Q; radios de 400-2500 Å), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; radios de 150-400 Å), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL; radios de 125-175 Å), lipoproteínas de baja densidad (LDL; radios de 90-140 Å) y lipoproteínas de alta densidad (HDL; radios de 25-60 Å). Estas fracciones principales se pueden dividir en diferentes subclases para obtener un perfil de lipoproteínas más detallado.

En general se acepta que la estructura de una partícula de lipoproteína es sustancialmente esférica y comprende un núcleo interno y una envoltura externa, en la que los lípidos no polares (triacilglicerolos y ésteres de colesterol) se encuentran dentro del núcleo, mientras que los lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) se distribuyen a través de una monocapa superficial (envoltura). Los componentes proteicos de las lipoproteínas (llamadas apolipoproteínas o apoproteínas) se localizan en la envoltura junto con los lípidos polares.

Los ensayos avanzados de lipoproteínas (ALT, del inglés *advanced lipoprotein testing*) se centran en proporcionar la información más detallada sobre las partículas de lipoproteínas. Entre las técnicas analíticas para el ensayo avanzado de lipoproteína que se usa actualmente se pueden citar las siguientes:

- 40 ▪ Ultracentrifugación en gradiente de densidad, que permite la medición de la distribución relativa de colesterol de diferentes subclases de lipoproteínas (K.R. Kulkarni et al., Quantification of cholesterol in all lipoprotein classes by the VAP-II method, *Journal of Lipid Research* 35 (1994) 159–168). Sin embargo, no contempla ni la concentración de triglicéridos, ni los números y tamaños de las partículas de lipoproteínas.
- 45 ▪ Electroforesis en gradiente de gel, que puede fraccionar subclases de LDL y HDL directamente a partir de plasma en función de su tamaño (G.R. Warnick et al., Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses, *Clinics in Laboratory Medicine* 26 (2006) 803). Este método requiere geles hechos a medida y la estricta atención al control de calidad de laboratorio dado que pequeñas variaciones en las condiciones de calidad del gel y de laboratorio pueden afectar a la precisión.
- 50 ▪ Cromatografía líquida de alto rendimiento mide el contenido de colesterol y triglicéridos, así como el tamaño de las principales lipoproteínas (M. Okazaki et al., Component analysis of HPLC profiles of unique lipoprotein subclass cholesterol for detection of coronary artery disease, *Clinical Chemistry* 52 (2006) 2049–2053).
- 55 ▪ El análisis de movilidad de iones se basa en las diferencias en la movilidad electroforética de las partículas de lipoproteínas en fase de gas y permite medir el tamaño y la concentración de algunas subclases de lipoproteínas (M.P. Caulfield et al., Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis, *Clinical Chemistry* 54 (2008) 1307–1316).
- 60 ▪ Espectroscopia ¹H-RMN para cuantificar subclases de lipoproteínas basado en sofisticadas técnicas de ajuste lineal (M. Ala-Korpela et al., ¹H NMR-based absolute quantification of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma, *Journal of Lipid Research* (1994) 2292-2304). Sin embargo, dichas técnicas requieren el uso de una biblioteca de espectros caracterizada previamente y tienen la desventaja de una amplia superposición de la señal de lipoproteínas en el análisis de los espectros de plasma.
- 65 ▪ RMN de difusión ordenada de fracciones de lipoproteínas, que utiliza el pico de metilo de las lipoproteínas aisladas para calcular el coeficiente de difusión de las lipoproteínas y estimar su tamaño a partir de este valor (R. Mallol et al., Particle size measurement of lipoprotein fractions using diffusion ordered NMR spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 2407–2415). Sin embargo, este método requiere un paso previo de la ultracentrifugación de la muestra con el fin de obtener las diferentes fracciones de lipoproteínas y

no se pueden utilizar directamente en un suero de la sangre o muestra de plasma sanguíneo.

Los métodos analíticos que separan físicamente las diferentes fracciones de lipoproteínas y subclases, tales como la ultracentrifugación, son laboriosos y lentos. Además, las muestras sufren un alto grado de manipulación y pueden permanecer a 4 °C durante días.

Además, los métodos de ALT aún no están listos para el uso clínico habitual, siendo algunas de sus limitaciones la ausencia de estandarización y las estrategias que varían. Por lo tanto, hay una necesidad de un método que permita la caracterización fiable de diferentes fracciones de lipoproteínas y subclases directamente a partir de un suero sanguíneo o de una muestra de plasma sanguíneo, usando un único análisis y sin el procesamiento o la destrucción de la muestra. Esto será útil para el desarrollo y el seguimiento de la dieta y de terapias farmacológicas y obtener conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares.

Mallol R., et al., Anal Bioanal Chem 2012; 402: 2407-2415 desvela la medición del tamaño de las partículas de fracciones de lipoproteína usando la espectroscopía de RMN de difusión ordenada.

Mallol R., et al., Progr. Nucl. Mag. Res. Spectr. 2012; 70: 1-2 desvela un análisis de lipoproteína de suero/plasma humano mediante RMN y su aplicación al estudio de dislipidemia diabética.

Stahlman M., et al., BBA – Mol. Cell Biol. Lipids. 2013; 1831: 1609-1617 desvela la asociación de dislipidemia con alteraciones marcadas en el lipidoma de HDL en sujetos con diabetes tipo 2 en la cohorte DIWA y el impacto sobre pequeñas partículas de HSL.

El documento WO 93/03450 A1 desvela un método y un aparato para analizar el plasma o el suero sanguíneo para determinar las concentraciones de sus constituyentes de lipoproteína, obteniendo el espectro de desplazamiento químico de RMN de una muestra.

El documento WO 2005043171 A1 desvela un método, un producto de programa informático y un aparato para determinar el riesgo de un sujeto de tener o desarrollar CHD usando un modelo matemático de concentración in vivo de partículas LDL.

El documento WO 2005119285 A1 desvela un proceso para la determinación de la distribución de la concentración y la distribución del tamaño de clases de lipoproteínas en fluidos corporales, por ejemplo, en la sangre. Para este fin, los espectros de RMN de una muestra a analizar se miden mediante intensidades del gradiente del campo magnético y temperaturas en diferentes condiciones.

Sumario de la invención

La presente invención supera los problemas anteriores mediante el aprovisionamiento de un método de acuerdo con la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones preferidas de la invención.

En la actualidad, el colesterol LDL y el HDL son dos factores para el riesgo cardiovascular que se usan habitualmente para evaluar el riesgo cardiovascular de un individuo. Sin embargo, un elevado porcentaje de individuos que padecen un episodio cardiovascular tienen niveles normales de colesterol LDL. Los pacientes con trastornos metabólicos tales como diabetes tienden a tener lipoproteínas LDL que son más pequeñas y de peor calidad en contenido de colesterol y más aterogénicas. Este tamaño más pequeño se asocia con un mayor número de partículas, dando como resultado una concentración de colesterol similar a la de un patrón con una concentración más pequeña de partículas más grandes y menos aterogénicas. Este es el motivo por el cual hay interés en determinar el tamaño y el número de partículas de lipoproteína LDL, más allá de su carga lipídica, para evaluar el riesgo cardiovascular de un paciente. Además, hay estudios que indican que el tamaño y el número de partículas HDL son mejores indicadores de riesgo cardiovascular que el colesterol HDL. La presente invención permite una caracterización exhaustiva de las partículas de lipoproteína, que proporcionan una manera rápida y fiable el tamaño y el número de partículas de las principales fracciones de lipoproteínas y subclases sin separación física de las diferentes fracciones de lipoproteínas y subclases en la muestra.

El método de acuerdo con la invención comprende los siguientes pasos:

- la obtención de un espectro ¹H RMN de difusión ordenada en 2D de una muestra;
- la realización de un ajuste de superficie de una porción del espectro correspondiente a la señal de metilo utilizando una pluralidad de funciones de modelo, correspondiéndose cada función de modelo con un tamaño de partícula dado asociado a una fracción de lipoproteínas y a la subclase e incluyendo al menos un parámetro de modelo a estimar durante el ajuste, siendo los parámetros estimados del modelo el conjunto de parámetros del modelo para el que se minimiza la diferencia entre la señal de RMN y la señal de modelo construido como una combinación lineal de las funciones de modelo,

en el que cada función de modelo es un triplete de funciones lorentzianas que tienen la forma:

$$\text{Triplete}_j = \text{Lorentziana}(h_{1j}, f_j - f_{0j}, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{2j}, f_j, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{3j}, f_j + f_{0j}, w_j, D_j),$$

donde h_{ij} (ua), f_j (ppm), w_j (ppm), y D_j (cm²s⁻¹) son las intensidades, desplazamiento químico, anchura, y coeficiente de difusión, respectivamente, asociados a un tamaño de partícula de lipoproteína j .

5 Las funciones lorentzianas laterales están igualmente espaciadas en el eje de desplazamiento químico en relación con la función central, es decir, en una cantidad f_0 .

10 Los parámetros del modelo que se determinarán para un tamaño de partícula de lipoproteína son uno o varios de: f, f_0, h_1, h_2, h_3, w y D .

Ventajosamente, el uso de tripletes de lorentzianas como modelo de función asociado a cada una de las lipoproteínas da como resultado un ajuste más preciso de la señal de RMN, en comparación con otros métodos.

15 La muestra es preferiblemente una muestra de plasma sanguíneo o una muestra de suero sanguíneo, pero puede utilizar también muestras de otros fluidos biológicos, tales como líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico.

20 Por lo tanto, la señal RMN del metilo se descompone como un número de funciones modelo, correspondiéndose cada función de modelo con un tamaño de partícula de lipoproteína. Cada función de modelo se asocia así con una fracción de lipoproteína dada y una subclase de acuerdo con su tamaño de partícula de lipoproteína. No todas las funciones de modelo incluidas en el ajuste contribuyen a la señal de modelo construida, ya que no todos los tamaños de partículas de lipoproteínas incluidos en el ajuste están necesariamente presentes en la muestra.

25 De acuerdo con el método de la invención, las lipoproteínas presentes en la muestra se identifican y se caracterizan determinando la intensidad, el desplazamiento químico, la anchura, y el coeficiente de difusión de las señales de lipoproteínas asociadas. Para una caracterización adicional de las lipoproteínas presentes en la muestra, parámetros de lipoproteínas adicionales se pueden determinar en las etapas posteriores basándose en las funciones del modelo y en los parámetros estimados del modelo.

30 Preferentemente, las funciones lorentzianas del triplete asociadas a cada tamaño de partícula de lipoproteína tienen la forma

$$\text{Lorentziana}_i(h_i, f_i, w_i, D_i) = \frac{h_i}{1 + \left(\frac{f-f_i}{w_i}\right)^2} e^{-k \cdot D_i \cdot G^2}$$

35 donde k es la constante de Boltzmann y G es la fuerza del gradiente aplicado (Gauss cm⁻¹). La primera parte del cociente de la lorentziana se corresponde con una lorentziana 1D, mientras que la parte exponencial incluye el efecto de atenuación por medio del gradiente de difusión. Esta forma preferida de las funciones lorentzianas es aplicable a cada realización de la invención.

40 En una realización preferida, el método comprende identificar las lipoproteínas presentes en la muestra como aquellas asociadas con las funciones del modelo que tienen una contribución distinta de cero para la señal del modelo teórico que es resultado del ajuste y la determinación de al menos uno y preferentemente todos de: tamaño promedio de las clases de partículas de lipoproteína, tamaño promedio de subclases de partículas de lipoproteína, concentración de clases y/o subclase de partículas de lipoproteína, concentración de lípidos de al menos una clase de partículas de lipoproteína, y/o concentración de lípidos de al menos una subclase de partículas de lipoproteína.

En una realización preferida, para la función del modelo asociada a cada tamaño de partícula de lipoproteína j , las intensidades de las funciones lorentzianas laterales se hacen proporcionales a la intensidad de la función lorentziana central:

$$50 \quad h_{1j} = \alpha_j \cdot h_{2j}, \text{ con } \frac{1}{4} \leq \alpha_j \leq \frac{3}{4}, \text{ y}$$

$$h_{3j} = \beta_j \cdot h_{2j}, \text{ con } \frac{1}{4} \leq \beta_j \leq \frac{3}{4}.$$

55 En una realización, el factor de proporcionalidad α_j es el mismo para todos los tamaños de partículas de lipoproteína y/o el factor de proporcionalidad β_j es el mismo para todos los tamaños de partículas de lipoproteína.

En una realización preferida, se toman las intensidades de las funciones lorentzianas laterales a ser igual, es decir $h_{1j} = h_{3j}$.

60 En una realización preferida,

$h_1 = \frac{h_2}{2}$, es decir, las intensidades de las funciones lorentzianas laterales son aproximadamente la mitad de la intensidad de la función lorentziana central, y/o

5 $f_0 = 0,01$ ppm, es decir, las funciones lorentzianas laterales están espaciadas aproximadamente 0,01ppm en el eje del desplazamiento químico en relación con la función lorentziana central.

En una realización preferida, el número de funciones de modelo utilizado es mayor que o igual a 9, correspondiéndose cada función de modelo con un tamaño de partícula de lipoproteína.

10 En una realización preferida, los tamaños de partículas de lipoproteínas utilizadas en el ajuste se definen basándose en los resultados experimentales obtenidos por ejemplo mediante RMN, HPLC, GGE, o Microscopio de Fuerza Atómica. Los tamaños de partículas de lipoproteínas utilizadas en el método se pueden seleccionar basándose en cualquier otra técnica.

15 Preferentemente, los tamaños de partículas de lipoproteínas que se corresponden con varias fracciones y/o subclases de lipoproteínas se utilizan en el método.

20 El ajuste de superficie se puede realizar tomando todos los parámetros del modelo como parámetros libres que se determinan durante el ajuste. Sin embargo, en una realización preferida, el ajuste de la superficie se lleva a cabo mediante la fijación de un número de parámetros del modelo y el uso de al menos un otro parámetro de modelo como un parámetro libre a determinar. Más preferentemente, al menos la intensidad del señal de la lorentziana central (h_2) se utiliza como un parámetro libre y al menos uno de desplazamiento químico, anchura, y coeficiente de difusión son fijos.

25 Cuando el número de parámetros del modelo a estimar en el ajuste de la superficie es alto, aparecen múltiples soluciones para el ajuste, muchas de ellas no tienen significado biológico. Ventajosamente, los parámetros de fijación mediante el establecimiento de relaciones entre pares de los parámetros del modelo permiten reducir la dimensionalidad del problema y evita la aparición de soluciones que no tienen relevancia biológica.

30 El desplazamiento de las funciones lorentzianas laterales con respecto a la función lorentziana central se puede estimar durante el ajuste de la superficie o se pueden tomar como un valor dado. Del mismo modo, las intensidades de las funciones lorentzianas laterales se pueden estimar durante el ajuste de la superficie o se pueden relacionar con la intensidad de la función central, preferentemente para que sea la mitad de la intensidad de la función lorentziana central.

35 En una realización preferida, los parámetros del modelo fijo utilizados en el ajuste de la superficie se determinan basándose en el tamaño de partícula de lipoproteína y en los modelos de regresión, relacionado los modelos de regresión con pares de parámetros de modelo fijo y/o un parámetro de modelo y el tamaño de partícula de lipoproteína.

40 En una realización preferida, los modelos de regresión utilizados para los parámetros fijos se obtienen de la deconvolución de la señal de metilo de una pluralidad de espectros de RMN utilizando una pluralidad de funciones lorentzianas modelo con la intensidad, desplazamiento químico, anchura, y coeficiente de difusión que son los parámetros del modelo libre estimados para reducir al mínimo la diferencia entre la señal de metilo de RMN y la señal del modelo construido como una combinación lineal de las funciones de modelo, relacionándose los modelos de regresión respectivamente con al menos (i) el desplazamiento químico y el tamaño de partícula de lipoproteína, y/o (ii) la anchura y el tamaño de partícula de lipoproteína.

50 En una realización preferida, los modelos de regresión que relacionan pares de parámetros del modelo se construyen de acuerdo a las siguientes etapas:

- la obtención del espectro ^1H NMR de difusión ordenada en 2D para una pluralidad de muestras;
- para cada muestra, la realización de un ajuste de superficie de una porción del espectro que se corresponde con la señal de metilo utilizando una pluralidad de funciones de modelo, siendo cada función de modelo dependiente de los parámetros del modelo a fijar, en donde todos los parámetros del modelo a fijar se estiman durante el ajuste de la superficie como el conjunto de parámetros del modelo para los que se minimiza la diferencia entre la señal de RMN y la señal de modelo construida como una combinación lineal de las funciones de modelo, y
- la utilización de los parámetros estimados del modelo en la etapa anterior para construir modelos de regresión que relacionan pares de parámetros del modelo.

60 Preferentemente, los modelos de regresión respectivamente relacionan al menos (i) el desplazamiento químico y el tamaño de partícula de lipoproteína, y/o (ii) la anchura y el tamaño de partícula de lipoproteína.

65 La pluralidad de muestras utilizadas para construir los modelos de regresión incluye diferentes perfiles de lípidos y el número de muestras consideradas es suficientemente alto como para ser estadísticamente significativo.

Preferiblemente, el número de muestras es igual o mayor que 100 e incluye muestras tomadas de sujetos sanos y muestras que se corresponden con los diferentes perfiles de dislipemia aterogénica. Más preferentemente, el número de muestras es igual a o mayor que 100 e incluye muestras tomadas de sujetos sanos y, un porcentaje de al menos el 9 % de las muestras que se corresponden con individuos que tienen un perfil de diabetes mellitus y al menos el 25 % de estos pacientes que tiene un perfil de dislipidemia aterogénica.

Preferentemente, las funciones del modelo utilizadas para construir los modelos de regresión son tripletes de funciones lorentzianas de la forma:

$$10 \quad \text{Triplete}_j = \text{Lorentziana}(h_{1j}, f_j - f_{0j}, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{2j}, f_j, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{3j}, f_j + f_{0j}, w_j, D_j),$$

En una realización preferida, $h_1 = h_3 = h_2/2$.

En una realización preferida, los tripletes de funciones lorentzianas utilizados para construir los modelos de regresión tienen la forma:

$$15 \quad \text{Triplete}_j = \text{Lorentziana}\left(\frac{h_j}{2}, f_j - 0.01 \cdot w_j, D_j\right) + \text{Lorentziana}(h_j, f_j, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}\left(\frac{h_j}{2}, f_j + 0.01 \cdot w_j, D_j\right)$$

Como alternativa, el desplazamiento (f_0) de las funciones lorentzianas laterales con respecto a la función de lorentziana central se puede determinar durante el ajuste realizado para construir los modelos de regresión. Se puede utilizar un único valor del desplazamiento (f_0) para todos los tamaños de lipoproteínas. Del mismo modo, las intensidades de las funciones lorentzianas laterales se pueden estimar durante el ajuste realizado para construir los modelos de regresión.

En una forma de realización preferida, el coeficiente de difusión de las funciones de modelo se estima a partir del tamaño de partícula de lipoproteína por medio de la ecuación de Einstein Stokes

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

siendo k ($J K^{-1}$) la constante de Boltzmann, T (K) la temperatura, η (Pa s) la viscosidad y R_H (Å) el tamaño de partícula de lipoproteína.

En una realización preferida, el método de la invención incluye, además, la corrección de los coeficientes de difusión estimados para tener en cuenta los efectos de dilución, usando una relación entre el área de RMN y el coeficiente de difusión obtenidos para varias diluciones de una muestra donde la suma de la concentración de colesterol total y triglicéridos de dicha muestra es superior a los 300 mg/dl. Ventajosamente, el uso de un coeficiente de difusión corregido para tener en cuenta los efectos de dilución da como resultado un ajuste de superficie más preciso.

En una realización preferida, el área de RMN asociada a una función de la lipoproteína se corrige para tener en cuenta solo la contribución de los lípidos incluidos en el núcleo de la partícula de lipoproteína.

En una realización preferida, el área de RMN corregida (A') se determina utilizando la siguiente expresión:

$$45 \quad A' = A \cdot \frac{(9 \cdot (R - s)^3)}{[(9 \cdot (R - s)^3) + 6 \cdot p \cdot (R^3 - (R - s)^3)]}$$

siendo A (ua) y R (Å) respectivamente el área y el tamaño de partícula de lipoproteína asociada a cada función modelo, siendo s (Å) el espesor de la envoltura de la partícula de lipoproteína y siendo p la proporción de masa de apoproteína por unidad de volumen (mg/ml) en la envoltura de la partícula con respecto a la masa total por unidad de volumen (mg/ml) en la envoltura de partículas (proteínas, colesterol libre y fosfolípidos). Las proteínas en la envoltura de las partículas de lipoproteínas son llamadas apolipoproteínas. La proporción p depende de la fracción de lipoproteína. Para HDL p es de aproximadamente 0,5. Para otras fracciones de lipoproteínas p es más pequeño. Generalmente, el espesor del núcleo de partícula de lipoproteína se estima como $s = 20 \pm 2$ Å.

Tal como se usa en el presente documento, el término "apolipoproteínas" o "apoproteínas", es decir proteínas de la envuelta de las partículas de lipoproteínas, se refieren a las proteínas que se unen a los lípidos para formar lipoproteínas y lípidos de transporte a través del sistema circulatorio. Las apolipoproteínas son moléculas anfipáticas que pueden rodear lípidos creando la partícula de lipoproteína que es en sí mismo soluble en agua y por lo tanto se pueden transportar a través de la circulación a base de agua (es decir, sangre). Hay seis clases de apolipoproteínas (A-H) y varias subclases, en particular, la Apo A-I (o Apo A1) es el principal componente proteico de las partículas de HDL en las que Apo A-II (o Apo A2) también está presente en una concentración menor. Los métodos ilustrativos, no limitantes para la determinación de la concentración de apolipoproteína incluyen, sin limitación, métodos colorimétricos, análisis por transferencia de Western o ELISA. Si la concentración de apolipoproteína se determina

en una fracción aislada de las lipoproteínas, se puede usar cualquier método bien conocido en la técnica para la determinación de las concentraciones de proteína como métodos enzimáticos, métodos colorimétricos (Biuret, Lowry, Bradford, etc) o técnicas inmunoquímicas (análisis por transferencia de Western, ELISA, etc.). Si la concentración de apolipoproteína se determina en una muestra de plasma o suero, se utilizan técnicas

5 inmunoquímicas con el fin de obtener una detección específica de las apolipoproteínas. Las técnicas inmunoquímicas ilustrativas, no limitantes para la detección de la apolipoproteína incluyen técnicas inmunturbidimétricas, técnicas inmunonefelométricas, inmunodifusión radial, ELISA, electroinmunoanálisis y radioinmunoanálisis.

10 La corrección de área es más importante cuando el tamaño de partícula de lipoproteína disminuye, es decir, la corrección es mayor para las partículas de HDL que para las LDL o VLDL, debido al menor tamaño de las partículas de HDL.

15 En una realización preferida, el método comprende adicionalmente determinar al menos un parámetro de lipoproteína seleccionado de: tamaño medio de partícula de fracciones de lipoproteínas, tamaño medio de partícula de subclases de lipoproteínas, la concentración de partículas de lipoproteína de la fracción, la concentración de partículas de lipoproteínas de subclase y concentración de lípidos de al menos una subclase de partículas de lipoproteína y/o la concentración de lípidos de al menos una fracción de partículas de lipoproteínas.

20 En una realización preferida, el tamaño medio de una fracción de partícula de lipoproteína se determina como:

$$\text{Tamaño } (\text{Å}) = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j},$$

25 siendo n el número de subclases de lipoproteínas de partículas incluido en la fracción de partículas de lipoproteínas, siendo R (Å) el tamaño de partícula de lipoproteína de y siendo PN_j el número de partículas de dicho tamaño de partícula de lipoproteína.

En una realización preferida, el número de partículas (PN) para una lipoproteína se determina como:

30 $PN_j \propto \frac{A_j}{R_j^3}$

con A (ua) y R (Å) siendo respectivamente la zona y tamaño de las partículas de lipoproteína asociada a una función de modelo j . A lo largo del documento, el tamaño de la partícula de lipoproteína se entiende como el radio de la partícula de lipoproteína en Angstroms. El número de partículas de lipoproteínas de un tamaño específico es

35 proporcional a la proporción del área asociada a la función del modelo correspondiente a dicha lipoproteína entre el volumen asociado a dicha lipoproteína, siendo el factor de proporcionalidad un parámetro de calibración del equipo utilizado. Preferentemente, en la determinación del número de partículas, el área asociada a una función de lipoproteína es el área A' corregida para considerar solo la contribución de los lípidos incluidos en el núcleo de la partícula de lipoproteína, de acuerdo con una realización de la invención.

40 El tamaño medio de una fracción de partícula de lipoproteína, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al tamaño medio del radio de las lipoproteínas que forman parte de una fracción de partículas de lipoproteína en particular.

45 En una realización preferida, la concentración de partículas de lipoproteínas de una fracción de partícula de lipoproteína se calcula dividiendo los volúmenes de lípidos entre los volúmenes de partículas de lipoproteínas. Los volúmenes de lípidos se determinan mediante el uso de factores de conversión comunes para convertir las unidades de concentración en unidades de volumen. Las concentraciones totales de partículas de lipoproteína de cada fracción de partícula de la lipoproteína principal se obtienen mediante la suma de las concentraciones de las

50 subclases de partículas de lipoproteínas correspondientes.

En una realización preferida, el método comprende la determinación de la concentración de lípidos de al menos una fracción de partículas de lipoproteínas y/o al menos una subclase de partículas de lipoproteínas. Más preferentemente, la determinación de la concentración de lípidos se realiza utilizando modelos de regresión. En una

55 realización preferida, los modelos de regresión se calibran con concentraciones de lípidos medidas en fracciones de lipoproteínas obtenidas por ultracentrifugación en las siguientes regiones: de 5,4 a 5,15 ppm, de 3,28 a 3,14 ppm, de 2,15 a 1,85 ppm, de 1,45 a 1 ppm y de 1 a 0,7 ppm. Se pueden usar otros métodos para la calibración, tales como ELISA, cromatografía, RMN o métodos enzimáticos.

60 La determinación de la concentración de lípidos de una fracción de partículas o subclase de lipoproteínas incluye la determinación de al menos uno de un lípido seleccionado de triglicéridos, ésteres de colesterol, colesterol libre y fosfolípidos.

Todas las características descritas en la presente memoria descriptiva (incluyendo las reivindicaciones, la descripción y los dibujos) y/o todas las etapas del método descrito se pueden combinar en cualquier combinación, con la excepción de combinaciones de tales características y/o etapas mutuamente exclusivas.

5 Breve descripción de los dibujos

Para comprender mejor la invención, sus objetos y ventajas, las siguientes figuras se adjuntan a la memoria descriptiva en las que se ha representado lo siguiente:

10 La Figura 1 muestra la deconvolución de una señal de metilo de acuerdo con el método de la invención, en donde las funciones del modelo utilizado en el ajuste se muestran en la figura 1A y las funciones del modelo agrupadas de acuerdo con sus fracciones de lipoproteínas se muestran en la figura 1B.

15 La Figura 2 muestra dos modelos de regresión, que relacionan, respectivamente, (a) el tamaño y el desplazamiento químico y (b) la anchura y el desplazamiento químico.

La Figura 3 muestra la relación entre el área de RMN de la señal de metilo y el coeficiente de difusión.

20 La Figura 4 muestra las regiones del espectro utilizado en una realización del método de la invención para calibrar los modelos de regresión para la determinación de lípidos.

La Figura 5 muestra la deconvolución de la señal de metilo de tres muestras.

25 Descripción detallada de la invención

En el método *in vitro* para la caracterización de partículas de lipoproteína de acuerdo con la invención, las muestras se analizan por espectroscopía de ¹H RMN de difusión ordenada en 2D.

30 Una vez se ha obtenido el espectro ¹H RMN de difusión ordenada en 2D, se lleva a cabo un ajuste de superficie de la parte del espectro correspondiente a la señal de metilo. Se utiliza una pluralidad de funciones de modelo, correspondiéndose cada función de modelo con una lipoproteína que tiene un tamaño específico de partícula de lipoproteína y que incluye una pluralidad de parámetros de modelo a estimar durante el ajuste. La función de modelo asociado a cada tamaño específico de partículas de lipoproteína es un triplete de funciones lorentzianas que tiene la forma:

$$35 \text{ Triplete} = \text{Lorentziana}(h_1, f - f_0, w, D) + \text{Lorentziana}(h_2, f, w, D) + \text{Lorentziana}(h_3, f + f_0, w, D).$$

en donde h (ua), f (ppm), w (ppm), y D (cm²s⁻¹) son los parámetros del modelo a determinar y que son, respectivamente, la intensidad, el desplazamiento químico, la anchura y el coeficiente de difusión asociados a una señal de la lipoproteína.

40 Los parámetros del modelo se estiman durante el ajuste como el conjunto de parámetros del modelo para el que se minimiza la diferencia entre la señal de RMN experimental y la señal del modelo construido como una combinación lineal de las funciones de modelo.

45 La Figura 1 muestra la parte de un espectro correspondiente a la señal de metilo de una muestra de suero para un solo gradiente de un experimento de ¹H RMN de difusión ordenada en 2D y su ajuste. En este caso, el ajuste para un solo gradiente se ha representado para una mayor claridad, incluso si un ajuste de superficie se lleva a cabo para una pluralidad de gradientes de difusión. La Figura 1A muestra en trazo fino una pluralidad de funciones de modelo usadas para ajustar un espectro de RMN experimental, que también se muestra en trazo grueso. La señal de modelo teórico construido a partir del ajuste con las funciones del modelo se representa en la línea de puntos. Cada función de modelo se puede asociar a una fracción de partículas de lipoproteína dada de acuerdo con su tamaño de partícula de lipoproteína. En la Figura 1B, las líneas finas se corresponden con la suma de las señales del modelo asociadas a cada fracción de lipoproteína correspondiente (en este ejemplo de VLDL, LDL, HDL).

50 En este ejemplo, el ajuste de la superficie se realiza fijando todos los parámetros (desplazamiento químico, anchura y coeficiente de difusión), excepto las intensidades de señal, en lugar de estimar todos los parámetros para cada triplete de funciones lorentzianas. La siguiente fórmula se utiliza para los tripletes de funciones lorentzianas:

$$60 \text{ Triplete} = \text{Lorentziana}\left(\frac{h}{2}, f - 0.01, w, D\right) + \text{Lorentziana}(h, f, w, D) + \text{Lorentziana}\left(\frac{h}{2}, f + 0.01, w, D\right),$$

estando desplazadas las dos señales alrededor de la señal central 0,01 ppm con respecto a la señal central.

65 Con el fin de fijar los desplazamientos químicos y las anchuras asociadas a cada función del modelo, inicialmente se deconvolucionaron 300 espectros usando tres tripletes de funciones lorentzianas con todos sus parámetros libres.

Una vez que se obtuvieron los conjuntos de parámetros que mejor se ajustan a los 300 espectros experimentales, se utilizaron para ajustar dos modelos de regresión para utilizarlos como indicadores de los parámetros fijos, un primer modelo de regresión que relaciona el desplazamiento químico y el tamaño (Figura 2a) y el segundo modelo de regresión que relaciona la anchura y el desplazamiento químico (Figura 2b). Las Figuras 2a y 2b muestran respectivamente el desplazamiento químico representado gráficamente como una función del tamaño y la anchura representada gráficamente como una función del desplazamiento químico para los parámetros estimados, a partir de los cuales se pueden determinar las correspondientes relaciones que relacionan ambos pares de parámetros. Por ello, a un tamaño fijo de una partícula de lipoproteína, se puede estimar su desplazamiento químico de RMN y la anchura se pueden estimar utilizando los modelos de regresión construidos.

Se puede construir un tercer modelo de regresión para relacionar el coeficiente de difusión con otro parámetro. Como alternativa, el coeficiente de difusión se puede obtener del tamaño de partícula de lipoproteína usando la ecuación de Einstein Stokes:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

Preferentemente, se seleccionan los tamaños de partículas de lipoproteínas basados en experimentos y que se corresponden con una serie de diferentes subclases de partículas de lipoproteínas, lo que permite lograr un perfil de lipoproteínas más completo y fiable.

Preferentemente, los coeficientes de difusión determinados se corrigen con el fin de tener en cuenta los posibles efectos de dilución. Para estudiar el grado de corrección necesario, en una realización preferida de la invención, se analiza una muestra de suero que tiene niveles elevados de triglicéridos (16 mmol/l) y diversas diluciones de la misma muestra (1:2, 1:4, 1:8 y 1: 16) son analizados (Figura 3). Entonces, la relación entre el área de RMN y el coeficiente de difusión se utiliza para predecir la corrección necesaria para cada señal de RMN:

$$D_0 = \frac{D}{1 - K_{S1} \cdot A - K_{S2} \cdot A}$$

donde D_0 es el coeficiente de difusión promedio en condiciones de dilución, D y A (ua) son el coeficiente de difusión promedio y el área total del pico de metilo, respectivamente, y K_{S1} , K_{S2} son los coeficientes de regresión.

Para determinar el coeficiente de difusión promedio, se obtiene una serie de espectros para cada muestra, obteniéndose cada espectro bajo una fuerza de gradiente diferente. El área bajo la curva de metilo representada gráficamente como una función del gradiente decae exponencialmente con gradientes en aumento. El coeficiente de difusión promedio es entonces proporcional a la pendiente de la recta obtenida cuando el logaritmo de la atenuación de la señal A/A_0 se representa frente al cuadrado del gradiente:

$$\log(A/A_0) = -kDG^2$$

donde A es el área de la señal de metilo, A_0 es el área de la señal de metilo con gradiente de cero, k es un parámetro constante y G es la fuerza de gradiente.

Con los tamaños de partículas de lipoproteínas seleccionados y el desplazamiento químico, la anchura y el coeficiente de difusión determinados para cada tamaño de partícula de lipoproteína, se determina la intensidad de la señal para cada función del modelo con el fin de minimizar la diferencia entre la señal de RMN experimental y la señal del modelo construido a partir de la pluralidad de señales del modelo considerado.

El ajuste se puede hacer mediante la minimización de la raíz normalizada del error cuadrado medio (NRMSE) usando la siguiente ecuación:

$$NRMSE (\%) = \frac{\sqrt{\frac{\sum (S_{exp} - S_{est})^2}{n \cdot m}}}{\max(S_{exp}) - \min(S_{exp})} \cdot 100$$

donde S_{exp} y S_{est} son las superficies experimentales y estimadas, respectivamente, n es el número de puntos de datos considerados y m el número de gradientes utilizados.

Una vez que se han determinado los parámetros del modelo, se pueden obtener los tamaños de lipoproteínas ponderados por partículas dividiendo el área de RMN asociada a cada función del modelo entre su volumen asociado:

$$PN_j \propto \frac{A_j}{R_j^3}$$

donde A_j , R_j^3 y PN_j son el área (ua), el volumen (\AA^3) y el número de partículas (ua/ \AA^3) de una partícula j de lipoproteína dada. El factor de proporcionalidad que relaciona el número de partículas con la proporción entre el área y el volumen se puede obtener fácilmente por los estándares de calibración conocidos, que relacionan de forma directa el área de RMN y la concentración de lípidos.

Después, se puede obtener un tamaño medio de partícula para cada fracción de partículas de lipoproteínas multiplicando los tamaños de partículas de lipoproteínas de RMN por su concentración parcial de partículas en relación con la concentración total de partículas de una fracción dada:

$$Z (\bar{A}) = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j}$$

donde Z se corresponde con el tamaño promedio de partícula de lipoproteína de una fracción de partícula de lipoproteína dada.

Se calibraron los modelos de regresión PLS para predecir la concentración de triglicéridos y de colesterol de las principales fracciones de partículas de lipoproteínas (VLDL, LDL, y HDL). Se utilizaron las regiones de 5,4 a 5,15 ppm, de 3,28 a 3,14 ppm, de 2,15 a 1,85 ppm, de 1,45 a 1 ppm y de 1 a 0,7 ppm (que se muestran en la Figura 4) como componente X y se utilizaron las concentraciones de colesterol y triglicéridos como componente Y. Ambos componentes se centraron en la media. El número óptimo de variables latentes (VL) y el rendimiento de la validación de los modelos PLS, se evaluaron mediante validación cruzada de ventana veneciana que divide los datos 10 veces. Los coeficientes de determinación entre las concentraciones predichas y de referencia variaron desde 0,79 hasta 0,98 en la etapa de calibración. Los coeficientes de determinación de la etapa de validación variaron desde 0,81 hasta 0,98.

La determinación de la concentración de lípidos de una fracción de partículas o de una subclase de lipoproteínas incluye la determinación de al menos uno de un lípido seleccionado entre triacilglicerol, ésteres de colesterol, colesterol libre y fosfolípidos.

Un triglicérido (o triacilglicerol) es un éster derivado a partir de glicerol y tres ácidos grasos que se puede encontrar en una partícula de lipoproteína. Los ácidos grasos ilustrativos, no limitantes que se pueden encontrar en los triglicéridos de las lipoproteínas son el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido araquidónico. Los triglicéridos son lípidos de la sangre que ayudan a permitir que la transferencia bidireccional de grasa adiposa y glucosa en la sangre desde el hígado. Los métodos ilustrativos, no limitantes para la determinación de la concentración de triglicéridos incluyen la determinación enzimática. La determinación enzimática de triglicéridos también es posible, ya que es específica y sensible. El principio de la reacción es tal como sigue: Los triglicéridos son hidrolizados mediante una lipasa en glicerol y ácidos grasos libres. En la presencia de glicerol cinasa, glicerol se fosforila a glicerol-3-fosfato, que después se oxida con una glicerol fosfato oxidasa con formación de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el 4-clorofenol y la 4-aminoantipirina con peróxido de hidrógeno producen un producto de color rojo, quinonimina. La intensidad de la tinción es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

El colesterol es un lípido anfipático. Un éster de colesterilo es un éster de colesterol en el que el enlace éster se forma entre el grupo carboxilato de un ácido graso y el grupo hidroxilo del colesterol. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de ésteres de colesterol presentes en una partícula de lipoproteína son colesterilpalmitato, estearato de colesterilo, colesteriloleato, colesterilinooleato y colesterilaraquidonato (Skipski, V.P. En: *Blood Lipids and Lipoproteins. Quantification, Composition and Metabolism*. pp. 471-483 (ed. G.J. Nelson, Wiley-Interscience, Nueva York) (1972)). Los ésteres de colesterilo tienen una menor solubilidad en agua que el colesterol y son más hidrófobos. Hay numerosos métodos disponibles para la determinación de la concentración de colesterol, por ejemplo, los métodos gravimétricos, nefelométricos, turbidimétricos, o fotométricos, entre otros. Se pueden usar los kits comercialmente disponibles para la determinación cuantitativa colorimétrica/fluorimétrica del colesterol y de ésteres de colesterilo. Por lo general, se determinan las concentraciones de colesterol total y libre (colesterol esterificado que se precipitaron previamente mediante, por ejemplo, digitonina), mientras que la concentración de ésteres de colesterol (colesterol esterificado) se calcula a partir de la diferencia entre estas dos concentraciones. La determinación enzimática de la concentración de colesterol es específica y sensible. El principio de la reacción es tal como sigue: La colesterol esterasa cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterilo a colesterol libre y ácidos grasos libres. En presencia de la colesterol oxidasa, el colesterol se oxida a δ -4-colestanotriol para formar peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el fenol y la 4-aminoantipirina con peróxido de hidrógeno produce un producto de color rojo, quinonimina. La intensidad de la tinción es directamente proporcional a la concentración de la muestra de colesterol total.

Los fosfolípidos son una clase de lípidos que están presentes en la envoltura de las partículas de lipoproteínas y que

son un componente principal de todas las membranas celulares, ya que pueden formar bicapas lipídicas. La mayoría de los fosfolípidos contienen un diglicérido, un grupo fosfato, y una molécula orgánica simple tal como colina. La estructura de la molécula de fosfolípido consiste generalmente en colas hidrófobas y una cabeza hidrófila. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de fosfolípidos presentes en una partícula de lipoproteína son fosfatidilcolina, esfingofosfolípidos tales como esfingomiélinea, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. Los métodos ilustrativos, no limitantes para la determinación de la concentración de fosfolípidos, incluyen kits de ensayo comercialmente disponibles para una determinación cuantitativa colorimétrica/fluorimétrica de fosfolípidos. El principio de la reacción es tal como sigue: los fosfolípidos (tales como lecitina, lisolecitina y esfingomiélinea) se hidrolizan enzimáticamente a colina que se determina usando colina oxidasa y un colorante específico de H₂O₂. La densidad óptica del producto de color rosa a 570 nm o la intensidad de fluorescencia (530/585 nm) es directamente proporcional a la concentración de fosfolípido en la muestra.

Ejemplo

15 Espectroscopia ¹H NMR de difusión ordenada en 2D (DOSY):

Las muestras de suero se analizaron mediante espectroscopia de RMN, que registra los espectros ¹H RMN en un espectrómetro BrukerAvance III a 310 K. Se usó el programa de pulso de eco doblemente estimulado (DSTE) con pulsos de gradientes bipolares y retraso de corriente eddy longitudinal (LED, del inglés *longitudinal eddy current delay*). El retraso de relajación fue de 2 s, los decaimientos de inducción libre se recogieron en 64K puntos de datos complejos y se adquirieron 32 barridos en cada muestra. La fuerza del pulso de gradiente se aumentó del 5 al 95 % de la fuerza máxima de 53,5 Gauss cm⁻¹ en 32 etapas, donde la fuerza del pulso del gradiente al cuadrado se distribuye de forma lineal.

25 Ajuste de la superficie:

En el presente ejemplo, se modelizaron las señales de RMN de las lipoproteínas como tripletes de funciones lorentzianas, con las dos señales alrededor de la señal central desplazadas 0,01 ppm:

$$30 \quad \underline{\text{Triplete} = \text{Lorentziana}\left(\frac{h}{2}, f - 0,01, w, D\right) + \text{Lorentziana}(h, f, w, D) + \text{Lorentziana}\left(\frac{h}{2}, f + 0,01, w, D\right)}$$

donde h (ua), f (ppm), w (ppm), y D (cm² s⁻¹) son la intensidad, el desplazamiento químico, la anchura y el coeficiente de difusión de la señal de la lipoproteína dada, correspondiéndose cada señal de la lipoproteína con un tamaño de partícula de lipoproteína. Se han usado 9 tamaños de partícula de lipoproteína y por consiguiente también 9 funciones modelo basadas en tamaños de partículas de lipoproteínas obtenidas por HPLC.

Las 9 funciones modelo se asociaron con una fracción de partículas de lipoproteína dada (VLDL, LDL o HDL) de acuerdo a su tamaño de RMN. Por lo tanto, las funciones F1-F3 se asociaron a las VLDL, las funciones F4-F6 a las LDL, y las funciones F7-F9 a las HDL (Tabla 1). Las fracciones de partículas de lipoproteína principales se definieron como VLDL (193-409 Å), LDL (74-133 Å) y HDL (30-55 Å).

El ajuste de la superficie de la señal de metilo se realizó usando 9 funciones de modelo con todos los parámetros fijos (desplazamiento químico, anchura y coeficiente de difusión), excepto la intensidad de la señal (h). El ajuste de cada muestra duró 29,47 ± 4,42 segundos en promedio. La señal de metilo se descompuso así en señales de lipoproteínas individuales para obtener la contribución de 9 lipoproteínas con un tamaño fijo de RMN. Las Figuras 5A-C muestran los resultados del ajuste de la superficie para tres sujetos, que también se resumen en la Tabla 1. Cabe señalar que incluso usando 9 funciones modelo para adaptarse a los espectros, no todas ellas se utilizan para encontrar la solución final. Las figuras 5D-F muestran la agrupación de las funciones del modelo de acuerdo con su fracción principal de partículas de lipoproteína asociada. El sujeto 1 muestra un área prominente de HDL (que se muestra en gris oscuro en la Figura 5D), el sujeto 2 tiene un elevado área de LDL (se muestra en gris claro en la Figura 5E), y el sujeto 3 se caracteriza por un área muy alta de VLDL (se muestra en la Figura 5F en gris medio).

La singularidad de las soluciones se estudió mediante el ajuste de cada muestra diez veces con valores iniciales elegidos aleatoriamente de las intensidades de señal. Debido a que el rango dinámico de la intensidad de señal puede ser muy alto, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el coeficiente de variación (CV) para cada función del modelo y de muestra a través de diez diferentes ajustes:

$$55 \quad \underline{CV = \frac{SD(h)}{Max(h) - Min(h)} \cdot 100 (\%)}$$

60 donde h representa la intensidad de la señal de una función modelo dada. Los valores del máximo (Max), mínimo (Min) y desviación estándar (SD) se evaluaron a partir de los diez ajustes en cada muestra. Como resultado, se obtuvieron soluciones únicas para todas las muestras después de 10 ajustes.

En este caso, el coeficiente de variación (CV) se determina mediante la intensidad de la señal de la lorentziana central, ya que los otros parámetros del modelo se han fijado durante el ajuste. La expresión anterior para el cálculo del coeficiente de variación se puede generalizar para el caso en el que se utiliza más de uno de los parámetros libres del modelo en el ajuste.

5 La raíz normalizada del error cuadrado medio (NRMSE) de los ajustes se calculó utilizando la siguiente ecuación

$$\text{NRMSE (\%)} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (S_{exp} - S_{est})^2}{n \cdot m}}}{\max(S_{exp}) - \min(S_{exp})} \cdot 100$$

10 donde S_{exp} y S_{est} son las superficies experimentales y estimadas, respectivamente, n es el número de puntos de datos considerados en la longitud del intervalo (0,7 a 1 ppm) y m el número de gradientes utilizados. En este ejemplo, n y m tenían el mismo valor para cada muestra. La NRMSE promedia obtenida fue de menos del 1,5 %.

Para obtener tamaños de lipoproteínas ponderados por partículas, primero se divide cada área de RMN entre su volumen asociado:

$$15 \quad PN_j \propto \frac{A_j}{R_j^3}$$

donde A_j , R_j^3 y PN_j son el área (ua), el volumen (\AA^3) y el número de partículas (ua/ \AA^3) de una partícula j de lipoproteína dada.

20 Luego, se obtuvo el tamaño medio de partícula para cada fracción de partículas de lipoproteínas multiplicando los tamaños de partículas de lipoproteínas por su concentración parcial de partículas en relación con la concentración total de partículas de una fracción de partícula dada:

$$25 \quad \text{Tamaño de VLDL (\AA)} = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j}, j = 1, \dots, 3$$

$$\text{Tamaño de LDL (\AA)} = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j}, j = 4, \dots, 6$$

$$30 \quad \text{Tamaño de HDL (\AA)} = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j}, j = 7, \dots, 9$$

35 Las concentraciones de partículas de cada subclase de partículas de lipoproteínas se calcularon dividiendo los volúmenes de lípidos entre los volúmenes de partículas. Los volúmenes de lípidos se determinaron mediante el uso de factores de conversión comunes para convertir las unidades de concentración en unidades de volumen. Las concentraciones totales de partículas de cada fracción principal de partículas se obtuvieron mediante la suma de las concentraciones de las correspondientes subclases de partículas.

40 La concentración lipídica se determinó utilizando modelos PLS calibrados en las regiones que se muestran en la Figura 4, a saber: de 5,4 a 5,15 ppm, de 3,28 a 3,14 ppm, de 2,15 a 1,85 ppm, de 1,45 a 1 ppm y de 1 a 0,7 ppm. Los lípidos de referencia se obtuvieron mediante ultracentrifugación secuencial y se corresponden con el colesterol y los triglicéridos por tres fracciones de partículas de lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL).

45 El método de la invención permite obtener un perfil avanzado de las lipoproteínas, tal como se muestra en la Tabla 1. Los informes de ALT para tres sujetos representativos de todo el grupo se resumen en la Tabla 1 con fines ilustrativos. El sujeto 1 era normolipidémico, el sujeto 2 presentaba altos niveles de colesterol LDL (hipercolesterolemia) y el sujeto 3 presentaba altos niveles de triglicéridos y bajos niveles de colesterol HDL (dislipidemia aterogénica). El método de la invención proporciona el colesterol total (C), los triglicéridos (TG) y la concentración de partículas (P) para las principales fracciones de lipoproteínas y sus subclases. Además, el método de la invención proporciona el tamaño de las principales fracciones de lipoproteína. El sujeto 1 mostró niveles de lípidos normales (definidos como VLDL-TG < 150 mg/dl, LDL-C < 160 mg/dl, y HDL-C > 40 mg/dL), el sujeto 2
50 mostró niveles elevados de VLDL-TG y niveles normales de HDL-C y de LDL-C y el sujeto 3 mostró niveles elevados de VLDL-TG, niveles reducidos de HDL-C y niveles normales de LDL-C. También hay que señalar que el sujeto 3 tenía un elevado LDL-P pesar de los niveles normales de LDL-C y que su concentración pequeña de LDL-P fue mayor que en el sujeto 2. Por lo tanto, los sujetos con elevados niveles de triglicéridos se asocian con elevados valores de LDL-P porque un aumento en la concentración de triglicéridos lleva a la formación de mayores
55 concentraciones de partículas de LDL más pequeñas.

Los ensayos avanzados en lipoproteínas han demostrado asociaciones estadísticas entre estos parámetros de

lipoproteínas y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Sniderman, A., y P. O. Kwoiterovich. 2013. Update on the detection and treatment of atherogenic low-density lipoproteins. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 20: 140-147). Por ejemplo, en un estudio, el número de partículas de HDL (HDL-P), pero no las concentraciones de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C), se asociaban de manera independiente con el espesor de la íntima-media de la carótida, tras ajustar las covariables (Mackey, R. H., P. Greenland, D. C. Goff, Jr., D. Lloyd-Jones, C. T. Sibley y S. Mora. 2012. High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). J Am CollCardiol 60: 508-516). Por último, el uso de subclases de partículas de lipoproteína mejoró la estratificación del riesgo que deriva de la RMN para la aterosclerosis subclínica en comparación con las medidas de lípidos convencionales en los modelos de predicción con factores de riesgo de la puntuación de riesgo de Framingham (Wurtz, P., J. R. Raiko, C. G. Magnussen, P. Soininen, A. J. Kangas, T. Tynkkynen, R. Thomson, R. Laatikainen, M. J. Savolainen, J. Laurikka, P. Kuukasjarvi, M. Tarkka, P. J. Karhunen, A. Jula, J. S. Viikari, M. Kahonen, T. Lehtimaki, M. Juonala, M. Ala-Korpela, y O. T. Raitakari. 2012. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. European Heart Journal 33: 2307-2316).

Tabla 1. Resumen de los parámetros de lipoproteína obtenidos usando el método de la invención

		Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3
Lípidos (mg/dl)	VLDL-TG	13,7	22,6	150,3
	LDL-C	105,4	161,8	127,0
	LDL-TG	14,9	20,9	18,4
	HDL-C	66,5	49,5	34,4
	HDL-TG	7,1	6,6	11,0
Concentración de partículas*	VLDL-P	12,4	22,0	106,3
	LargeVLDL-P	0,2	0,3	5,9
	Medium VLDL-P	1,0	1,9	21,6
	Small VLDL-P	11,1	19,7	78,8
	LDL-P	980,6	1399,1	1230,4
	LargeLDL-P	80,0	184,3	23,7
	Medium LDL-P	212,4	406,8	310,5
	Small LDL-P	688,2	808,0	896,1
	HDL-P	32,2	27,1	25,9
	LargeHDL-P	2,4	1,3	0,3
	Medium HDL-P	10,0	6,8	3,6
	Small HDL-P	19,8	19,0	22,0
Tamaño (nm)	VLDL	39,0	38,9	42,2
	LDL	19,7	20,1	19,5
	HDL	8,2	8,0	7,8

*VLDL/LDL: nmol/l; HDL: μ mol/l

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la caracterización de las lipoproteínas en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 5
- obtener un espectro ^1H NMR de difusión ordenada en 2D de la muestra;
 - realizar un ajuste de superficie de una porción del espectro que se corresponde con la señal de metilo utilizando una pluralidad de funciones del modelo, correspondiéndose cada función del modelo con tamaño de partícula dado asociado a una fracción y a una subclase de lipoproteínas e incluyendo al menos un parámetro del modelo a estimar durante el ajuste, siendo los parámetros estimados del modelo el conjunto de parámetros del modelo para el que se minimiza la diferencia entre la señal de RMN y la señal del modelo construido como una combinación lineal de las funciones del modelo, e
 - identificar las lipoproteínas presentes en la muestra como las asociadas a las funciones del modelo que contribuyen a la señal del modelo teórico que es resultado del ajuste, en donde cada función del modelo es un triplete de funciones lorentzianas que tienen la forma:

$$\text{Triplete} = \text{Lorentziana}(h_1, f - f_0, w, D) + \text{Lorentziana}(h_2, f, w, D) + \text{Lorentziana}(h_3, f + f_0, w, D),$$

20 donde h (ua), f (ppm), w (ppm), y D (cm^2s^{-1}) son, respectivamente, la intensidad, el desplazamiento químico, la anchura, y el coeficiente de difusión asociado a un tamaño de partícula de lipoproteína y en el que los parámetros del modelo a determinar para cada tamaño de partícula de lipoproteína son uno o varios de: f, f_0, h_1, h_2, h_3, w y D , en donde para cada función del modelo:

$$h_1 = \alpha \cdot h_2, \text{ con } \frac{1}{4} \leq \alpha \leq \frac{3}{4}, \text{ y}$$

$$h_3 = \beta \cdot h_2, \text{ con } \frac{1}{4} \leq \beta \leq \frac{3}{4}.$$

en donde el ajuste de superficie se realiza fijando al menos un parámetro del modelo y usando al menos otro parámetro del modelo como un parámetro libre a determinar en el ajuste de superficie,

30 en donde los parámetros del modelo fijado se determinan basándose en el tamaño de la partícula de lipoproteína y en los modelos de regresión, relacionando los modelos de regresión los pares de parámetros fijados del modelo y/o un parámetro del modelo y el tamaño de la partícula de lipoproteína y que se construye de acuerdo con las siguientes etapas:

- 35
- obtener un espectro ^1H RMN de difusión ordenada en 2D para una pluralidad de muestras,
 - para cada muestra, realizar un ajuste de superficie de una porción del espectro que se corresponde con la señal de metilo usando una pluralidad de funciones del modelo, siendo cada función del modelo dependiente de los parámetros del modelo a fijar, en donde todos los parámetros del modelo a fijar se estiman durante el ajuste de superficie como el conjunto de parámetros del modelo para los que se minimiza la diferencia entre la señal de RMN y la señal del modelo construido como una combinación lineal de las funciones del modelo, y
 - usar los parámetros del modelo estimados en la etapa anterior para construir modelos de regresión que relacionan pares de parámetros del modelo y/o un parámetro del modelo y el tamaño de la partícula de lipoproteína.

45 2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los tripletes de funciones lorentzianas tienen la forma:

$$\text{Triplete} = \text{Lorentziana}(h_1, f - f_0, w, D) + \text{Lorentziana}(h_2, f, w, D) + \text{Lorentziana}(h_3, f + f_0, w, D)$$

50 3. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

$$h_1 = \frac{h_2}{2}, \text{ y/o}$$

$$f_0 = 0.01\text{ppm}.$$

55 4. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los tamaños de las partículas de lipoproteínas se definen basándose en experimentos de RMN, HPLC, Electroforesis en Gradiente de Gel o Microscopio de Fuerza Atómica.

60 5. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos uno de los desplazamientos químicos, anchura y coeficiente de difusión se fija y al menos la intensidad de señal de la lorentziana central (h_2) se usa como un parámetro libre.

6. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que las funciones del modelo usadas para construir los modelos de regresión son tripletes de funciones lorentzianas de la forma:

$$\text{Triplet}_j = \text{Lorentziana}(h_{1j}, f_j - f_{0j}, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{2j}, f_j, w_j, D_j) + \text{Lorentziana}(h_{3j}, f_j + f_{0j}, w_j, D_j).$$

7. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pluralidad de muestras usadas para construir los modelos de regresión comprende al menos 100 muestras y un porcentaje de al menos el 9 % de las muestras se corresponde con individuos que tienen un perfil de diabetes mellitus y al menos el 25 % de estos pacientes tiene un perfil de dislipidemia aterogénica.

8. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el coeficiente de difusión de las funciones de modelo se estima a partir del tamaño de partícula de lipoproteína por medio de la ecuación de Einstein Stokes

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

con k (J K⁻¹) siendo la constante de Boltzmann, T (K) la temperatura, η (Pa s) la viscosidad y R_H (Å) el tamaño de partícula de lipoproteína.

9. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el método además incluyendo la corrección de los coeficientes de difusión estimados para tener en cuenta los efectos de dilución, basándose en una relación entre el área de RMN y el coeficiente de difusión obtenidos para varias diluciones de una muestra en donde la suma de la concentración de colesterol y triglicéridos total de dicha muestra es mayor que 300 mg/dl.

10. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar uno o más de: tamaño medio de fracciones de partículas de lipoproteínas, tamaño medio de partícula de lipoproteína, tamaño medio de subclases de partículas de lipoproteína, concentración de fracción y/o de subclases de partículas de las lipoproteínas, concentración de lípidos de al menos una partícula de lipoproteína y/o concentración de lípidos de al menos una subclase de partículas de lipoproteína.

11. El método *in vitro* según la reivindicación 10, en el que el tamaño medio de partícula de una fracción de partícula de lipoproteína se determina como:

$$\text{Tamaño (Å)} = \frac{\sum_{j=1}^n R_j \cdot PN_j}{\sum_{j=1}^n PN_j},$$

siendo n el número de subclases de lipoproteínas de partículas incluido en la fracción de partículas de lipoproteína, siendo R (Å) el tamaño de partícula de lipoproteína y siendo PN_j siendo el número de partículas de dicho tamaño de partícula de lipoproteína, en el que el número de partículas (PN) para una lipoproteína j se determina como:

$$PN_j \propto \frac{A_j}{R_j^2}$$

con A (ua) siendo el área asociada a cada función de modelo.

12. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el área asociada a una función del modelo de lipoproteína se corrige para tener en cuenta solo la contribución de los lípidos incluidos en el núcleo de la partícula de lipoproteína.

13. El método *in vitro* según la reivindicación 12, en el que el área corregida (A') se determina utilizando la siguiente expresión:

$$A' = A \cdot \frac{(9 \cdot (R - s)^2)}{[(9 \cdot (R - s)^2) + 6 \cdot p \cdot (R^2 - (R - s)^2)]}$$

con A (ua) y R (Å) siendo respectivamente el área y el tamaño de partícula de lipoproteína asociada a cada función del modelo, siendo s (Å) el grosor de la envoltura de la partícula de lipoproteína y siendo p la proporción de masa de la proteína en la envoltura de la partícula con respecto a la masa total en la envoltura de la partícula.

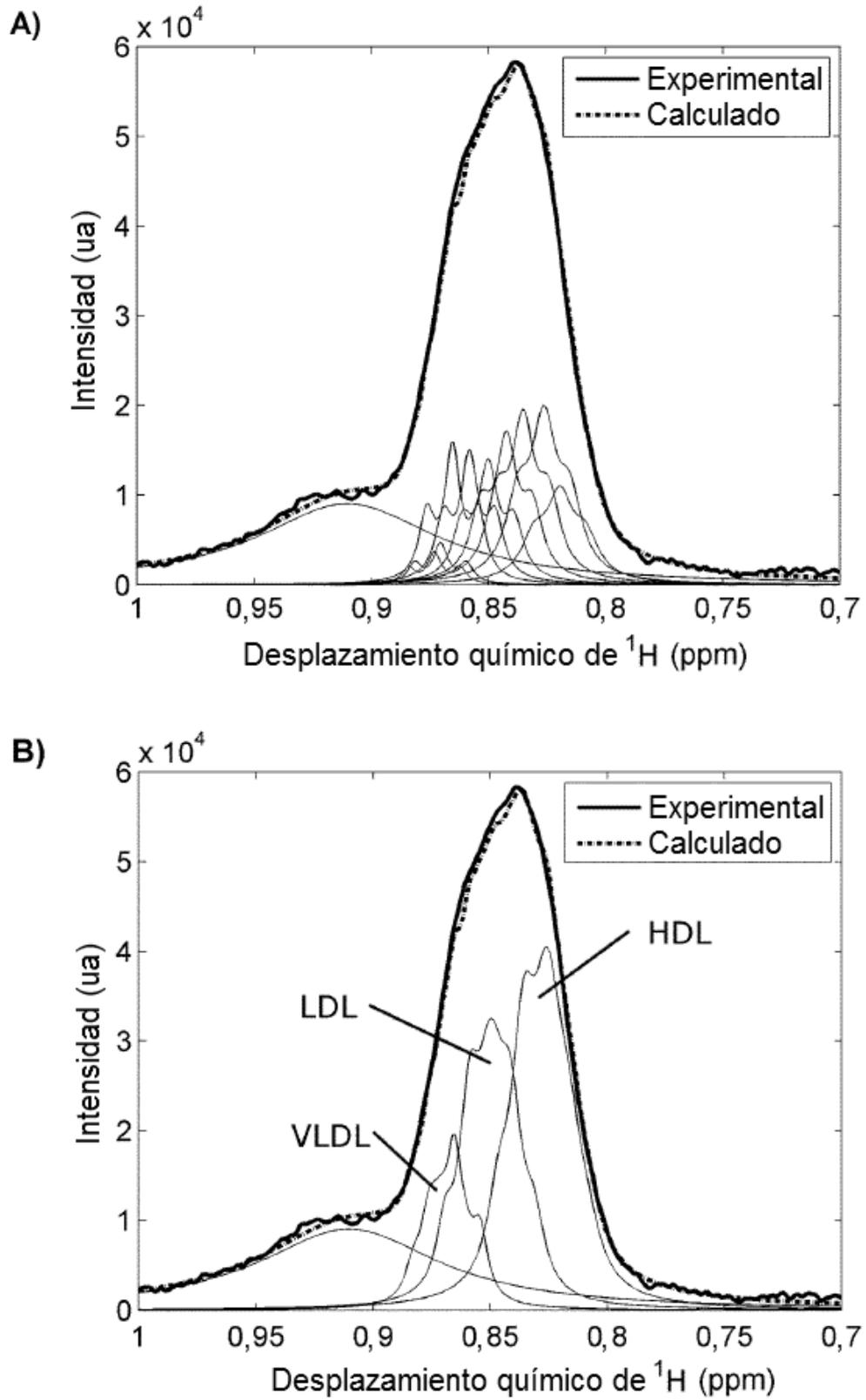


FIG. 1

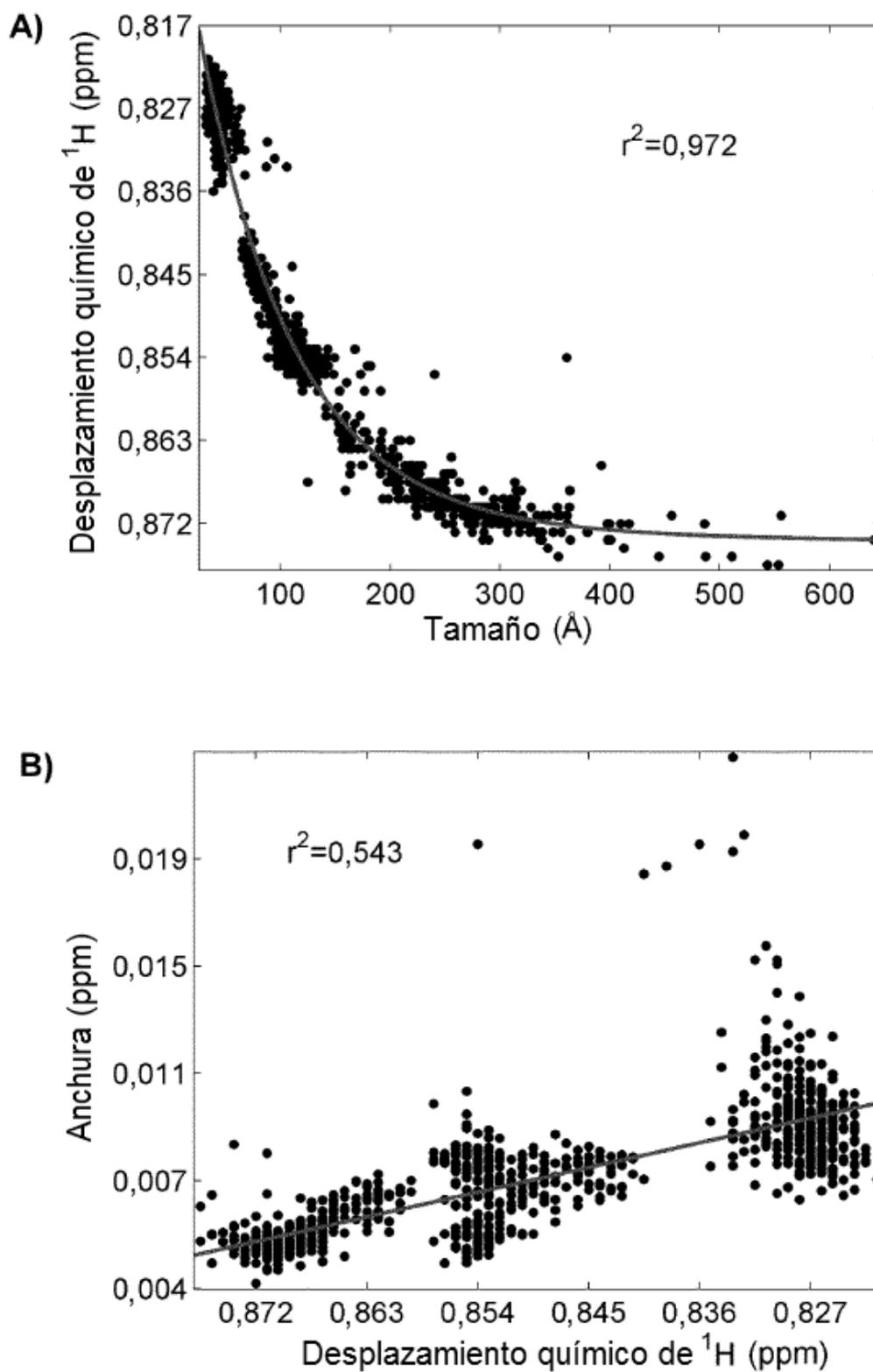


FIG. 2

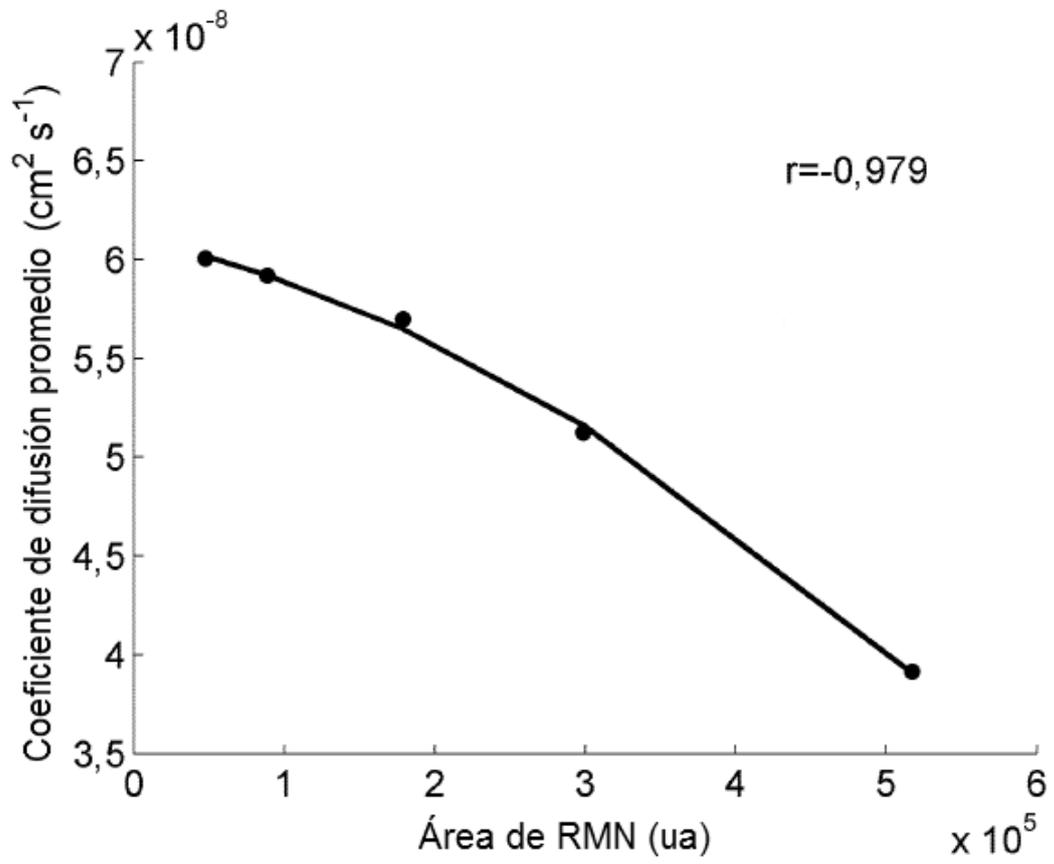


FIG. 3

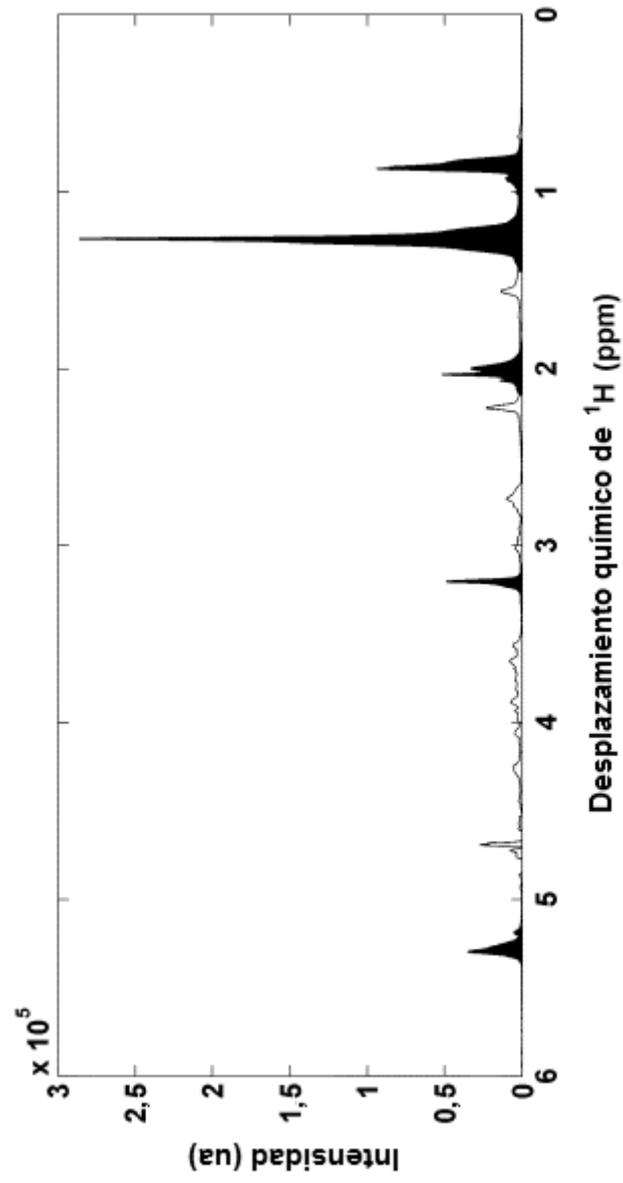


FIG. 4

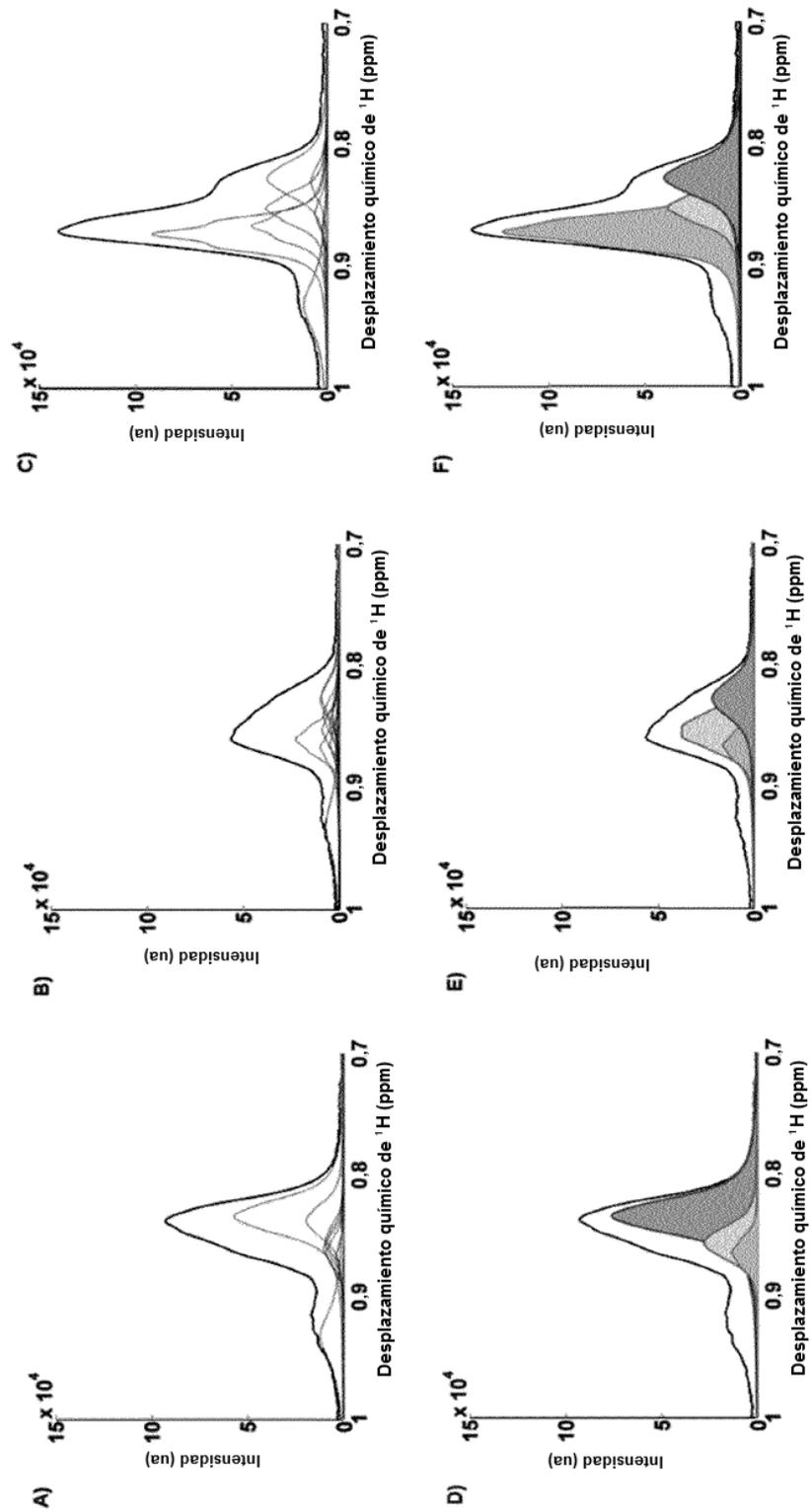


FIG. 5