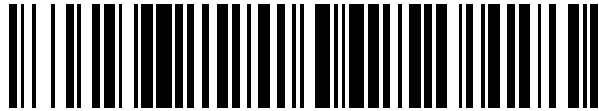


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 794**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/28** (2006.01)  
**C12Q 1/44** (2006.01)  
**C12Q 1/60** (2006.01)  
**C12Q 1/61** (2006.01)  
**G01N 33/49** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/92** (2006.01)  
**C12Q 1/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/US2013/074211**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093399**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13863036 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2929046**

54 Título: **Ensayos rápidos, con bajo volumen de muestra, para colesterol y triglicéridos**

30 Prioridad:

**10.12.2012 US 201261735424 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.11.2019**

73 Titular/es:

**THERANOS IP COMPANY, LLC (100.0%)  
7333 Gateway Boulevard  
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

**MATJE, DOUGLAS;  
PATEL, PAUL;  
HOLMES, ELIZABETH A. y  
GIBBONS, IAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 729 794 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

Ensayos rápidos, con bajo volumen de muestra, para colesterol y triglicéridos

**Antecedentes**

5 Los lípidos, y en particular el colesterol, desempeñan un papel vital en la salud y las enfermedades humanas. El colesterol es un nutriente esencial y un componente crítico de membranas lipídicas que forman las fronteras que rodean las células y orgánulos celulares.

10 Sin embargo, el exceso de colesterol es muy peligroso, ya que puede acumularse como "placas" en los vasos sanguíneos y puede provocar trombosis, apoplejía y otras consecuencias potencialmente letales en los seres humanos. Para mitigar estos riesgos los lípidos, especialmente el colesterol, se encuentran empaquetados en lipoproteínas para su transporte a través del organismo, en el seno de la sangre.

15 Se conocen varias formas heterogéneas de lipoproteínas que contienen colesterol (C) y triglicéridos (TG), entre ellas, por ejemplo, quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad (LMBD, siglas en inglés VLDL), lipoproteína de baja densidad (LBD, siglas en inglés LDL) y lipoproteína de alta densidad (LAD, siglas en inglés HDL). Al contenido de colesterol de estas lipoproteínas se le denomina respectivamente colesterol de LMBD (C-LMBD), colesterol de LBD (C-LBD) y colesterol de LAD (C-LAD).

Rutinariamente se realizan mediciones, o valores derivados, del contenido de colesterol de LMBD, de LBD, de LAD y del contenido de colesterol total (CT) del plasma o suero sanguíneo con el fin de evaluar el riesgo de aterosclerosis y los efectos beneficiosos de los fármacos "que reducen el colesterol", tales como las estatinas.

20 En métodos de la técnica anterior, la centrifugación de muestras de sangre proporciona fracciones distinguibles de LMBD, LBD y LAD en suero o plasma sanguíneo; estas fracciones forman bandas distintas que se mueven a diferente velocidad bajo la fuerza centrífuga debido a su distinta densidad. También se pueden separar lipoproteínas por precipitación mediante el uso de precipitación diferencial utilizando reactivos tales como sulfatos de dextrano, sulfatos de ciclodextrina y cationes. Por ejemplo, se pueden precipitar por completo la LMBD y la LBD, mientras que se deja toda la LAD en solución. Una vez eliminadas las LMBD y LBD por centrifugación o filtración, el colesterol restante está asociado solamente con la fracción LAD. Se pueden emplear otros métodos de la técnica anterior para estimar C-LAD y C-LBD que utilizan enzimas que han sido modificadas, por ejemplo, uniendo covalentemente cadenas de polietilenglicol (PEG). Se cree que el PEG restringe la actividad de la enzima a fracciones lipoproteicas específicas. Estos métodos de la técnica anterior también pueden utilizar reactivos específicos que solubilizan o protegen selectivamente fracciones lipoproteicas específicas, de manera que en un ensayo solamente se precipita o puede reaccionar con la química del ensayo una única fracción lipoproteica.

30 Para que estas mediciones del contenido de colesterol sean válidas resulta esencial que sean muy precisas y exactas (error inferior a 5%), ya que pequeñas diferencias son clínicamente significativas. Los medios convencionales para medir las subfracciones de colesterol implican varios ensayos independientes (típicamente al menos tres, para CT, C-LBD y C-LAD) y/o medir tres analitos (CT, TG, C-LAD) más un valor calculado para C-LBD utilizando la fórmula de Friedewald:

$$C-LAD \approx CT - C-LBD - k \times TG$$

35 donde "TG" es el nivel de triglicérido, "x" indica multiplicación y "k" vale 0,2 para cantidades medidas en mg/dL (k vale alrededor de 0,45 si las cantidades se miden en mmol/L).

La fórmula de Friedewald se puede expresar de manera equivalente en términos de C-LBD de la siguiente manera:

40 
$$C-LBD \approx CT - C-LAD - k \times TG$$

donde, nuevamente, "TG" es el nivel de triglicérido, "x" indica multiplicación y "k" vale 0,2 para cantidades medidas en mg/dL (k vale alrededor de 0,45 si las cantidades se miden en mmol/L).

45 Tienen importancia crítica los niveles relativos de las subformas de colesterol lipoproteico: por ejemplo, la relación de C-LAD con respecto a CT (C-LAD/CT), la relación de C-LBD con respecto a CT (C-LBD/CT) o la relación de C-LMBD con respecto a CT (C-LMBD/CT). Los niveles de las subformas de colesterol lipoproteico se miden típicamente por separado o mediante métodos de separación física caros y complicados, tales como centrifugación o electroforesis. Dado que estos niveles se miden convencionalmente en varios ensayos independientes, cada uno con sus propias fuentes de error, el error acumulativo en las proporciones calculadas de las subfracciones de colesterol será mayor que el deseado para el diagnóstico y control eficaz de la terapia. Además, los costes del análisis de las subfracciones de colesterol lipoproteico aumentan debido a la necesidad de varios ensayos.

50 Los documentos EP 0230786 y US 4495293 describen reactivos para uso en ensayos. El documento EP 1577398 describe un método para medir LBD y colesterol total en una muestra.

## Compendio

- La presente invención proporciona un método para medir al menos dos componentes lipoproteicos en una muestra de sangre procedente de un sujeto, en donde dichos al menos dos componentes lipoproteicos se seleccionan de colesterol total (CT), colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LBD) y colesterol de lipoproteína de alta densidad (C-LAD), comprendiendo dicho método:
- 5 combinar al menos una parte de dicha muestra de sangre con un primer reactivo para proporcionar una primera solución combinada, en donde dicho primer reactivo comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón;
- 10 en donde el interactuante con lipoproteína comprende un polisacárido cargado negativamente y un catión divalente, o una sal del mismo, en una proporción entre 0,001 y 0,1 y en donde dicho interactuante con lipoproteína está presente a un nivel de concentración que origina la conversión de colesterol de LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LBD en un producto coloreado medible y a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LMBD en un producto coloreado medible
- 15 añadir a dicha primera solución combinada un segundo reactivo para proporcionar una segunda solución combinada, en donde dicho segundo reactivo comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante, en donde a dicho momento de adición de dicho segundo reactivo a dicha primera solución combinada se le denomina momento inicial; y
- 20 medir la absorbancia lumínica de dicha segunda solución combinada dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y después de un tercer tiempo, en donde dichos períodos de tiempo y dicho tercer tiempo se pueden determinar con respecto a dicho momento inicial, y
- medir las cantidades de lipoproteína de al menos dos componentes lipoproteicos en la muestra de sangre a partir de dichas mediciones de absorbancia,
- con lo que se miden al menos dos componentes lipoproteicos en una muestra de sangre procedente de un sujeto.
- 25 Los solicitantes han encontrado que se pueden obtener valores muy precisos y exactos para CT, C-LBD y C-LAD en un único ensayo para colesterol lipoproteico empleando mediciones cinéticas, sin necesidad de precipitación de lipoproteínas y sin pasos de separación. Ensayos descritos en la presente memoria utilizan una lipasa (p. ej., una colesterol esterasa), una oxidasa (p. ej., una colesterol oxidasa) y una peroxidasa para formar un producto coloreado. Ensayos descritos en la presente memoria pueden utilizar una lipasa (p. ej., una colesterol esterasa), una deshidrogenasa (p. ej., una colesterol deshidrogenasa) y nicotinadeninucleótido para formar un producto que absorbe luz (p. ej., NADH) u otro producto detectable. Tales productos pueden ser medibles mediante espectrofotometría. En los ensayos descritos en la presente memoria, la cantidad de producto formado a partir de todas las especies lipoproteicas que contienen colesterol es directamente proporcional a la cantidad de colesterol convertido. Los ensayos, métodos, reactivos y kits descritos en la presente memoria son útiles para ensayos rápidos, eficaces y baratos de colesterol lipoproteico y de subfracciones de colesterol lipoproteico, y proporcionan ventajosamente mediciones de colesterol lipoproteico y de subfracciones de colesterol lipoproteico en un único ensayo. Ensayos descritos en la presente memoria proporcionan ventajosamente mediciones de colesterol lipoproteico y de subfracciones de colesterol lipoproteico sin necesidad de precipitación de lipoproteína. Ensayos descritos en la presente memoria proporcionan ventajosamente mediciones de colesterol lipoproteico y de subfracciones de colesterol lipoproteico sin necesidad de centrifugación ni de electroforesis.
- 30
- 35
- 40
- Los solicitantes han encontrado que es posible proporcionar condiciones de ensayo (p. ej., reactivos, protocolo y temperatura) tales que la cinética de las reacciones que convierten C-LAD, C-LBD y C-LMBD en producto coloreado discorra a velocidades significativamente distintas, permitiendo a la vez la reacción esencialmente completa de todas las especies lipoproteicas (p. ej., LAD, LBD y LMBD) al final del ensayo. Por ejemplo, en ensayos descritos en la presente memoria el curso temporal para C-LAD tiene una semivida estimada inferior a un minuto, mientras que la conversión de C-LBD tiene una fase de retraso y una forma general sigmoide centrada en aproximadamente tres minutos. En ensayos descritos en la presente memoria, el colesterol lipoproteico restante (quilomicrones y C-LMBD) reacciona incluso más lentamente (semivida de aproximadamente cinco minutos o más). Estas diferencias en la semivida y en la cinética de reacción entre distintas especies de colesterol permiten desagregar una señal de ensayo en lo atribuible a cada especie utilizando un algoritmo simple aunque, por ejemplo, durante determinados momentos del ensayo esté generando señal más de una especie. Por consiguiente, las formulaciones de reactivo para uso en los ensayos y métodos descritos en la presente memoria están diseñadas para lograr la diferenciación cinética de las especies lipoproteicas LAD, LBD y LMBD en un único ensayo. Los novedosos métodos y ensayos descritos en la presente memoria hacen uso del sorprendente hallazgo de los solicitantes de que, en estos ensayos,
- 45
- 50
- 55 las subespecies de colesterol se convierten a distinta velocidad en el producto medido. Por consiguiente, el C-LAD se convierte muy rápidamente en producto, mientras que el C-LBD se convierte en producto más lentamente de lo que el C-LAD se convierte en producto, y el C-LMBD y el colesterol quilomicrónico se convierten aún más lentamente. La conversión completa del colesterol total en producto es incluso más lenta que la conversión del

C-LAD o el C-LBD en producto. Tales diferencias en las velocidades de conversión en producto permiten realizar la medición del colesterol de diferentes especies lipoproteicas en una única solución a distintos tiempos, disminuyendo así el número de pasos requeridos para tales mediciones, reduciendo posibles errores y simplificando los procedimientos.

5 Por consiguiente, los solicitantes describen en la presente memoria métodos para determinar C-LAD, C-LBD y CT en una única muestra, o parte de una muestra, de sangre. Estos métodos permiten determinar C-LAD, C-LBD y CT en una única muestra, o parte de una muestra, de sangre sin precipitación sustancial de lipoproteína, p. ej. sin precipitación sustancial de LAD o LBD en la muestra, o parte de una muestra, de sangre durante la determinación. Según se describe en la presente memoria, se puede medir la cantidad de C-LAD en una muestra de sangre sin precipitación sustancial de lipoproteína mediante la determinación colorimétrica de la cantidad de peróxido formado en un primer período de tiempo después de la combinación de reactivos que permiten la oxidación de colesterol liberado desde lipoproteínas de la muestra. El primer período de tiempo puede ser, por ejemplo, un período de tiempo que sea inferior a unos 3 minutos, y en algunos casos puede ser un período de tiempo de aproximadamente 2 minutos. Según se describe en la presente memoria, se puede medir la cantidad de C-LBD en una muestra de sangre sin precipitación sustancial de lipoproteína mediante la determinación colorimétrica de la cantidad de peróxido formado en un segundo período de tiempo después de la combinación de reactivos que permiten la oxidación de colesterol liberado desde lipoproteínas de la muestra. En ciertos casos, la cantidad de C-LBD en una muestra de sangre se puede medir por la diferencia entre determinaciones colorimétricas realizadas al comienzo de dicho segundo período de tiempo y determinaciones colorimétricas realizadas al final de dicho segundo período de tiempo. El segundo período de tiempo puede ser, por ejemplo, un período de tiempo que se sitúe entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 6 minutos después de la combinación de reactivos que permiten la oxidación de colesterol liberado desde lipoproteínas de la muestra. Según se describe en la presente memoria, se puede medir la cantidad de CT en una muestra de sangre sin precipitación sustancial de lipoproteína mediante la determinación colorimétrica de la cantidad de peróxido formado después de la combinación de reactivos que permiten la oxidación de colesterol liberado desde lipoproteínas de la muestra. Esta medición (p. ej., determinación colorimétrica) de CT se puede realizar en un momento al comienzo de un tercer período de tiempo o en cualquier momento particular durante el mismo. El tercer período de tiempo comprende un período de tiempo después de dicho segundo período de tiempo, y puede ser, por ejemplo, un período de tiempo que comience aproximadamente 6 minutos después de la combinación de reactivos que permiten la oxidación de colesterol liberado desde lipoproteínas de la muestra. Con miras a la consistencia de la medición entre muestras distintas, cuando se miden muestras distintas en determinaciones diferentes, la determinación colorimétrica para cada muestra distinta se puede realizar en el mismo momento después del comienzo de dicho tercer período de tiempo para cada muestra.

Por consiguiente, se pueden realizar mediciones de C-LAD, C-LBD y CT en una única muestra, o en una única parte de una muestra, de sangre procedente de un sujeto. En ciertos casos, según se describe en la presente memoria, las mediciones de C-LAD, C-LBD y CT se pueden realizar secuencialmente en una única muestra, o en una única parte de una muestra, de sangre procedente de un sujeto. Por ejemplo, a partir de estas mediciones se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre procedente de un sujeto mediante la relación  $C-LMBD = CT - (C-LAD + C-LBD)$ , o mediante otras relaciones. En ciertos casos, a partir de estas mediciones se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre procedente de un sujeto, por ejemplo mediante una relación de la forma  $C-LMBD = \alpha CT + \beta C-LAD + \gamma C-LBD + \lambda$ , donde  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD y C-LBD, respectivamente; y donde  $\lambda$  es una constante aditiva que suma a la suma de todos los demás factores, respectivamente. En más casos adicionales se puede calcular a partir de otras relaciones el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre procedente de un sujeto, utilizando algunos o todos los valores medidos de CT, C-LAD y C-LBD, y constantes multiplicativas y aditivas, de forma similar a las relaciones antes indicadas.

Por tanto, los solicitantes describen en la presente memoria novedosas y útiles mediciones de C-LAD, C-LBD y CT, y cálculo de C-LMBD, que se pueden realizar sobre una única muestra de sangre, o parte de muestra de sangre, reduciendo la cantidad de sangre requerida para dichas mediciones, reduciendo la complejidad de los métodos requeridos para medir estas distintas fracciones lipoproteicas en la sangre y proporcionando mediciones exactas y rápidas de lipoproteína en sangre. Estas mediciones se pueden realizar sin precipitación sustancial de lipoproteínas en la muestra.

Los solicitantes también describen en la presente memoria métodos para determinar niveles de triglicérido en muestras de sangre, donde el nivel (o de manera equivalente: cantidad) de triglicérido (TG) se puede determinar mediante métodos en los cuales se pone en contacto una muestra de sangre con una lipasa, una cinasa y una oxidasa para liberar glicerol del TG de la muestra de sangre, para fosforilar el glicerol y luego proporcionar peróxido de hidrógeno. En presencia de una peroxidasa, el peróxido de hidrógeno forma un colorante, cuya medición proporciona una determinación del nivel de TG en la muestra de sangre.

Los solicitantes describen en la presente memoria novedosas y útiles mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG que proporcionan mediciones exactas y rápidas de lipoproteína en sangre. Las mediciones de C-LAD, C-LBD y CT se pueden realizar sobre una muestra o parte de muestra de sangre, mientras que las mediciones de TG se pueden realizar sobre una muestra, o parte de muestra de sangre, distinta. Estas mediciones se pueden realizar sin precipitación sustancial de lipoproteína en las muestras. Juntas, estas mediciones de cuatro componentes lipídicos

de la sangre se realizan sobre solamente dos muestras, o dos partes de una muestra o muestras, de sangre procedente de un sujeto. Los solicitantes describen en la presente memoria métodos adicionales y mejorados para calcular C-LMBD en la sangre de un sujeto, utilizando mediciones de C-LAD, CT y TG o utilizando mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG. En ciertos casos se puede calcular C-LMBD a partir de mediciones de C-LAD, CT y TG, o de mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG, donde estas mediciones se realizan conforme a los métodos descritos en la presente memoria. En ciertos casos, a partir de estas mediciones se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto, por ejemplo mediante una relación de la forma  $C-LMBD = \alpha CT + \beta C-LAD + \gamma C-LBD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$ , donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, C-LBD, TG y  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , respectivamente; y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente. En realizaciones adicionales, a partir de estas mediciones se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra de sangre de un sujeto, por ejemplo mediante una relación de la forma  $C-LMBD = \alpha CT + \beta C-LAD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$ , donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, TG y  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , respectivamente; y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente. En más realizaciones adicionales se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto a partir de otras relaciones, utilizando algunos o todos los valores medidos de CT, TG, C-LAD y C-LBD y constantes multiplicativas y aditivas de forma similar a las relaciones proporcionadas más arriba.

En ciertos casos, formulaciones de reactivos para uso en los ensayos y métodos descritos en la presente memoria están diseñados para lograr la diferenciación cinética descrita en lo que antecede sin precipitación de lipoproteínas. En reactivos y ensayos descritos en la presente memoria, la formación de complejos de lipoproteínas con cationes (opcionalmente cationes divalentes tales como magnesio, calcio, manganeso, cobalto, cadmio u otros cationes) y un polisacárido cargado negativamente (tal como, por ejemplo, un éster de dextrano tal como sulfato de dextrano, un éster de ciclodextrina tal como sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, heparina u otro polisacárido cargado negativamente) se logra en condiciones en las que no se produce precipitación de lipoproteínas. Por ejemplo, en ciertos casos se logra la formación de complejos de lipoproteína con iones de magnesio y sulfato de dextrano en condiciones en las que se produce poca o ninguna precipitación de lipoproteínas. En reactivos y ensayos descritos en la presente memoria pueden estar incluidos compuestos anfífilos, tales como tensioactivos. Por ejemplo, diversos tensioactivos son adecuados para su uso con el fin de mantener solubles las lipoproteínas. En ciertos casos, los reactivos proporcionan ingredientes que consiguen modificar las superficies de partículas de lipoproteína LBD y LMBD de tal manera que restringen, pero no impiden, el acceso (por ejemplo, de colesterol esterasas y/u oxidasas) a colesterol de LBD y de LMBD y ésteres de colesterol. El uso de reactivos y métodos adecuados para dicha modificación de las superficies de partículas de LBD y LMBD permite enlentecer la formación de producto coloreado a partir de estas especies lipoproteicas, en comparación con la velocidad de formación de producto coloreado en ensayos similares realizados sin los interactuantes y tensioactivos, o con dichos agentes en concentraciones y proporciones relativas distintas a las que se encuentran en los ensayos y reactivos descritos en la presente memoria. El enlentecimiento de la formación de producto coloreado a partir de especies lipoproteicas puede ser útil para proporcionar una separación de cinéticas de reacción que permita medir el contenido de colesterol de distintas fracciones lipoproteicas a distintos tiempos, sin necesidad de separación física de las distintas fracciones lipoproteicas (por ejemplo, sin necesidad de centrifugación o electroforesis).

Por consiguiente, los solicitantes describen en la presente memoria un primer reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total (CT), colesterol de LBD (C-LBD) y colesterol de LAD (C-LAD) en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas sanguíneas, que comprende un agente de solubilización de lipoproteína y un interactuante con lipoproteína. En ciertos casos, un primer reactivo puede comprender un tampón. En ciertos casos, un agente de solubilización de lipoproteína para uso en un primer reactivo como se describe en la presente memoria puede comprender un tensioactivo. Un interactuante con lipoproteína puede comprender, por ejemplo, una ciclodextrina, un dextrano o ambos. En ciertos casos, un interactuante con lipoproteína para uso en tal primer reactivo puede comprender un dextrano de bajo peso molecular. En algunos casos, un interactuante con lipoproteína para uso en tal primer reactivo puede comprender una  $\alpha$ -ciclodextrina. En ciertos casos, un primer reactivo puede comprender un colorante. En ciertos casos, un primer reactivo puede incluir uno o ambos de un compuesto que contenga anilina y un compuesto de aminoantipireno, que originan que ambos compuestos, en presencia de peróxido y una peroxidasa, reaccionen para formar un producto detectable. En ciertos casos de los reactivos, ensayos, métodos y kits descritos en la presente memoria, tal primer reactivo puede comprender sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón, tal como un tampón de fosfato. En ciertos casos de los reactivos, ensayos, métodos y kits descritos en la presente memoria, tal primer reactivo puede comprender sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina (1 mM), sulfato de dextrano (20  $\mu$ M), cloruro de magnesio (4 mM), 4-aminoantipireno (2,25 mM) y  $Na_xPO_4$  (100 mM) (donde  $Na_xPO_4$  es una sal de fosfato de sodio; p. ej., puede ser  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  o  $Na_3PO_4$ ). En ciertos casos, el pH de tal primer reactivo puede estar entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 9, o entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8, opcionalmente entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,8, p. ej., aproximadamente pH 7,4.

Los solicitantes también describen un segundo reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total (CT), colesterol de LBD (C-LBD) y colesterol de LAD (C-LAD) en una muestra

de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas sanguíneas, comprendiendo dicho segundo reactivo una lipasa, una oxidasa y un colorante. En ciertos casos, un segundo reactivo puede comprender un tampón. En ciertos casos de dicho segundo reactivo, una lipasa puede comprender una colesterol esterasa, una oxidasa puede comprender una colesterol oxidasa y un colorante puede comprender una peroxidasa, un sustrato para una peroxidasa, o ambos. En ciertos casos, están presentes en dicho segundo reactivo tanto una peroxidasa como un sustrato para una peroxidasa.

En ciertos casos, dicho segundo reactivo puede comprender un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante. En ciertos casos, un agente anfífilo para uso en tal segundo reactivo puede comprender un tensioactivo. En ciertos casos, un colorante para uso en tal segundo reactivo puede comprender una peroxidasa y un sustrato para una peroxidasa. En ciertos casos, un colorante para uso en tal segundo reactivo puede comprender peroxidasa de rábano picante. En ciertos casos, un colorante para uso en tal segundo reactivo puede comprender un compuesto que contenga anilina, tal como N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), puede comprender un compuesto de aminoantipireno, tal como 4-aminoantipireno, u otros compuestos y combinaciones de compuestos que reaccionan con una enzima tal como una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante). En ciertos casos, un segundo reactivo puede incluir tanto un compuesto que contenga anilina como un compuesto de aminoantipireno, que originan que ambos compuestos, en presencia de peróxido y una peroxidasa, reaccionen para formar un producto detectable. En ciertos casos, una lipasa puede comprender una colesterol esterasa. En ciertos casos, una colesterol esterasa para uso en tal segundo reactivo puede comprender una colesterol esterasa bacteriana, tal como, por ejemplo, una colesterol esterasa de una bacteria *Pseudomonas*. En ciertos casos, una oxidasa puede comprender una colesterol oxidasa. En ciertos casos, una colesterol oxidasa para uso en un segundo reactivo como se describe en la presente memoria puede comprender una colesterol oxidasa bacteriana, tal como una colesterol oxidasa de una bacteria *Pseudomonas*. En ciertos casos de los reactivos, ensayos, métodos y kits descritos en la presente memoria, tal segundo reactivo puede comprender un tampón, tal como un tampón de fosfato (p. ej.,  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (donde  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  es una sal de fosfato de sodio; p. ej., puede ser  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ )), Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), una colesterol esterasa de *Pseudomonas* y una colesterol oxidasa de *Pseudomonas*. Por ejemplo, tal segundo reactivo puede comprender  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (50 mM), Triton X-100 (0,06%), Pluronic L64 (3 g/L), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS) (3 mM), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* (750 U/L) y colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.* (1,5 kU/L). En ciertos casos, el pH de tal segundo reactivo puede estar entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 9, o entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8, opcionalmente entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,8, p. ej., aproximadamente pH 7,4.

Los solicitantes describen en la presente memoria métodos y reactivos para uso en un ensayo para colesterol, entre ellos segundos reactivos que comprenden una lipasa, una oxidasa y un colorante, comprendiendo dichos segundos reactivos un interactuante con lipoproteína a un nivel de concentración que, cuando se emplea en métodos descritos en la presente memoria, origina la conversión de C-LAD en un producto coloreado medible (o producto medible, por ejemplo, en el rango ultravioleta cercano del espectro) a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LBD en un producto coloreado medible (o producto medible, por ejemplo, en el rango ultravioleta cercano del espectro). Los solicitantes describen en la presente memoria métodos y reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una lipasa, una oxidasa y un colorante, entre ellos segundos reactivos que comprenden un interactuante con lipoproteína a un nivel de concentración que, cuando se emplea en métodos descritos en la presente memoria, origina la conversión de C-LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LMBD en un producto coloreado medible. Los solicitantes describen en la presente memoria métodos y reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una lipasa, una oxidasa y un colorante, entre ellos segundos reactivos que comprenden un interactuante con lipoproteína a un nivel de concentración que, cuando se emplea en métodos descritos en la presente memoria, origina la conversión de C-LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LBD y/o C-LMBD en un producto coloreado medible. Los solicitantes describen en la presente memoria métodos y reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una lipasa, una oxidasa y un colorante, entre ellos segundos reactivos que comprenden un interactuante con lipoproteína a un nivel de concentración que, cuando se emplea en métodos descritos en la presente memoria, origina la conversión de C-LBD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LAD y C-LMBD en un producto coloreado medible.

En ciertos casos, un colorante puede comprender una peroxidasa y un sustrato para una peroxidasa. Por ejemplo, en ciertos casos un colorante puede comprender una peroxidasa, un compuesto que contenga anilina y un compuesto de aminoantipireno.

Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, entre ellos reactivos que comprenden un interactuante con lipoproteína a un nivel de concentración que origina la conversión de C-LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LBD y C-LMBD en un producto coloreado medible,

y origina la conversión de C-LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de C-LBD y C-LMBD en un producto coloreado medible.

5 Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprende una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, entre ellos reactivos que comprenden un derivado de polisacárido  
 10 cargado negativamente y un catión divalente en concentraciones que consiguen que no haya precipitación sustancial de LBD, o que no haya precipitación sustancial de LMBD, o ambas cosas, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo. Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una  
 15 colesterol oxidasa, comprendiendo dichos reactivos una proporción de polisacárido cargado negativamente con respecto a cationes divalentes entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02, y en ciertos casos aproximadamente 0,005, que consiguen que no haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación  
 20 sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo. En ciertos casos, dicho reactivo comprende un primer reactivo como se describe en la presente memoria.

15 Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichos reactivos un polisacárido cargado negativamente, un catión divalente y tensioactivo en concentraciones que consiguen que no haya precipitación  
 20 sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo. En ciertos casos, dicho reactivo comprende un primer reactivo como se describe en la presente memoria.

25 Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichos reactivos sulfato de dextrano (u otro polisacárido cargado negativamente) y magnesio (u otro catión divalente) en concentraciones que consiguen que no  
 30 haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo. Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichos reactivos una proporción  
 35 de sulfato de dextrano (u otro polisacárido cargado negativamente) con respecto a iones de magnesio (u otros cationes divalentes) entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02, y en ciertos casos aproximadamente 0,005, que consiguen que no haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo o composición. Los solicitantes describen en la presente memoria reactivos para uso en un ensayo para colesterol que comprende una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichos reactivos sulfato de dextrano, magnesio y tensioactivo en concentraciones que consiguen  
 40 que no haya precipitación sustancial de LBD, o que no haya precipitación sustancial de LMBD o ambas cosas, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo o composición. En ciertos casos, dicho reactivo comprende un primer reactivo como se describe en la presente memoria.

40 Los solicitantes describen además en la presente memoria una composición para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total (CT), colesterol de LBD (C-LBD) y colesterol de LAD (C-LAD) en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas  
 45 sanguíneas, que comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína, una lipasa, una oxidasa y un colorante. En ciertos casos, tal composición puede comprender un tampón. En ciertos casos, el colorante comprende una peroxidasa, un compuesto que contiene anilina y un compuesto de aminoantipireno. En ciertos casos, la composición incluye ingredientes del primer reactivo y del segundo reactivo como se describen en la presente memoria. Tal composición se puede originar, por ejemplo, por combinación de  
 50 dicho primer reactivo y dicho segundo reactivo como se describen en la presente memoria. En ciertos casos, tal composición puede comprender un polisacárido cargado negativamente y una sal que comprenda un catión divalente (por ejemplo, una sal de magnesio y sulfato de dextrano), en donde la proporción de polisacárido cargado negativamente con respecto a catión divalente (por ejemplo, sulfato de dextrano con respecto a iones de magnesio) está entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02, y en ciertos casos la proporción vale aproximadamente 0,005, que consiguen no haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicha composición. En ciertos casos, tal composición comprende dicho primer reactivo y dicho  
 55 segundo reactivo, o una parte alícuota de dicho primer reactivo y una parte alícuota de dicho segundo reactivo. En realizaciones adicionales, tal composición comprende dicho primer reactivo, dicho segundo reactivo y una muestra de sangre, o una parte alícuota o partes alícuotas de uno o varios de dicho primer reactivo, dicho segundo reactivo y dicha muestra de sangre.

60 En ciertos casos, un agente de solubilización de lipoproteína en tal composición puede comprender un tensioactivo. En ciertos casos, un interactuante con lipoproteína en tal composición puede comprender un catión divalente (p. ej., ion magnesio) y un derivado de polisacárido cargado negativamente. Un derivado de polisacárido cargado negativamente puede comprender un éster de ciclodextrina, un éster de dextrano o tanto un éster de ciclodextrina

como un éster de dextrano. Por ejemplo, un éster de dextrano puede comprender un éster de dextrano de bajo peso molecular, p. ej. un sulfato de dextrano de bajo peso molecular, y un éster de ciclodextrina puede comprender un éster de  $\alpha$ -ciclodextrina, p. ej. sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina. En ciertos casos, una lipasa puede comprender una colesterol esterasa. En ciertos casos, una oxidasa puede comprender una colesterol oxidasa. En ciertos casos, un colorante puede comprender una peroxidasa.

Por consiguiente, en ciertos casos una composición para uso en un ensayo para colesterol como se describe en la presente memoria puede comprender una colesterol esterasa; una colesterol oxidasa; una peroxidasa; un sustrato para una peroxidasa; un tensioactivo; una sal que contiene un catión divalente; y un polisacárido cargado negativamente (p. ej. un derivado de dextrano tal como el sulfato de dextrano). En ciertos casos, un sustrato para una peroxidasa en tal composición comprende tanto un compuesto que contiene anilina como un compuesto de aminoantipireno, que originan que ambos compuestos, en presencia de peróxido y una peroxidasa, reaccionen para formar un producto detectable. En ciertos casos, un sustrato para una peroxidasa puede comprender otros compuestos y combinaciones de compuestos que reaccionan con una peroxidasa (p. ej., peroxidasa de rábano picante). Un compuesto que contiene anilina puede ser, por ejemplo, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS). Un compuesto de aminoantipireno puede ser 4-aminoantipireno.

En ciertos casos, una composición para uso en un ensayo para colesterol como se describe en la presente memoria puede comprender sulfato de dextrano (u otro polisacárido cargado negativamente) y magnesio en concentraciones que consiguen que no haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicha composición. Los solicitantes describen en la presente memoria composiciones para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichas composiciones una proporción de sulfato de dextrano con respecto a iones de magnesio entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02, y en ciertos casos aproximadamente 0,005, que consiguen que no haya precipitación sustancial de LAD, o que no haya precipitación sustancial de LBD o que no haya precipitación sustancial de LMBD, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicho reactivo. Los solicitantes describen en la presente memoria composiciones para uso en un ensayo para colesterol que comprenden una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa, comprendiendo dichas composiciones sulfato de dextrano, magnesio y tensioactivo en concentraciones que consiguen que no haya precipitación sustancial de LBD, o que no haya precipitación sustancial de LMBD, o ninguna de las dos cosas, cuando una muestra de sangre o una parte de una muestra de sangre entra en contacto con dicha composición.

En ciertos casos, una composición para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total (CT), colesterol de LBD (C-LBD) y colesterol de LAD (C-LAD) en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas sanguíneas puede comprender una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa, una peroxidasa (como la peroxidasa de rábano picante), 4-aminoantipireno, ALPS, sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, un agente tensioactivo (p. ej. Triton X-100 y/o Pluronic L64) y un tampón. Un tampón adecuado puede ser, por ejemplo, un tampón de fosfato, y un pH adecuado puede estar en el intervalo entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 9, o entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente 8, opcionalmente entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,8, p. ej. aproximadamente pH 7,4. Una colesterol esterasa adecuada para uso en tal composición puede comprender una colesterol esterasa bacteriana, tal como, por ejemplo, una colesterol esterasa de una bacteria *Pseudomonas*, y una colesterol oxidasa adecuada puede comprender una colesterol oxidasa bacteriana, tal como una colesterol oxidasa de una bacteria *Pseudomonas*.

En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total, colesterol de LBD y colesterol de LAD en lipoproteínas de una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, comprendiendo dicho reactivo un agente de solubilización de lipoproteína, interactuante con lipoproteína y un tampón, en donde dicho interactuante con lipoproteína está presente a un nivel de concentración que origina la conversión de colesterol de LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LBD en un producto coloreado medible y a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LMBD en un producto coloreado medible.

En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total, colesterol de LBD y colesterol de LAD en lipoproteínas de una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, comprendiendo dicho reactivo sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón de fosfato de sodio, en donde la proporción de sulfato de dextrano con respecto a iones de magnesio se sitúa entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02.

En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo para uso en un ensayo para medir al menos dos de colesterol total, colesterol de lipoproteína de baja densidad (LBD) y colesterol de lipoproteína de alta densidad (LAD) en lipoproteínas de una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, que comprende un tampón, un agente anfifilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante. En ciertos casos, el reactivo comprende una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y una peroxidasa. En ciertos casos del reactivo, el



agente anfífilo comprende un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos no iónicos; tensioactivos aniónicos; tensioactivos catiónicos; tensioactivos zwitteriónicos; y derivados, análogos, y combinaciones de los mismos. En ciertos casos del reactivo, el colorante comprende uno o varios de una peroxidasa, un sustrato para peroxidasa, un compuesto de aminoantipireno y un compuesto que contiene anilina.

5 En ciertos casos, el reactivo comprende un tampón de fosfato de sodio, Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* y colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.*

En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total, colesterol de LBD y colesterol de LAD en lipoproteínas de una muestra de

10 sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, que comprende un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante. En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total, colesterol de LBD y colesterol de LAD en lipoproteínas de una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, que comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y una peroxidasa.

15

En ciertos casos, el reactivo puede proporcionarse en un kit; un kit puede incluir además instrucciones para el uso de un reactivo (p. ej., una composición descrita en la presente memoria), o para el uso de múltiples reactivos, p. ej. en un ensayo para colesterol, o en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de colesterol total, colesterol de LBD y colesterol de LAD en lipoproteínas de una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas, o en otro u otros ensayos. Un reactivo de un kit puede estar contenido en un recipiente, y múltiples reactivos pueden estar contenidos en múltiples recipientes.

20

Los solicitantes describen en la presente memoria un kit que comprende reactivos para uso en un ensayo para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de CT, C-LBD y C-LAD en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas. Realizaciones de los kits descritos en la presente memoria pueden comprender un primer recipiente que contenga un primer reactivo que comprenda un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón; y un segundo recipiente que contenga un segundo reactivo que comprenda un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante. Realizaciones de los kits descritos en la presente memoria pueden comprender un primer recipiente que contenga un primer reactivo que comprenda un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un

25

30 tampón; y un segundo recipiente que contenga un segundo reactivo que comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante. En ciertos casos, un colorante puede comprender una peroxidasa, un sustrato para una peroxidasa, o ambos.

Casos de los kits descritos en la presente memoria pueden comprender un primer recipiente que contenga un primer reactivo que comprenda un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón; un segundo recipiente que contenga un segundo reactivo que comprenda un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante; e instrucciones para su uso. En ciertos casos, tales kits comprenden un primer recipiente que contiene un primer reactivo que comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón; un segundo recipiente que contiene un segundo reactivo que comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante; e instrucciones para su uso.

35

40 En ciertos casos, un colorante puede comprender una peroxidasa y un sustrato para una peroxidasa.

En ciertos casos, los solicitantes describen un kit que comprende un reactivo e instrucciones para el uso de dicho reactivo en un ensayo para colesterol, comprendiendo el reactivo un reactivo descrito en la presente memoria. En ciertos casos, los solicitantes describen un reactivo e instrucciones para el uso de dicho reactivo en un ensayo para colesterol, comprendiendo el reactivo sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón de fosfato de sodio, en donde la proporción de sulfato de dextrano con respecto a iones de magnesio se sitúa entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02. En ciertos casos, los solicitantes describen un kit que comprende un reactivo e instrucciones para el uso de dicho reactivo en un ensayo para colesterol, comprendiendo el reactivo un tampón de fosfato de sodio, Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* y colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.*

45

50

En ciertos casos, los solicitantes describen un kit que comprende al menos un primer reactivo y un segundo reactivo, e instrucciones para el uso de dichos reactivos en un ensayo para colesterol, en donde dicho primer reactivo comprende un reactivo descrito en la presente memoria (p. ej., un reactivo que comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón), y dicho segundo reactivo comprende un reactivo descrito en la presente memoria (p. ej., un reactivo que comprende un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, un oxidante y un colorante). En ciertos casos, los solicitantes describen un kit que comprende al menos un primer reactivo y un segundo reactivo, e instrucciones para el uso de dichos reactivos en un ensayo para colesterol, en donde dicho primer reactivo comprende un agente de solubilización de lipoproteína seleccionado de un tensioactivo y un derivado de  $\alpha$ -ciclodextrina cargado negativamente; un interactuante con lipoproteína que comprende un derivado de dextrano de bajo peso molecular cargado negativamente y un tampón; y dicho segundo reactivo comprende un tampón de fosfato de sodio, Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-

55

60

dimetoxianilina (ALPS), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* y colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.*

En ciertos casos, los solicitantes describen un kit que comprende al menos un primer reactivo y un segundo reactivo, e instrucciones para el uso de dichos reactivos en un ensayo para colesterol, en donde dicho primer reactivo comprende i) un agente de solubilización de lipoproteína, interactuante con lipoproteína y un tampón, en donde dicho interactuante con lipoproteína está presente a un nivel de concentración que origina la conversión de colesterol de LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LBD en un producto coloreado medible y a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LMBD en un producto coloreado medible, o ii) sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón de fosfato de sodio, en donde la proporción de sulfato de dextrano con respecto a iones de magnesio se sitúa entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02; y dicho segundo reactivo a) comprende un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante, o b) un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y una peroxidasa.

También se describen en la presente memoria métodos para medir de manera simultánea y rápida al menos dos de CT, C-LBD y C-LAD en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas. Casos de métodos para medir de manera simultánea y rápida CT, C-LBD y C-LAD en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas comprenden pasos de: combinar en un momento inicial al menos una parte de dicha muestra de sangre con un primer reactivo que comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón para proporcionar una solución combinada; añadir a dicha solución combinada un segundo reactivo que comprende un tampón, un agente anfífilo, una lipasa, una oxidasa y un colorante para proporcionar una solución coloreada; y medir la absorbancia lumínica de dicha solución coloreada dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y dentro de un tercer período de tiempo tras la adición de dicho segundo reactivo.

En ciertos casos de tales métodos, dicho primer período de tiempo comprende un período de tiempo inferior a aproximadamente 3 minutos después de dicho momento inicial, y dicho tercer período de tiempo comprende un período de tiempo superior a aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial, en donde dicho momento inicial comprende el momento en el cual se añade dicho segundo reactivo a dicha solución combinada.

En ciertos casos, dichos métodos para medir de manera simultánea y rápida CT, C-LBD y C-LAD en una muestra de sangre procedente de un sujeto sin precipitación sustancial de dichas lipoproteínas comprenden pasos de: combinar en un momento inicial al menos una parte de dicha muestra de sangre con un primer reactivo que comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón para proporcionar una solución combinada; añadir a dicha solución combinada un segundo reactivo que comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante para proporcionar una solución coloreada; y medir la absorbancia lumínica de dicha solución coloreada dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y dentro de un tercer período de tiempo.

En ciertos casos de tales métodos, dicho primer período de tiempo comprende un período de tiempo inferior a aproximadamente 3 minutos después de dicho momento inicial, y dicho tercer período de tiempo comprende un período de tiempo superior a aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial, en donde dicho momento inicial comprende el momento en el cual se añade dicho segundo reactivo a dicha solución combinada.

En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, el primer período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 0 minutos y aproximadamente 2 minutos después de dicho momento inicial, el segundo período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 6 minutos después de dicho momento inicial, y el tercer período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 6 minutos y aproximadamente 10 minutos o más. En ciertos casos, dicho tercer período de tiempo comprende un período abierto de tiempo que incluye cualquier momento después de aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 6 minutos después de dicho momento inicial. En ciertos casos, el momento inicial es el momento en el cual se añade a la solución el segundo reactivo.

Se entenderá que se pueden emplear también otros tiempos y períodos de tiempo, p. ej., se pueden emplear tiempos y períodos de tiempo más largos cuando se reducen las cantidades de lipasa, oxidasa, o ambas. También se entenderá que, p. ej., se pueden emplear tiempos y períodos de tiempo más cortos cuando se aumentan las cantidades de lipasa, oxidasa, o ambas. De manera similar, también se pueden emplear otros tiempos y períodos de tiempo cuando se modifican las cantidades de agentes de solubilización de lipoproteína y/o de interactuantes con lipoproteína. Por consiguiente, en casos adicionales de los métodos descritos en la presente memoria, los períodos de tiempo pueden ser más largos que los períodos de tiempo comentados en lo que antecede; por ejemplo, se pueden configurar reactivos y métodos en donde el primer período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 0 minutos y aproximadamente 10 minutos después de dicho momento inicial, el segundo período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 20 minutos o aproximadamente 30 minutos después de dicho momento inicial y el tercer período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos, o entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos o más. En más casos adicionales de los métodos descritos en la presente memoria, los períodos de tiempo pueden ser más cortos que los períodos

de tiempo comentados en lo que antecede; por ejemplo, se pueden configurar reactivos y métodos en donde el primer período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 0 minutos y aproximadamente 1 minuto después de dicho momento inicial, el segundo período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 4 minutos o aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial, y el tercer período de tiempo pueda comprender un período de tiempo entre aproximadamente 4 minutos y aproximadamente 8 minutos, o entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 9 minutos.

En ciertos casos, un paso de medir la absorbancia puede comprender medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro. Un paso de medir la absorbancia comprenderá típicamente medir la absorbancia a una frecuencia particular, o cerca de ella, utilizando un espectrofotómetro. En ciertos casos, un paso de medir la absorbancia puede comprender medir la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 560 nanómetros (nm) o cerca de ella. En ciertos casos, un paso de medir la absorbancia puede comprender además utilizar un espectrofotómetro para medir la diferencia entre la absorbancia a una primera longitud de onda, o cerca de la misma, y la absorbancia en una segunda longitud de onda o cerca de la misma; a tal diferencia entre la absorbancia medida a dos longitudes de onda se la puede denominar " $\Delta A$ ". Por ejemplo, estas dos longitudes de onda pueden ser aproximadamente 560 nm y aproximadamente 700 nm. En ciertos casos, un paso de medir la absorbancia puede comprender además utilizar un espectrofotómetro para medir la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 560 nm y a una longitud de onda de aproximadamente 700 nm, al objeto de obtener la diferencia de absorbancia entre aproximadamente 560 nm y aproximadamente 700 nm. Se entenderá que para algunos colorantes se pueden emplear otras longitudes de onda y otros intervalos de longitud de onda; por ejemplo, existen sustratos de peroxidasa cromógenos que se pueden detectar a longitudes de onda entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 700 nm.

Tales mediciones de absorbancia se pueden realizar en un momento particular, o en dos momentos particulares, o en tres, o más, momentos particulares, en donde un momento particular se define con respecto a un momento inicial. Las mediciones en un momento particular pueden incluir mediciones realizadas durante un intervalo de tiempo, como entre 0 y aproximadamente 2 minutos después de un momento inicial, o entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 6 minutos después de un momento inicial, o entre aproximadamente 6 minutos y aproximadamente 10 minutos después de un momento inicial, o en otros momentos y/u otros períodos de tiempo.

En ciertos casos, un paso para medir la absorbancia puede comprender medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro en dos momentos, y registrar o calcular la diferencia entre las mediciones realizadas en dichos dos momentos. En ciertos casos la absorbancia puede ser  $\Delta A$ , medida como la diferencia en la absorbancia medida a dos longitudes de onda, y se puede registrar o calcular la diferencia entre la  $\Delta A$  medida en un primer momento y la  $\Delta A$  medida en un segundo momento; a esta diferencia entre la  $\Delta A$  medida en dos momentos se la puede denominar " $\Delta A_t$ ". Por ejemplo, se puede medir  $\Delta A_t$  midiendo  $\Delta A$  como la diferencia entre la absorbancia medida a 560 nm y a 700 nm, donde la medición de  $\Delta A$  se realiza aproximadamente 2 minutos después de un momento inicial y aproximadamente 6 minutos después de un momento inicial, donde  $\Delta A_t$  es la diferencia entre las dos mediciones de  $\Delta A$ . En casos adicionales se puede medir  $\Delta A_t$  midiendo  $\Delta A$  como la diferencia entre la absorbancia medida a 560 nm y a 700 nm, donde la medición de  $\Delta A$  se realiza en un momento inicial y aproximadamente 2 minutos después de un momento inicial, siendo  $\Delta A_t$  la diferencia entre las dos mediciones de  $\Delta A$ . En casos adicionales se puede medir  $\Delta A_t$  midiendo  $\Delta A$  como la diferencia entre la absorbancia medida a 560 nm y a 700 nm, donde la medición de  $\Delta A$  se realiza aproximadamente 6 minutos después de un momento inicial y aproximadamente 10 minutos después de un momento inicial, donde  $\Delta A_t$  es la diferencia entre las dos mediciones de  $\Delta A$ . En casos adicionales, cuando la medición de  $\Delta A$  debe realizarse después de un tiempo particular, se entenderá que frases como, p. ej., "después de aproximadamente 5 minutos", "después de aproximadamente 10 minutos", "en un período de tiempo mayor que aproximadamente 5 minutos", "en un período de tiempo mayor que aproximadamente 10 minutos", y similares, se pueden medir entre cualquier tiempo después del tiempo establecido y un tiempo razonable después de este. En ciertos casos, tal período de tiempo para la medición puede no prolongarse en el tiempo más allá de aproximadamente 30 minutos, o más allá de aproximadamente 20 minutos, después del momento inicial.

En ciertos casos, un primer reactivo puede comprender un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón. En ciertos casos, un agente de solubilización de lipoproteína puede comprender un tensioactivo. En ciertos casos, un interactuante con lipoproteína puede comprender un dextrano (tal como un derivado de dextrano tal como un dextrano sulfonado o fosforilado), una ciclodextrina (tal como un derivado de ciclodextrina tal como una ciclodextrina sulfonada o metilada), un producto natural cargado negativamente tal como heparina, o combinaciones de los mismos. En ciertos casos, un interactuante con lipoproteína puede comprender un éster de dextrano de bajo peso molecular cargado negativamente, p. ej. un sulfato de dextrano de bajo peso molecular. En ciertos casos, un interactuante con lipoproteína puede comprender un derivado de  $\alpha$ -ciclodextrina tal como un éster de sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina. En ciertos casos, un primer reactivo puede comprender un sustrato para peroxidasa. En ciertos casos, un sustrato para peroxidasa puede comprender un compuesto de aminoantipireno, tal como 4-aminoantipireno, y un compuesto que contenga anilina, tal como ALPS. En casos adicionales, el primer reactivo puede comprender sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno, ALPS y un tampón, tal como, por ejemplo, un tampón de fosfato (p. ej.  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (donde  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  es una sal de fosfato de sodio; p. ej., puede ser  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) para tamponar el pH entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8. Por ejemplo, en ciertos casos el primer reactivo puede comprender sulfato de

$\alpha$ -ciclodextrina (1 mM), sulfato de dextrano (20  $\mu$ M), cloruro de magnesio (4 mM), 4-aminoantipireno (2,25 mM), ALPS 3 mM y  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (100 mM), pH aproximadamente 7.

5 En ciertos casos, se pueden separar en diferentes reactivos los componentes de un sustrato para peroxidasa. Se puede desear la separación de los componentes del sustrato para peroxidasa en diferentes reactivos con vistas a la estabilidad de uno o ambos reactivos, o bien puede ser útil para reducir o evitar la degradación de uno o ambos reactivos. Así, en ciertos casos un primer reactivo puede incluir un compuesto de antipireno y un segundo reactivo puede incluir un compuesto que contenga anilina. En casos adicionales, un primer reactivo puede comprender 4-aminoantipireno y un segundo reactivo puede comprender N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS). En casos adicionales, un primer reactivo puede comprender 4-aminoantipireno entre aproximadamente 10 1 mM y aproximadamente 5 mM y un segundo reactivo puede comprender ALPS entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 20 mM. Por ejemplo, un primer reactivo puede comprender 4-aminoantipireno 2,25 mM y un segundo reactivo puede comprender ALPS 3 mM.

15 En ciertos casos, los componentes de un sustrato para peroxidasa pueden estar contenidos en un único reactivo. Se puede desear la inclusión de múltiples componentes en un único reactivo por simplicidad de fabricación o facilidad de uso, o por otras razones. Por ejemplo, un reactivo que contenga todos los componentes de un sustrato para peroxidasa puede comprender un compuesto de aminoantipireno y un compuesto que contenga anilina. En casos adicionales, un reactivo que contenga todos los componentes de un sustrato para peroxidasa puede comprender 4-aminoantipireno y N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS). En casos adicionales, un reactivo que contenga todos los componentes de un sustrato para peroxidasa puede comprender 20 4-aminoantipireno entre aproximadamente 4 mM y aproximadamente 5 mM y ALPS entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 20 mM. Por ejemplo, un reactivo que contenga todos los componentes de un sustrato para peroxidasa puede comprender 4-aminoantipireno 2,25 mM y ALPS 3 mM. En otros casos, se pueden secar reactivos para aumentar la estabilidad. Se pueden liofilizar reactivos o proporcionarlos como películas vítreas, p. ej. películas que pueden adherirse a una pared de recipiente. Cuando tales reactivos están secos, se pueden formular para que se disuelvan rápidamente (por ejemplo, en un plazo de segundos o minutos) al añadir agua u otro disolvente acuoso, 25 tal como una solución tampón.

En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un segundo reactivo puede comprender una lipasa, una oxidasa y un colorante. En ciertos casos de dicho segundo reactivo, una lipasa puede comprender una colesterol esterasa, una oxidasa puede comprender una colesterol oxidasa y un colorante puede comprender una peroxidasa. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un segundo reactivo puede comprender un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un agente anfífilo puede comprender un tensioactivo. En ciertos casos, un colorante puede comprender una peroxidasa, un sustrato para peroxidasa, y puede comprender tanto una peroxidasa como un sustrato para peroxidasa. Una peroxidasa puede comprender, por 35 ejemplo, una peroxidasa de rábano picante (*A Armoracia rusticana*) (HRP, por sus siglas en inglés). Un sustrato para peroxidasa puede comprender un compuesto que contenga anilina, un compuesto de aminoantipireno o ambos. En ciertos casos, un colorante puede comprender un compuesto de aminoantipireno, tal como 4-aminoantipireno. En ciertos casos, un colorante puede comprender N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS). En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un segundo reactivo puede comprender una 40 colesterol esterasa bacteriana, tal como una colesterol esterasa de una bacteria *Pseudomonas*, y en ciertos casos puede comprender una colesterol oxidasa bacteriana, tal como una colesterol oxidasa bacteriana de una bacteria *Pseudomonas*. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un segundo reactivo puede comprender un tampón, tal como un tampón de fosfato (p. ej.,  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (50 mM)), Triton X-100 (0,06%), Pluronic L64 (3 g/L), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS) (3 mM), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* 45 (750 U/L) y colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.* (1,5 kU/L).

En ciertos casos, una composición como se describe en la presente memoria puede comprender sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, un sustrato para peroxidasa (p. ej., diaminoantipireno o 4-aminoantipireno y ALPS), colesterol esterasa (p. ej., colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.*), colesterol oxidasa (p. ej., colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.*), un tensioactivo y un tampón. En ciertos casos, una composición como se describe en la presente memoria puede comprender un primer reactivo y un segundo reactivo. En ciertos 50 casos, una composición como se describe en la presente memoria puede comprender un primer reactivo, un segundo reactivo y al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto.

Un tampón, por ejemplo, puede ser un tampón de fosfato (p. ej.,  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  (donde  $\text{Na}_x\text{PO}_4$  es una sal de fosfato de sodio; p. ej., puede ser  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) para tamponar el pH entre aproximadamente pH 5 y 55 aproximadamente pH 9, o entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8, opcionalmente entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,8, p. ej., pH 7,4. En ciertos casos, una composición como se describe en la presente memoria puede comprender entre aproximadamente 100 U/L y aproximadamente 2.000 U/L de colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.* (p. ej., aproximadamente 750 U/L), y puede comprender entre aproximadamente 100 U/L y aproximadamente 3.000 U/L de colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.* (p. ej., 60 aproximadamente 1,5 kU/L).

En ciertos casos, por ejemplo, un sustrato para peroxidasa puede comprender 4-aminoantipireno entre

aproximadamente 1 mM y aproximadamente 5 mM y ALPS entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 20 mM, p. ej. 4-aminoantipireno aproximadamente 2,25 mM y ALPS aproximadamente 3 mM. En ciertos casos, un tensioactivo puede ser, por ejemplo, Triton X-100 y/o Pluronic L64, p. ej. la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1% de Triton X-100 y puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 g/L de Pluronic L64; en casos particulares, la composición puede comprender aproximadamente 0,06% de Triton X-100 y aproximadamente 3 g/L de Pluronic L64.

En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria se puede emplear una medición dentro de un primer período de tiempo para determinar el colesterol de LAD en dicha muestra. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria se puede emplear una medición dentro de un segundo período de tiempo para determinar el colesterol de LBD en dicha muestra. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria se puede emplear una medición dentro de un tercer período de tiempo para determinar el colesterol total en dicha muestra. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, una medición puede comprender medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, una medición puede comprender medir  $\Delta A$  (donde  $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a la primera longitud de onda y a la segunda longitud de onda) utilizando un espectrofotómetro. En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, una medición puede comprender medir  $\Delta A_t$  (donde  $\Delta A_t$  es la diferencia entre la absorbancia medida en un primer momento y la absorbancia medida en un segundo momento) utilizando un espectrofotómetro. Las mediciones de absorbancia para medir  $\Delta A_t$  pueden ser mediciones de  $\Delta A$ .

En ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un método para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto puede comprender pasos de: medir la formación de producto a partir de una reacción entre subfracciones de colesterol y una mezcla de reactivos que comprende una lipasa y una oxidasa dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y dentro de un tercer período de tiempo para proporcionar datos de medida de colesterol; en donde se obtiene una medida de colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LBD) a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho segundo período de tiempo; en donde se obtiene una medida de colesterol total (CT) a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho tercer período de tiempo; en donde se obtiene una medida de colesterol de lipoproteína de alta densidad (C-LAD) a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho segundo período de tiempo más la velocidad de formación del producto medida en dicho primer período de tiempo; con lo cual se analizan dichos datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto.

En casos particulares de los métodos para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto descritos en la presente memoria, dicha lipasa puede comprender una colesterol esterasa y dicha oxidasa puede comprender una colesterol oxidasa. Por ejemplo, en ciertos casos de los métodos descritos en la presente memoria, un método para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto puede comprender pasos de: medir la formación de producto a partir de una reacción entre subfracciones de colesterol y una mezcla de reactivos que comprende una colesterol esterasa y una colesterol oxidasa dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y dentro de un tercer período de tiempo para proporcionar datos de medida de colesterol; en donde se obtiene una medida de C-LBD a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho segundo período de tiempo; en donde se obtiene una medida de CT a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho tercer período de tiempo; y en donde se obtiene una medida de C-LAD a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de dicho segundo período de tiempo más la velocidad de formación de producto medida en dicho primer período de tiempo; con el cual se analizan dichos datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto.

Casos de un método para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto pueden comprender pasos en donde dicho primer período de tiempo pueda comprender menos de aproximadamente 3 minutos después de un momento inicial, en donde dicho momento inicial comprenda el momento en el cual se añade un segundo reactivo a una solución combinada, y en donde una solución combinada pueda comprender un primer reactivo y al menos una parte de una muestra de sangre. En ciertos casos, un método para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto puede comprender un paso en donde un tercer período de tiempo comprenda un período de tiempo mayor que aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial, en donde dicho momento inicial comprenda el momento en el cual se añade un segundo reactivo a una solución combinada. En ciertos casos, dicho primer período de tiempo comprende un período de tiempo entre aproximadamente 0 minutos y aproximadamente 2 minutos después de dicho momento inicial, dicho segundo período de tiempo comprende un período de tiempo entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 6 minutos después de dicho momento inicial y dicho tercer período de tiempo comprende un período de tiempo entre aproximadamente 6 minutos y aproximadamente 10 minutos o más. En ciertos casos, dicho tercer período de tiempo puede comprender un período abierto de tiempo que incluya cualquier tiempo mayor que aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial o mayor que aproximadamente 6 minutos después de dicho momento inicial.

En ciertos casos, un paso de medir la formación de producto comprende medir la absorbancia. En ciertos casos, un paso para medir la absorbancia comprende medir  $\Delta A$  utilizando un espectrofotómetro. En otros casos, un paso de

medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro comprende medir la absorbancia a una primera longitud de onda y medir la absorbancia a una segunda longitud de onda para obtener una medida de  $\Delta A$ , donde  $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a la primera longitud de onda y la medida a la segunda longitud de onda. En ciertos casos, un paso de medir  $\Delta A$  utilizando un espectrofotómetro comprende medir  $\Delta A$  a una longitud de onda entre aproximadamente 300 nm y aproximadamente 700 nm, y a una longitud de onda entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 900 nm. En casos más particulares, un paso de medir  $\Delta A$  utilizando un espectrofotómetro comprende medir  $\Delta A$  a una longitud de onda de aproximadamente 560 nm y a una longitud de onda de aproximadamente 700 nm.

En al menos algunos casos, métodos descritos en la presente memoria incluyen métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, en donde se obtiene una medida de C-LAD a partir de dichos datos de medida de colesterol obtenidos dentro de un segundo período de tiempo más la velocidad de formación de producto medida en un primer período de tiempo, según la siguiente fórmula:

$$K_1 - K_2 \times (C-LBD) + K_3 \times R_1$$

donde  $K_1$  es una constante cuyo valor puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 250;

donde  $K_2$  es una constante cuyo valor puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 100;

donde se puede determinar la cantidad de C-LBD por la diferencia entre la absorbancia medida al comienzo de dicho segundo período de tiempo y al final de dicho segundo período de tiempo;

donde  $K_3$  es una constante cuyo valor puede estar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20.000; y

donde  $R_1$  se puede determinar por la diferencia entre la absorbancia medida al comienzo de dicho primer período de tiempo y al final de dicho primer período de tiempo, y en donde dichos períodos de tiempo se pueden determinar con respecto a un momento inicial, en donde el período de tiempo inicial comprende el momento en el cual se añade un segundo reactivo a una solución combinada que comprende un primer reactivo y al menos una parte de dicha muestra de sangre.

En ciertos casos, el valor de  $K_1$  puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 100, o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 50. En ciertos casos, el valor de  $K_2$  puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 50, o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 25. En ciertos casos, el valor de  $K_3$  puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10.000, o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 5.000. En casos adicionales, el valor de  $K_1$  puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 25, o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10. En casos adicionales, el valor de  $K_2$  puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 5, o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 2.

En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, un primer período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 0 minutos y aproximadamente 2 minutos después de un momento inicial. En ciertos casos, un segundo período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 6 minutos después de un momento inicial. En ciertos casos, un tercer período de tiempo puede comprender un período de tiempo entre aproximadamente 6 minutos y aproximadamente 10 minutos después de un momento inicial, o más. En ciertos casos, dicho tercer período de tiempo puede comprender un período abierto de tiempo que incluya cualquier tiempo mayor que aproximadamente 5 minutos después de dicho momento inicial o mayor que aproximadamente 6 minutos después de dicho momento inicial.

En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_1$  puede tener un valor entre aproximadamente 0 y aproximadamente 3. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_2$  puede tener un valor entre aproximadamente 0 y aproximadamente 1. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_3$  puede tener un valor entre aproximadamente 800 y aproximadamente 1.800. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_1$  puede tener un valor de aproximadamente 1,30. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_2$  puede tener un valor de aproximadamente 0,446. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto,  $K_3$  puede tener un valor de aproximadamente 1.255.

En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, los datos de medida de colesterol pueden comprender datos procedentes de una medición de absorbancia. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, las mediciones de absorbancia pueden comprender mediciones de absorbancia realizadas utilizando un espectrofotómetro. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, una medición

de absorbancia utilizando un espectrofotómetro puede comprender una medición de  $\Delta A$ , donde una medición de  $\Delta A$  comprende una medición de absorbancia realizada a una primera longitud de onda y una medición de absorbancia realizada a una segunda longitud de onda, que permiten obtener la diferencia entre la absorbancia a dicha primera longitud de onda y la absorbancia a dicha segunda longitud de onda. En ciertos casos de métodos adicionales para analizar datos de medida de colesterol obtenidos a partir de una muestra de sangre de un sujeto, una medición de  $\Delta A$  utilizando un espectrofotómetro puede comprender mediciones de absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 560 nm y a una longitud de onda de aproximadamente 700 nm.

Los solicitantes describen además en la presente memoria dispositivos para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto. En ciertos casos, un dispositivo para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto puede comprender: medios para combinar un primer reactivo con al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto, que permitan proporcionar una solución combinada; medios para combinar un segundo reactivo con dicha solución combinada a fin de proporcionar una solución coloreada; medios para medir una propiedad óptica de dicha solución coloreada; y medios para visualizar o notificar los resultados de dicha medición de dicha propiedad óptica de dicha solución coloreada. En casos adicionales, un dispositivo para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto puede comprender: una cámara para combinar un primer reactivo con al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto, que permita proporcionar una solución combinada; un conducto para combinar un segundo reactivo con dicha solución combinada a fin de proporcionar una solución coloreada; un detector óptico para medir una propiedad óptica de dicha solución coloreada; y un elemento de visualización o un enlace de comunicación para notificar los resultados de dicha medición de dicha propiedad óptica de dicha solución coloreada. En ciertos casos, un elemento de visualización y/o un enlace de comunicación pueden ser adecuados para comunicación bidireccional.

Los solicitantes describen en la presente memoria sistemas para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto. En ciertos casos, un sistema para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto comprende un dispositivo como se describe en la presente memoria, y un medio para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, una red informática, un teléfono, una red telefónica o un dispositivo configurado para visualizar información comunicada desde dicho dispositivo. Se entenderá que un medio para comunicar información puede incluir medios para comunicación unidireccional y puede incluir medios para comunicación bidireccional, y puede incluir medios para comunicar con múltiples ubicaciones o entidades. En ciertos casos, un sistema para medir el colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto comprende un dispositivo como se describe en la presente memoria y un canal para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, en donde dicho canal se selecciona de una red informática, una red telefónica, un enlace de comunicaciones metálico, un enlace de comunicaciones óptico y un enlace de comunicaciones inalámbrico. Se entenderá que un canal para comunicar información puede ser un canal de comunicación unidireccional y puede ser un canal de comunicación bidireccional, y puede incluir canales para comunicar con múltiples ubicaciones o entidades.

En ciertos casos, se pueden determinar niveles de triglicérido mediante métodos en los cuales se pone en contacto una muestra de sangre con una lipasa para proporcionar ácidos grasos y glicerol a partir de TG de la muestra de sangre. Se puede poner en contacto este glicerol con una cinasa, tal como la glicerol cinasa, para proporcionar glicerolfosfato, que se puede poner en contacto con una oxidasa, tal como la glicerol-3-fosfato oxidasa, para proporcionar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. Se pueden poner en contacto colorantes, tales como 4-aminoantipireno y N-etil-N-(sulfopropil)anilina, con peroxidasa de rábano picante en presencia del peróxido de hidrógeno, que permiten formar un tinte, tal como un tinte de quinonaimina, tinte cuya medición proporciona una medida del nivel de TG en la muestra de sangre. Tal tinte se puede medir por medios espectrofotométricos; por ejemplo, se puede medir tal tinte, y se pueden determinar los niveles de TG, midiendo la absorbancia a una longitud de onda (p. ej. 560 nanómetros (nm)) o dentro de un intervalo de longitudes de onda (p. ej. de 555 a 565 nm).

Se puede estimar C-LMBD a partir de las mediciones de TG dividiendo por 5 la concentración de TG en una muestra:

$$C-LMBD = TG/5$$

con el fin de proporcionar un valor para el nivel de C-LMBD en la muestra de sangre en la que se ha medido TG. El nivel de C-LMBD estimado de esta manera se puede usar adicionalmente para calcular el CT en una muestra de sangre sumando los niveles de C-LAD, C-LBD y C-LMBD (estimado según la fórmula  $C-LMBD = TG/5$ ).

Sin embargo, en lugar de dicha estimación, los solicitantes describen en la presente memoria métodos adicionales para calcular C-LMBD basándose en las novedosas y útiles mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG descritas en la presente memoria. Se cree que estos métodos adicionales proporcionan una precisión mayor que los métodos anteriores. En ciertos casos se puede calcular C-LMBD a partir de las mediciones de C-LAD, CT y TG, donde estas mediciones se realizan conforme a los métodos descritos en la presente memoria. En ciertos casos se puede

calcular C-LMBD a partir de las mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG, donde estas mediciones se realizan conforme a los métodos descritos en la presente memoria.

En ciertos casos se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto, a partir de las mediciones de C-LAD, CT y TG, por ejemplo mediante la relación:

$$5 \quad C-LMBD = \alpha CT + \beta C-LAD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$$

donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, TG y  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , respectivamente; y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente. Al término  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$  se le puede denominar "término cruzado", en el cual los términos de un paréntesis multiplican a los términos del otro paréntesis. Las constantes multiplicativas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $a_1$  y las constantes aditivas  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  pueden tomar cualquier valor, ya sea positivo, negativo o cero.

En ciertos casos se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto a partir de las mediciones de C-LAD, C-LBD, CT y TG, por ejemplo mediante la relación:

$$C-LMBD = \alpha CT + \beta C-LAD + \gamma C-LBD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$$

donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, C-LBD, TG y  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , respectivamente; y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente. Las constantes multiplicativas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $a_1$  y las constantes aditivas  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  pueden tomar cualquier valor, ya sea positivo, negativo o cero. Como se ha indicado más arriba y según se emplea en cualquier otra parte de la presente memoria, al término  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$  y a términos similares se les puede denominar "término cruzado", en el cual los términos de un paréntesis multiplican a los términos del otro paréntesis.

Se entenderá que, en ciertos casos, en las relaciones utilizadas para calcular C-LMBD se pueden incluir todos los términos cruzados posibles y todas las combinaciones posibles de términos cruzados. Así, por ejemplo, además de, y/o en lugar de, el término cruzado  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , en las relaciones utilizadas para calcular C-LMBD se pueden incluir cualquiera de los siguientes términos cruzados o todos ellos:  $(TG + \epsilon)(C-LAD + \mu)$ ;  $(TG + \epsilon)(C-LBD + \nu)$ ;  $(CT + \kappa)(C-LAD + \mu)$ ;  $(CT + \kappa)(C-LBD + \nu)$  y  $(C-LBD + \nu)(C-LAD + \mu)$ , donde las constantes aditivas  $\lambda$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$  y  $\nu$  pueden tomar cualquier valor, ya sea positivo, negativo o cero.

Por consiguiente, en ciertos casos, se puede calcular C-LMBD a partir de las cantidades medidas, de la siguiente manera:

$$C-LMBD = \alpha TC + \beta C-LAD + \gamma C-LBD + \delta TG + \lambda + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + a_2(TG + \epsilon)(C-LAD + \mu) + a_3(TG + \epsilon)(C-LBD + \nu) + a_4(CT + \kappa)(C-LAD + \mu) + a_5(CT + \kappa)(C-LBD + \nu) + a_6(C-LBD + \nu)(C-LAD + \mu)$$

donde los coeficientes multiplicativos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$  y  $a_6$  pueden tomar cualquier valor, ya sea positivo, negativo o cero; y

donde las constantes aditivas  $\lambda$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$  y  $\nu$  pueden tomar cualquier valor, ya sea positivo, negativo o cero.

En más realizaciones adicionales, se puede calcular el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto, a partir de otras relaciones que utilizan algunos o la totalidad de los valores medidos de CT, TG, C-LAD, y C-LBD, y constantes multiplicativas y aditivas similares en forma a las relaciones proporcionadas en lo que antecede.

Los solicitantes también describen en la presente memoria métodos, dispositivos y sistemas para medir, en un dispositivo, al menos dos atributos biológicamente relevantes de una muestra. En ciertos casos, un atributo biológicamente relevante de una muestra incluye, sin limitación, un nivel de lipoproteína que incluye CT, C-LAD, C-LBD y C-LMBD; nivel de triglicérido (TG) en sangre; hematocrito sanguíneo; contenido de hierro en sangre; velocidad de sedimentación eritrocítica (VSE); una medición citométrica (p. ej., la determinación de la presencia y/o las cantidades, incluidas las cantidades fraccionarias y/o las cantidades absolutas, de un tipo de célula o tipos de células) incluidas las basadas en anticuerpos, basadas en tintes, por citometría de flujo, por obtención de imágenes y otras mediciones de células, número de células, tipo de célula y propiedades celulares en una muestra; una medición química que incluye una medición de pH, de una concentración salina (por ejemplo, de un catión y/o anión que constituye una sal), presencia y/o concentración de una vitamina, una proteína, un metabolito de una proteína o molécula pequeña, un marcador indicativo de un estado médico y otras mediciones de sangre, orina, tejido u otra muestra biológica. Las mediciones de al menos dos atributos biológicamente relevantes de una muestra se pueden realizar simultáneamente, o bien se pueden realizar en sucesión o, cuando se realizan al menos tres mediciones de atributos biológicamente relevantes de una muestra, algunas mediciones se pueden realizar simultáneamente mientras que otras mediciones de atributos biológicamente relevantes de una muestra se pueden realizar antes o después de las mediciones que se realizan simultáneamente.

En ciertos casos, una o varias de tales mediciones pueden ser mediciones rápidas, donde una medición rápida es una que se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente una hora; o se puede realizar dentro



de un período de tiempo de aproximadamente media hora; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente un cuarto de hora; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de unos diez minutos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 5 minutos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 4 minutos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 3 minutos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 2 minutos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de unos 30 segundos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de unos 15 segundos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 10 segundos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos; o se puede realizar dentro de un período de tiempo de aproximadamente 1 segundo.

En ciertos casos, una o varias de estas mediciones se pueden realizar utilizando una muestra de sangre de pequeño volumen, o nada más que una parte de pequeño volumen de una muestra de sangre, donde una muestra de sangre de pequeño volumen y una parte de pequeño volumen de una muestra de sangre comprenden no más de aproximadamente 5 mL; o comprenden no más de aproximadamente 3 mL; o comprenden no más de aproximadamente 1 mL; o comprenden no más de aproximadamente 250  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 100  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 50  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 25  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 20  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 15  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 10  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 5  $\mu$ L; o comprenden no más de aproximadamente 1  $\mu$ L; o comprenden otro volumen pequeño, p. ej. como se describe en la presente memoria.

Los ensayos y métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en un dispositivo, o en un sistema, para procesar una muestra. Los ensayos y métodos descritos en la presente memoria se pueden incorporar y utilizar fácilmente en un dispositivo de ensayo automatizado, y en un sistema de ensayo automatizado. Por ejemplo, sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir un conjunto para comunicación destinado a transmitir o recibir un protocolo basado en el análisis a detectar (p. ej. colesterol total (CT), una subfracción de colesterol (p. ej. LBD, LAD, LMBD, etc.), triglicérido (TG), u otro análisis) o basado en otros análisis a detectar por el dispositivo o sistema. En ciertos casos se puede alterar un protocolo de ensayo en función de la programación óptima de una pluralidad de ensayos a realizar por un dispositivo, o se puede alterar en función de resultados obtenidos con anterioridad de una muestra procedente de un sujeto, o en función de resultados obtenidos con anterioridad a partir de una muestra distinta procedente del sujeto. En ciertos casos, un conjunto para comunicación puede comprender un canal para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, seleccionándose dicho canal de una red informática, una red telefónica, un enlace de comunicaciones metálico, un enlace de comunicaciones óptico y un enlace de comunicaciones inalámbrico. En ciertos casos, sistemas descritos en la presente memoria pueden transmitir señales a una ubicación central, o a un usuario final, y pueden incluir un conjunto para comunicación destinado a transmitir tales señales. Se pueden configurar sistemas descritos en la presente memoria para actualizar un protocolo según sea necesario o de forma regular.

Por consiguiente, los solicitantes describen dispositivos configurados para medir CT o una subfracción de colesterol, TG, y sus combinaciones, en una muestra de sangre, según un método descrito en la presente memoria. Se pueden configurar dispositivos configurados para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis en una muestra de sangre según un método descrito en la presente memoria, para determinar CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis a partir de una muestra de sangre que comprenda no más de aproximadamente 1.000  $\mu$ L de sangre, o no más de aproximadamente 500  $\mu$ L de sangre, no más de aproximadamente 250  $\mu$ L de sangre, o no más de aproximadamente 150  $\mu$ L de sangre, o no más de aproximadamente 100  $\mu$ L de sangre, o no más de aproximadamente 50  $\mu$ L de sangre o, en ciertos casos, en donde dicha muestra de sangre comprenda no más de aproximadamente 25  $\mu$ L de sangre, o en donde dicha muestra de sangre comprenda no más de aproximadamente 10  $\mu$ L de sangre, o en donde dicha muestra de sangre comprenda menos de aproximadamente 10  $\mu$ L de sangre. Dichos dispositivos pueden estar configurados para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis en una muestra de sangre en menos de aproximadamente una hora o, en ciertos casos, en menos de aproximadamente 40 minutos o en menos de aproximadamente 30 minutos.

Se pueden configurar dispositivos descritos en la presente memoria para realizar un ensayo para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis, y también para realizar un ensayo para medir otro análisis en la muestra de sangre. Se pueden configurar dispositivos descritos en la presente memoria para realizar un ensayo para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis, y también para realizar un ensayo que comprenda medir una característica morfológica de una célula sanguínea de la muestra de sangre. Se pueden configurar dispositivos descritos en la presente memoria para realizar un ensayo para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y análisis, y también para realizar un ensayo que comprenda medir otro análisis en la sangre, por ejemplo una vitamina, una hormona, un fármaco o metabolito de un fármaco, u otro análisis. Se pueden configurar tales dispositivos de forma que los ensayos o el orden de ejecución de los ensayos que dicho dispositivo realiza puedan verse alterados por comunicación con otro dispositivo.

Los solicitantes también describen sistemas que comprenden un dispositivo como se describe en la presente memoria. En ciertos casos, el sistema comprende un dispositivo que está configurado para realizar un ensayo para

medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y analitos, y también para realizar un ensayo para medir otro analito en la muestra de sangre. En ciertos casos, el sistema comprende un dispositivo que está configurado para realizar un ensayo para medir CT, una subfracción de colesterol, TG y otras fracciones lipídicas y analitos, y también para realizar un ensayo para medir una característica morfológica de una célula sanguínea en la muestra de sangre. En ciertos casos de tal sistema, los ensayos o el orden de ejecución de los ensayos que dicho dispositivo realiza pueden verse alterados por comunicación con otro dispositivo.

En ciertos casos de dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria, un dispositivo puede comprender un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto, y b) otro analito o atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto. En ciertos casos, dicho otro analito o atributo puede incluir TG, y puede incluir TG y un analito o atributo adicional de la sangre. En ciertos casos, se puede medir dicho otro analito o atributo en una porción de la muestra de sangre procedente del sujeto distinta a la parte usada para medir CT o una subfracción de colesterol. En ciertos casos, dicho otro analito o atributo puede medirse en la misma parte de la muestra de sangre procedente del sujeto utilizada para medir CT o una subfracción de colesterol. En ciertos casos, un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro analito o atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto, puede comprender: medios para combinar un primer reactivo con al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto, que permitan proporcionar una solución combinada; medios para combinar un segundo reactivo con dicha solución combinada para proporcionar una solución coloreada; medios para medir una propiedad óptica de dicha solución coloreada; medios para visualizar o notificar los resultados de dicha medición de dicha propiedad óptica de dicha solución coloreada; y medios para medir otro atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto. En ciertos casos, dicho otro atributo puede incluir TG, y puede incluir TG y un atributo adicional de la sangre. En ciertos casos, un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto, puede estar configurado para, y ser capaz de, realizar dos o más cualesquiera de una pluralidad de mediciones sobre una muestra, tal como una muestra de sangre. En ciertos casos de un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto, dichas mediciones pueden ser seleccionables, para permitir que se seleccionen algunas o la totalidad de una pluralidad de mediciones para medir una primera muestra, y se puede seleccionar una selección diferente de algunas o todas de dicha pluralidad de mediciones para mediciones a realizar sobre una segunda muestra. En ciertos casos, dicho otro atributo puede incluir TG, y puede incluir TG y un atributo adicional de la sangre.

En casos adicionales, un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto, puede comprender: una cámara para combinar un primer reactivo con al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto, que permita proporcionar una solución combinada; un conducto para combinar un segundo reactivo con dicha solución combinada para proporcionar una solución coloreada; un detector óptico para medir una propiedad óptica de dicha solución coloreada; una centrifugadora y un elemento de visualización o un enlace de comunicación para notificar los resultados de dicha medición de dicha propiedad óptica de dicha solución coloreada. En ciertos casos, dicho otro analito o atributo puede incluir TG, y puede incluir TG y un analito o atributo adicional de la sangre. En ciertos casos de tal dispositivo, se puede configurar el dispositivo para, y ser capaz de, realizar dos o más de una pluralidad de mediciones sobre la muestra. En ciertos casos de tal dispositivo, dichas mediciones pueden ser seleccionables, para permitir que se seleccionen algunas o todas de una pluralidad de mediciones para medir una primera muestra, y se puede seleccionar una selección diferente de algunas o todas de dicha pluralidad de mediciones para mediciones a realizar sobre una segunda muestra.

Sistemas para medir colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre, y otro atributo biológicamente relevante de dicha muestra de sangre procedente de un sujeto, pueden incluir un dispositivo para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro analito o atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto. En ciertos casos, dicho otro analito o atributo pueden incluir TG, y pueden incluir TG y un analito o atributo adicional de la sangre. En ciertos casos, tal sistema comprende un dispositivo para medir tanto a) como b), como se describe en la presente memoria, y un medio para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, una red informática, un teléfono, una red telefónica o un dispositivo configurado para visualizar información comunicada desde dicho dispositivo. En ciertos casos, un sistema para medir tanto a) CT o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre procedente de un sujeto como b) otro analito o atributo de dicha muestra de sangre procedente del sujeto, comprende un dispositivo como se describe en la presente memoria y un canal para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, dicho canal está seleccionado de una red informática, una red telefónica, un enlace de comunicaciones metálico, un enlace de comunicaciones óptico y un enlace de comunicaciones inalámbrico. Sistemas como los descritos en la presente memoria pueden comprender un dispositivo configurado para, y capaz de, realizar dos o más cualesquiera de una pluralidad de mediciones sobre la muestra. En ciertos casos de sistemas que comprenden tal dispositivo, dichas mediciones pueden ser seleccionables, para permitir que se seleccionen algunas o todas de una pluralidad de mediciones para medir una primera muestra, y se puede seleccionar una selección diferente de algunas o todas de dicha pluralidad de

mediciones para mediciones a realizar sobre una segunda muestra.

Casos de sistemas para medir colesterol total o una subfracción de colesterol en al menos una parte de una muestra de sangre, y otro analito o atributo biológicamente relevante a partir de dicha muestra de sangre procedente de un sujeto, pueden incluir un dispositivo como el descrito en la patente de EE. UU. 8.088.593 o la solicitud de EE. UU. n.º 13/244.947, presentada el 26 de septiembre de 2011, ambas incorporadas en su totalidad en la presente memoria por referencia, a todos los fines, y pueden incluir sistemas como los descritos en las mismas. Por ejemplo, sistemas como los descritos en la presente memoria pueden incluir un conjunto para comunicación destinado a transmitir o recibir un protocolo basado en el analito a detectar o basado en otros analitos a detectar por el dispositivo o sistema. Por ejemplo, en ciertos casos se puede alterar un protocolo de ensayo basándose en la programación óptima de una pluralidad de ensayos a realizar por un dispositivo, o se puede alterar basándose en resultados obtenidos con anterioridad de una muestra de un sujeto, o basándose en resultados obtenidos con anterioridad de una muestra distinta procedente del sujeto. En ciertos casos, un conjunto para comunicación puede comprender un canal para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador, en donde dicho canal se selecciona de una red informática, una red telefónica, un enlace de comunicaciones metálico, un enlace de comunicaciones óptico y un enlace de comunicaciones inalámbrico. En ciertos casos, sistemas como los descritos en la presente memoria pueden transmitir señales a una ubicación central, o a un usuario final, y pueden incluir un conjunto para comunicación destinado a transmitir tales señales. Se pueden configurar sistemas como los descritos en la presente memoria para actualizar un protocolo según sea necesario o de forma regular.

Ensayos, métodos, reactivos, kits, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria brindan ventajas sobre ensayos, métodos, reactivos, kits y sistemas anteriores al permitir la medición rápida y barata de colesterol y subfracciones de colesterol en un único ensayo. Los métodos y ensayos descritos en la presente memoria permiten medir múltiples fracciones lipoproteicas sobre la misma muestra de sangre, o en la misma parte de una muestra de sangre; por ejemplo, se pueden medir C-LAD, C-LBD y CT en la misma muestra de sangre o en la misma parte de una muestra de sangre. Estas mediciones se realizan sin precipitación sustancial de lipoproteínas en la muestra o parte de muestra. El hecho de proporcionar las mediciones deseadas en un único ensayo simplifica los procedimientos, reduce la probabilidad de error, reduce la variabilidad de los resultados y permite procedimientos más rápidos y más baratos. Los ensayos, métodos, reactivos, kits y sistemas descritos consiguen reducir el número de ensayos necesarios para determinar CT, C-LAD, C-LBD y otras subfracciones de colesterol y componentes lipoproteicos de la sangre (p. ej. C-LMBD y TG). Por consiguiente, los ensayos, métodos, reactivos, kits, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria proporcionan mejoras sobre la técnica.

Métodos y composiciones descritos en la presente memoria proporcionan ensayos rápidos que requieren solo pequeñas cantidades de muestra, tales como solo pequeñas cantidades de sangre. El dispositivo y sistemas descritos en la presente memoria están configurados para realizar tales ensayos rápidos que requieren solo pequeñas cantidades de muestra, tales como solo pequeñas cantidades de sangre. Por consiguiente, los métodos, composiciones, dispositivos y sistemas proporcionan ensayos rápidos, que requieren solo pequeñas muestras biológicas, y por lo tanto proporcionan ventajas adicionales sobre otros métodos, composiciones, ensayos, dispositivos y sistemas por requerir solo pequeñas muestras biológicas y por proporcionar ensayos rápidos.

Este Compendio se ofrece para introducir de una forma simplificada una selección de conceptos que se describen a continuación en la Descripción detallada. No se pretende que este Compendio identifique características clave o características esenciales de la materia reivindicada, ni se pretende utilizarlo para limitar el alcance de la materia reivindicada.

### Descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra un esquema de reacción ilustrativo donde ésteres de colesterol (p. ej., como se encuentran en lipoproteínas de una muestra de sangre) pueden reaccionar con una colesterol esterasa para formar colesterol, que puede reaccionar con una colesterol oxidasa y oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de peroxidasa de rábano picante y colorantes tales como un aminoantipireno (p. ej., 4-aminoantipireno) y un compuesto que contenga anilina (p. ej., N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina) puede reaccionar para formar un producto coloreado (p. ej., un tinte de Trinder (p. ej., quinonaimina) como se indica en la Figura).

La Figura 1B muestra un esquema de reacción ilustrativo donde pueden reaccionar triglicéridos (p. ej., como se encuentran en una muestra de sangre) con una lipasa para formar glicerol y ácidos grasos. El glicerol puede ser fosforilado, en presencia de adenosintrifosfato (ATP), por una glicerol cinasa, y el glicerolfosfato resultante puede ser oxidado por glicerol-3-fosfato oxidasa para proporcionar dihidroxiacetonafofato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de peroxidasa de rábano picante y colorantes tales como un aminoantipireno (p. ej., 4-aminoantipireno) y un compuesto que contiene anilina (p. ej., N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina) para formar un producto coloreado (p. ej., un tinte de quinonaimina o tinte de Trinder, como se indica en la Figura).

La Figura 2 representa gráficamente valores de lípidos en muestras encontrados en lipoproteínas, mostrando los valores de lípidos en unidades de miligramos por decilitro (mg/dL) a lo largo del eje vertical, frente a colesterol total (expresado como mg/dL) a lo largo del eje horizontal, donde el valor de lípidos y el colesterol total han sido medidos

utilizando reactivos y métodos de Advia® Chemistry Systems (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Tarrytown, NY).

La Figura 3 representa gráficamente cinéticas de ensayo para un experimento ilustrativo, donde se midió mediante espectrofotometría la diferencia en la absorbancia lumínica de una solución que contiene muestra, reactivo A y reactivo B, a una longitud de onda de 560 nanómetros (nm) y a una longitud de onda de 700 nm ("Absorbancia (A560-A700 nm)"). La absorbancia a una longitud de onda de 560 nm se determinó midiendo la absorbancia entre 550 nm y 570 nm; la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm se determinó midiendo la absorbancia entre 690 nm y 710 nm. El tiempo mostrado en el eje horizontal es el tiempo en minutos después de la adición del reactivo B (la composición del reactivo B se describe en la Tabla 2).

La Figura 4 muestra mediciones de C-LBD (4A), C-LAD (4B) y CT (4C) utilizando los datos cinéticos de un único ensayo ilustrativo como se describe en la presente memoria, y representa gráficamente los valores notificados de C-LBD, C-LAD y CT, determinados mediante un ensayo como se describe en la presente memoria (donde el reactivo A es como se describe en la Tabla 1 y el reactivo B es como se describe en la Tabla 2) a lo largo del eje vertical (en unidades de mg/dL) frente a los valores de C-LBD, C-LAD y CT (en mg/dL) determinados mediante el ensayo de sulfato de dextrano utilizando el ensayo Siemens Direct. El punto inicial cercano a (0,0) en las Figuras 4A y 4C no representa datos experimentales, pero se ha incluido en el análisis y en las Figuras para mayor claridad y con el fin de proporcionar un punto de anclaje para las líneas ajustadas. Figura 4A: resultados de C-LBD (que muestran la diferencia en la absorbancia medida a 6 minutos menos la absorbancia medida a 2 minutos); Figura 4B: resultados de C-LAD; Figura 4C: resultados de CT, absorbancia medida a 10 minutos.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo para triglicérido ilustrativo como se describe en el Ejemplo 3, que utiliza reactivo AT y reactivo BT. Los niveles de triglicérido obtenidos utilizando los presentes métodos novedosos se presentan como valores en el eje Y de cada rombo de la figura, y se representan gráficamente frente a mediciones de triglicérido realizadas utilizando un método de la técnica anterior (el valor del eje X de cada rombo). Los datos han sido ajustados a una línea recta que tiene una pendiente cercana a 1 (0,9536); el valor R<sup>2</sup> del ajuste por mínimos cuadrados fue 0,9537.

La Figura 6 muestra comparaciones de valores de C-LMBD, donde se representan gráficamente a lo largo del eje vertical los valores de C-LMBD obtenidos mediante métodos de la técnica anterior (ultracentrifugación) y valores de C-LMBD obtenidos a partir de cálculos basados en las mediciones de C-LAD, CT y TG como se describe en la presente memoria. En las figuras se muestran R al cuadrado (R<sup>2</sup>) y otros valores que indican la bondad del ajuste. Para los resultados de las mediciones mostradas en la Figura 6, C-LMBD se calculó mejor por la relación:

$$\text{C-LMBD} = 0,152 \times \text{CT} + 0,15 \times \text{TG} - 0,549 \times \text{C-LAD} + 0,0015 \times (\text{TG} - 192) \times (\text{CT} - 188) - 2,62$$

(donde "x" indica multiplicación). Como se indica en la Figura 6, para los 20 puntos de datos que se muestran en la Figura, los valores de C-LMBD calculados según los métodos descritos en la presente memoria, es decir, mediante la ecuación antedicha, coincidieron muy bien con los valores de C-LMBD obtenidos por métodos de ultracentrifugación (R al cuadrado vale 0,959).

### Descripción detallada

Los solicitantes han encontrado que se pueden obtener valores muy precisos y exactos para CT, C-LBD y C-LAD en un único ensayo para colesterol empleando mediciones cinéticas. Los ensayos descritos en la presente memoria pueden utilizar una lipasa, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y una peroxidasa para formar un producto coloreado medible mediante espectrofotometría. En los ensayos descritos en la presente memoria, el color formado a partir de todas las especies que contienen colesterol es directamente proporcional a la cantidad de colesterol convertido.

Por ejemplo, se pueden encontrar la descripción y puesta en conocimiento de ejemplos de reactivos, ensayos, métodos, kits, dispositivos y sistemas que se pueden emplear como se describe en la presente memoria, en la patente de EE. UU. 8.088.593; la solicitud de EE. UU. con n.º de serie 13/244.947; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/673.037; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/673.245; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/675.758; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/675.811; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/676.178; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/697.797; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/705.552; solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/706.753 y solicitud de EE. UU. con n.º de serie 61/735.424, cuyas divulgaciones de las patentes y solicitudes de patente se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

### Definiciones

Antes de que se den a conocer y se describan las presentes formulaciones y métodos de uso, debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene exclusivamente el propósito de describir casos particulares, y no pretende ser limitante. También debe entenderse que la presente descripción proporciona descripciones y ejemplos explicativos e ilustrativos, de modo que, salvo que se indique otra cosa, los ensayos, reactivos, métodos, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria no están limitados a los casos específicos descritos en la presente memoria.

Debe señalarse que, según se utilizan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/uno/una" y "el/la" incluyen referentes plurales, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un tensioactivo" se refiere a un único tensioactivo o a mezclas de distintos tensioactivos, y lo mismo en casos análogos.

- 5 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen se hará referencia a una serie de términos y expresiones, que se definirán con los siguientes significados:

Según se emplea en la presente memoria, el término "sustancial" significa más que una cantidad mínima o insignificante; y "sustancialmente" significa más que mínimamente o de manera insignificante. Así, por ejemplo, la frase "sustancialmente distinto", según se emplea en la presente memoria, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene significancia estadística dentro del contexto de la característica medida por dichos valores. Así, la diferencia entre dos valores que son sustancialmente distintos entre sí es típicamente mayor que aproximadamente 10%, y puede ser mayor que aproximadamente 20%, opcionalmente mayor que aproximadamente 30%, opcionalmente mayor que aproximadamente 40%, opcionalmente mayor que aproximadamente 50%, en función del valor de referencia o valor comparador.

Según se emplean en la presente memoria, los términos "zwitteriónico" y "dipolar" se refieren en cada caso a moléculas que tienen grupos cargados de polaridad opuesta.

Según se emplea en la presente memoria, el término "anfífilo" se refiere a un compuesto o compuestos que tienen propiedades tanto hidrófobas como hidrófilas; típicamente, una molécula anfífila tiene una parte hidrófoba y tiene también una parte hidrófila. Una parte hidrófoba de una molécula puede ser una parte no polar, parte relativamente insoluble en agua, tal como una parte de cadena de hidrocarburo. Una parte hidrófila de una molécula puede ser una parte polar, parte relativamente soluble en agua, y puede incluir un resto ácido o básico capaz de ganar o perder una carga en solución acuosa. Los tensioactivos son típicamente compuestos anfífilos. Los compuestos anfífilos ilustrativos, disponibles comercialmente, incluyen tensioactivos Triton™, polietilensorbitanos tales como los compuestos TWEEN® y poloxámeros (p. ej., copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno) tales como compuestos Pluronic®.

Según se emplea en la presente memoria, un "tensioactivo" es un compuesto eficaz para reducir la tensión superficial de un líquido, tal como el agua. Un tensioactivo es típicamente un compuesto anfífilo, que posee propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas, y puede ser eficaz para ayudar a la solubilización de otros compuestos. Un tensioactivo puede ser, por ejemplo, un tensioactivo hidrófilo, un tensioactivo lipófilo u otro compuesto, o mezclas de los mismos. Algunos tensioactivos comprenden sales de bases o ácidos alifáticos de cadena larga, o restos hidrófilos tales como azúcares. Los tensioactivos incluyen compuestos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos (donde la expresión "no iónico" se refiere a una molécula que no se ioniza en solución, es decir, es "iónicamente" inerte). Por ejemplo, tensioactivos útiles en los reactivos, ensayos, métodos, kits, y para su uso en los dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, tensioactivos no iónicos Tergitol™ y tensioactivos aniónicos Dowfax™ (Dow Chemical Company, Midland, Michigan 48642); polisorbatos (polioxietilensorbitanos), p. ej., polisorbato 20, polisorbato 80, p. ej., comercializados como tensioactivos TWEEN® (ICI Americas, New Jersey, 08807); poloxámeros (p. ej., copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno) tales como compuestos Pluronic® (BASF, Florham Park, NJ); polietilenglicoles y sus derivados, entre ellos tensioactivos Triton™ (p. ej., Triton™ X-100; Dow Chemical Company, Midland, Michigan 48642) y otros polietilenglicoles, entre ellos laurato de PEG-10, laurato de PEG-12, laurato de PEG-20, laurato de PEG-32, dilaurato de PEG-32, oleato de PEG-12, oleato de PEG-15, oleato de PEG-20, dioleato de PEG-20, oleato de PEG-32, oleato de PEG-200, oleato de PEG-400, estearato de PEG-15, diestearato de PEG-32, estearato de PEG-40, estearato de PEG-100, dilaurato de PEG-20, gliceritrioleato de PEG-25, dioleato de PEG-32, gliceril-laurato de PEG-20, gliceril-laurato de PEG-30, glicerilestearato de PEG-20, gliceriloleato de PEG-20, gliceriloleato de PEG-30, gliceril-laurato de PEG-30, gliceril-laurato de PEG-40, aceite de palmiste-PEG-40, aceite de ricino hidrogenado-PEG-50, aceite de ricino-PEG-40, aceite de ricino-PEG-35, aceite de ricino-PEG-60, aceite de ricino hidrogenado-PEG-40, aceite de ricino hidrogenado-PEG-60, aceite de maíz-PEG-60, glicéridos de caprato/caprilato-PEG-6, glicéridos de caprato/caprilato-PEG-8, laurato de poliglicerilo-10, colesterol-PEG-30, fitoesterol-PEG-25, esteroles de soja-PEG-30, trioleato de PEG-20, oleato de sorbitán-PEG-40, laurato de sorbitán-PEG-80, polisorbato 20, polisorbato 80, lauril-éter de POE-9, lauril-éter de POE-23, oleil-éter de POE-10, oleil-éter de POE-20, estearil-éter de POE-20, succinato de tocoferilo-PEG-100, colesterol-PEG-24, oleato de poliglicerilo-10, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, series de nonilfenol-PEG 10-100, series de octilfenol-PEG 15-100, y poloxámeros; alquil-éteres de polioxialquilen tales como alquil-éteres de polietilenglicol; polioxialquilen-alquilfenoles tales como polietilenglicol-alquilfenoles; ésteres de ácido graso de polioxialquilen-alquilfenol tales como monoésteres de ácido graso de polietilenglicol y diésteres de ácido graso de polietilenglicol; ésteres de ácido graso de polietilenglicol-glicerol; ésteres de ácido graso de poliglicerol; ésteres de ácido graso de polioxialquilen-sorbitán tales como ésteres de ácido graso de polietilenglicol-sorbitán; fosfocolinas, tales como n-dodecilsfosfocolina (DDPC); dodecilsulfato de sodio (SDS); n-laurilsarcosina; n-dodecil-N,N-dimetilamina-N-óxido (LADO); n-dodecil-β-D-maltósido (DDM); decilmaltósido (DM), n-dodecil-N,N-dimetilamina-N-óxido (LADO); n-decil-N,N-dimetilamina-N-óxido, 1,2-diheptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC); 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC); 2-metacriloiloxietilfosforilcolina (MPC); 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (LOPC); 1-palmitoil-2-

hidroxi-sn-glicero-3-[fosfo-RAC-(1-glicerol)] (LLPG); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); n-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; tetradecanoilamidopropil-dimetilamonio-propanosulfonato; hexadecanoilamidopropil-dimetilamonio-propanosulfonato; sulfobetaína de 4-n-octilbenzoilamidopropil-dimetilamonio; un derivado de 3-(dimetilamino)-1-propilamina de poli(anhídrido maleico-alt-1-tetradeceno); un tensioactivo de nonilfenoxilpolietoxilanol (NP40); sales de alquilamonio; sales de ácido fusídico; derivados de ácido graso de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; derivados de glicérido de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; lecitinas y lecitinas hidrogenadas, entre ellas lecitina, lisolecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina; lisolecitinas y lisolecitinas hidrogenadas; fosfolípidos y derivados de los mismos; lisofosfolípidos y derivados de los mismos, entre ellos lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, lisofosfatidilserina, PEG-fosfatidiletanolamina, PVP-fosfatidiletanolamina; sales de éster de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácido graso; docusato de sodio; lactilatos de acilo; ésteres de ácido tartárico mono- y diacetilado de mono- y diglicéridos; mono- y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos; ésteres lactílicos de ácidos grasos, estearoil-2-lactilato, estearoil-lactilato, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico mono/diacetilado de mono/diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono/diglicéridos, colilsarcosina, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, ricinoleato, linoleato, linolenato, estearato, laurilsulfato, teradecilsulfato, docusato, lauroilcarnitinas, palmitoilcarnitinas, miristoilcarnitinas, y sales y mezclas de los mismos; alquilmaltósidos; alquiltiogluósidos; macrogolglucéridos de laurilo; productos hidrófilos de transesterificación de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; esteroides de polioxietileno, derivados y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y derivados de las mismas; copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; y mezclas de los mismos; alcoholes grasos; ésteres de ácido graso de glicerol; ésteres de ácido graso de glicerol acetilado; ésteres de ácido graso de alcohol inferior; ésteres de ácido graso de propilenglicol; ésteres de ácido graso de sorbitán; ésteres de ácido graso de polietilenglicol-sorbitán; esteroides y derivados de esteroles; esteroides polioxietilados y derivados de esteroles; alquil-ésteres de polietilenglicol; ésteres de azúcar; ésteres de azúcar; derivados de ácido láctico de mono- y diglicéridos; productos hidrófobos de transesterificación de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; vitaminas/derivados de vitamina oleosolubles; y combinaciones de los mismos.

Según se emplea en la presente memoria, el término "solubilizar" se refiere a disolver una molécula en una solución.

La expresión "agente de solubilización de lipoproteína", según se emplea en la presente memoria, se refiere a agentes que ayudan a mantener partículas de lipoproteína en solución. Los compuestos anfífilos, tales como los tensioactivos, pueden ser adecuados para su uso como agentes de solubilización de lipoproteína en los reactivos, ensayos, métodos y kits descritos en la presente memoria, y en los dispositivos y sistemas para la práctica de tales métodos.

Según se emplea en la presente memoria, un "colorante" es un compuesto (que puede actuar solo o con otros compuestos) que es útil para alterar una propiedad óptica de una solución, o para proporcionar una nueva propiedad óptica a una solución. Por ejemplo, un colorante puede ser un tinte, un cromóforo, un compuesto cromógeno, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un compuesto fluorogénico (tal como, p. ej., Amplex Red), una nanopartícula tal como un punto cuántico u otro elemento o compuesto que altera las propiedades ópticas de una solución. Por ejemplo, un colorante puede actuar para, o puede participar en una reacción para, alterar una propiedad óptica de una solución a la que se añade, o para proporcionar o producir un producto luminiscente, fluorescente u otro producto ópticamente activo en la solución. Una propiedad óptica de una solución puede ser, por ejemplo, el color de una solución; la absorbancia de una solución a una particular longitud de onda luminosa, rango de longitudes de onda o combinación de longitudes de onda; la cantidad de la luminiscencia o fluorescencia de una solución o su longitud de onda de pico; la turbidez de una solución o cualquier otra propiedad de una solución que afecte a la reflexión o la absorción de luz por una solución. Según se emplea en la presente memoria, el término "colorante" se refiere también a un compuesto o resultado de una reacción que puede alterar la turbidez de una solución o la claridad de una solución. Un colorante puede actuar para, o puede participar en una reacción para, alterar la absorbancia de la luz a través de una solución a la que se añade el colorante. Se entenderá que "un colorante" puede referirse a una molécula o clase de moléculas, o puede referirse a un par de moléculas o clases de moléculas que pueden actuar juntas para alterar una propiedad óptica de una solución, o puede referirse a múltiples moléculas o clases de moléculas que pueden actuar juntas para alterar una propiedad óptica de una solución.

Una peroxidasa que participa en una reacción con su o sus sustratos para formar un producto coloreado es un colorante, al igual que los sustratos de la peroxidasa. Por ejemplo, el colorante peroxidasa de rábano picante (HRP) participa en una reacción con una cualquiera o varias de diversas moléculas que consiguen alterar las propiedades ópticas de una solución a la cual se añade HRP (por ejemplo, cambiando el color, la absorbancia de la luz a través de una solución a la que se ha añadido HRP y/u otras propiedades ópticas de la solución). Por ejemplo, la HRP puede reaccionar con un compuesto que contenga anilina, tal como N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), o con un compuesto de aminoantipireno tal como 4-aminoantipireno o con compuestos fenólicos. Así, por ejemplo, a una peroxidasa (p. ej., HRP, mieloperoxidasa u otra peroxidasa), a un compuesto que contiene anilina y a un aminoantipireno se les puede denominar a todos ellos "colorantes". En ejemplos adicionales, la HRP puede reaccionar con un compuesto que contiene bencidina (p. ej., con diaminobenzidina (DAB));

tetrametilbencidina (TMB); ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (DABS); ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB); hidroquinona; o-toluidina; o-fenilendiamina; o-clorofenol; p-hidroxibencenosulfonato; p-anisidina; un reactivo de Trinder (tal como 4-aminoantipireno, metilbenzotiazolinonahidrazona (MBTH), u otro compuesto para producir un tinte de Trinder); y derivados y compuestos relacionados) para formar un producto coloreado. La HRP u otra peroxidasa también pueden reaccionar con otros compuestos para formar un producto quimioluminiscente; por ejemplo, la HRP u otra peroxidasa pueden reaccionar con luminol para formar un producto quimioluminiscente (pueden estar presentes otras moléculas, y pueden intensificar tales reacciones; por ejemplo, la producción de productos luminiscentes a partir de luminol mediada por HRP se intensifica en presencia de 4-yodofenol). Otros colorantes incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina; resazurina (7-hidroxi-3*H*-fenoxazin-3-ona-10-óxido); 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red) y compuestos similares (p. ej., Amplex UltraRed (A36006 de Life Technologies, Carlsbad, CA 92008); compuestos de resorrufina (p. ej., 7-etoxirresorrufina); tintes tales como, p. ej., fluoresceína, calceína, rodamina y tintes de etidio; *N*-metil-4-hidrazino-7-nitrobenzofurazano; ésteres de acridinio (ácido acridin-9-carboxílico) y compuestos que reaccionan con estos compuestos para alterar una propiedad óptica de una solución; fenoles y derivados fenólicos (p. ej., p-yodofenol y p-fenilfenol); aminas luminiscentes, entre ellas aductos de amina (p. ej., que pueden derivarse del cianuro de cobre) y otras moléculas. Se entenderá que se pueden utilizar otras enzimas y reactivos para formar productos coloreados o para detectar colesterol en una muestra de sangre.

Según se emplean en la presente memoria, las expresiones "formación de producto", "producto coloreado", "formación de producto coloreado" y similares se utilizan para referirse al acto de, y a los productos que resultan de, la adición de un colorante a una solución. Por ejemplo, la adición de un colorante a una solución puede dar como resultado una reacción capaz de modificar una propiedad óptica de la solución. Tal reacción puede dar como resultado la formación de moléculas originalmente no presentes en la solución, o puede dar como resultado la agregación de moléculas o compuestos previamente presentes en la solución, o puede dar como resultado la degradación u otra alteración de moléculas o compuestos previamente presentes en la solución, que consigan alterar el color, la absorbancia y/u otras propiedades ópticas de una solución a la que se ha añadido un colorante.

Una muestra, según se emplea en la presente memoria, es un espécimen biológico obtenido de un sujeto, y puede ser, sin limitación, una muestra de sangre, una muestra de orina, un frotis de garganta o de mejilla, una muestra de tejido, una muestra de líquido cefalorraquídeo u otra muestra que se pueda obtener de un sujeto. Según se emplea en la presente memoria, la expresión "una muestra" incluye un espécimen biológico completo e incluye una porción o una parte alícuota de un espécimen biológico, tal como una extracción de sangre tomada de un sujeto. Típicamente, una muestra se toma para el análisis, por ejemplo para determinar uno o varios atributos biológicamente relevantes tales como, p. ej., colesterol total y/u otra medición de lipoproteína; nivel de triglicérido (TG) en sangre; hematocrito; pH, nivel de glucosa; nivel de ácido úrico; concentración de sal (por ejemplo, de un catión y/o anión que constituye una sal); contenido de hierro en sangre; velocidad de sedimentación eritrocítica (VSE); una medición citométrica (por ejemplo, tamaño celular, densidad celular, morfología celular, tipo celular, detección de marcadores y atributos en la superficie celular y/o intracelulares, etc.); una medición química que incluye una medición de la presencia y/o concentración de una vitamina, una proteína, un metabolito de una proteína o molécula pequeña y otras mediciones de sangre, orina, tejido u otra muestra biológica.

Una muestra, tal como una muestra de sangre, o una parte de una muestra de sangre, puede tener cualquier tamaño o volumen adecuado, y opcionalmente tiene tamaño o volumen pequeño. En algunos casos de los ensayos y métodos descritos en la presente memoria, las mediciones se pueden realizar utilizando una muestra de sangre de pequeño volumen, o nada más que una parte de pequeño volumen de una muestra de sangre, donde un pequeño volumen comprende no más de aproximadamente 5 mL; o comprende no más de aproximadamente 3 mL; o comprende no más de aproximadamente 2 mL; o comprende no más de aproximadamente 1 mL; o comprende no más de aproximadamente 500  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 250  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 100  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 75  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 50  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 35  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 25  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 20  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 15  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 10  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 8  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 6  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 5  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 4  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 3  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 2  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 1  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,8  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,5  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,3  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,2  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,1  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,05  $\mu$ L; o comprende no más de aproximadamente 0,01  $\mu$ L.

Según se emplea en la presente memoria, el término "lipoproteínas" y la expresión "partículas de lipoproteína" incluyen, sin limitación, quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad (LMBD), lipoproteína de baja densidad (LBD) y lipoproteína de alta densidad (LAD). Las lipoproteínas contienen, entre sus múltiples componentes, triglicéridos (TG) y colesterol, incluidos ésteres de colesterol y otras formas de colesterol. Al colesterol (en todas sus formas) dentro de o unido a lipoproteína se le denomina C-LMBD, C-LBD y C-LAD, respectivamente. El colesterol total (CT) de una muestra de sangre incluye las subfracciones de colesterol C-LMBD, C-LBD y C-LAD.

Según se emplean en la presente memoria, las expresiones "precipitación de lipoproteína", "precipitación de lipoproteínas" y similares se refieren a la agregación de lipoproteínas (p. ej., por exposición a cationes divalentes tales como iones de magnesio en presencia de polímeros cargados negativamente, p. ej., polisacáridos cargados negativamente tales como sulfato de dextrano) y también puede referirse a la centrifugación u otra acción para separar adicionalmente lipoproteínas de otros componentes de la sangre. Puede producirse precipitación sustancial de lipoproteínas cuando se agrega o se precipita una fracción grande, tal como mayor que aproximadamente 75%, o mayor que aproximadamente 80%, o mayor que aproximadamente 85%, o mayor que aproximadamente 90%, o mayor que aproximadamente 95%, o mayor que aproximadamente 99% de las lipoproteínas de una muestra de sangre.

Según se emplea en la presente memoria, la expresión "interactuante con lipoproteína" se refiere a un compuesto, o par o grupo de compuestos, que pueden actuar para agregar y/o precipitar lipoproteínas de una solución. Sin embargo, se entenderá que la expresión "interactuante con lipoproteína" se utiliza en la presente memoria como un identificador, y que el uso o la inclusión de tales compuestos no requiere la precipitación de lipoproteínas en una solución o durante un ensayo en el que puedan estar presentes interactuantes con lipoproteína. Una forma ilustrativa de interacción con una lipoproteína es la mediada por cationes, tales como el magnesio y otros cationes divalentes, donde un polímero cargado negativamente, tal como un polisacárido cargado negativamente (por ejemplo, un sulfato de dextrano) se asocia con una lipoproteína a través de los cationes cargados. Así, se pueden denominar "interactuantes con lipoproteína" a cationes tales como, por ejemplo, magnesio (típicamente en forma de  $MgCl_2$ ). Otros interactuantes con lipoproteína incluyen, sin limitación, dextranos, ciclodextrinas, ácido fosfowolfrámico, sales de ácido fosfowolfrámico (p. ej., fosfowolframato de sodio, incluido fosfowolframato de sodio con cloruro de magnesio), poli(sulfato de vinilo), heparinas, heparina con cloruro de manganeso, polietilenglicoles (p. ej., polietilenglicol (PEG) 6000), y anticuerpos (tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos anti-apolipoproteína-B). Con métodos de centrifugación en ensayos de lipoproteína se utilizan típicamente anticuerpos.

Se pueden obtener dextranos, por ejemplo como sulfato de dextrano, para uso en métodos y reactivos como se describen en la presente memoria. Se pueden obtener ciclodextrinas, tales como  $\alpha$ -ciclodextrinas, por ejemplo como sulfato de ciclodextrina, para uso en métodos y reactivos como se describen en la presente memoria. En algunos métodos de la técnica anterior, se pueden precipitar lipoproteínas en una muestra de sangre mediante concentraciones relativamente bajas de sulfato de dextrano y concentraciones relativamente altas de cloruro de magnesio (p. ej., sulfato de dextrano 0,182  $\mu M$  y  $MgCl_2$  32 mM, como describen Kimberly *et al.* (*Clinical Chemistry* 45(10):18803-1812 (1999)).

Según se emplea en la presente memoria, el término "dextrano" se refiere a cualquier forma de un glucano complejo y ramificado (es decir, un polisacárido constituido por muchas moléculas de glucosa) compuesto por cadenas de polisacárido de distintas longitudes. Los enlaces entre moléculas de glucosa a lo largo de tramos rectos de las cadenas de polisacárido (por ejemplo, entre ramas) son típicamente enlaces  $\alpha$ -1,6 glicosídicos, mientras que los enlaces de ramificación entre moléculas de glucosa son típicamente enlaces  $\alpha$ -1,3 glicosídicos. Los tamaños y pesos moleculares de los dextranos varían ampliamente; por ejemplo, las cadenas de polisacárido del dextrano pueden tener longitudes muy variables, y los dextranos presentan una gran variación en su peso molecular (p. ej., desde aproximadamente 3 kilodaltons (kD) hasta aproximadamente 2.000 kD o más). Según se emplea en la presente memoria, el término "dextrano" incluye ésteres y sales de dextrano tales como, por ejemplo, sales de sulfato de dextrano, sales de acetato de dextrano, sales de propionato de dextrano, sales de succinato de dextrano, y otras sales de dextrano.

Se entenderá que una molécula de dextrano se puede encontrar, o se puede proporcionar, en una mezcla heterogénea que contenga distintas moléculas de dextrano, cada una de las cuales puede tener una estructura distinta y/o un peso molecular distinto al de otras moléculas de dextrano en una composición de dextrano tal como una composición a granel de dextrano. Según se emplean en la presente memoria, las expresiones "peso molecular de dextrano", "peso molecular de un dextrano" y expresiones similares se refieren al peso molecular medio de las moléculas de dextrano en una composición a granel de dextrano, y no sugiere que la totalidad, ni incluso la mayoría, de las moléculas de dextrano de una composición a granel de dextrano tengan el peso molecular particular identificado como "peso molecular del dextrano". Por tanto, se entenderá que el peso molecular de un dextrano se refiere a un valor medio atribuido a una composición a granel que comprende una mezcla heterogénea de moléculas de dextrano que pueden variar en peso y estructura.

Según se emplea en la presente memoria, la expresión "dextrano de bajo peso molecular" se refiere a un dextrano en el cual el peso molecular de dextrano es inferior a aproximadamente 100 kilodaltons (kD), y típicamente es inferior a aproximadamente 75 kD; en ciertos casos, un dextrano de bajo peso molecular puede tener un peso molecular entre aproximadamente 25 kD y aproximadamente 75 kD, o entre aproximadamente 40 kD y aproximadamente 60 kD. En ciertos casos, un dextrano de bajo peso molecular puede tener un peso molecular de aproximadamente 50 kD.

Según se emplea en la presente memoria, el término "ciclodextrina" se refiere a cualquier polisacárido cíclico, p. ej., un compuesto cíclico formado por moléculas de azúcar. El número de moléculas de azúcar en el anillo de una ciclodextrina puede variar; por ejemplo, a las ciclodextrinas que tienen seis azúcares en un anillo se las denomina  $\alpha$ -ciclodextrinas; a las que tienen anillos de siete miembros se las denomina  $\beta$ -ciclodextrinas y a las ciclodextrinas



que tienen ocho moléculas de azúcar en un anillo se las denomina  $\gamma$ -ciclodextrinas.

Según se emplea en la presente memoria, un "polímero cargado negativamente" es cualquier molécula orgánica que contiene unidades repetidas y que tiene una carga negativa en solución acuosa a pH casi neutro (p. ej., un pH entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 9, opcionalmente entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8). Por ejemplo, el poli(sulfato de vinilo) es un polímero cargado negativamente. Otros polímeros cargados negativamente incluyen polisacáridos cargados negativamente, entre ellos heparinas y ésteres de dextrano.

Se puede medir colesterol en la sangre de un sujeto, tal como un sujeto humano. Se puede expresar que el colesterol medido en una muestra de sangre comprende colesterol de una o varias subfracciones de colesterol. Según se emplean en la presente memoria, la expresión "colesterol total" y su acrónimo "CT" se emplean para indicar la cantidad total de colesterol en una muestra. Cuando se habla de la cantidad de colesterol en una muestra de sangre y no se indica lo contrario, el término "colesterol" se refiere a "colesterol total". El colesterol puede encontrarse en la sangre de un sujeto (p. ej., un sujeto humano) en muchas formas; por ejemplo, el colesterol puede encontrarse en la sangre en quilomicrones, en LMBD, en LBD y/o en LAD. Se puede denominar subfracción de colesterol a cada una de la quilomicrónica, LMBD, LBD y LAD. La suma de las cantidades de colesterol presente en las subfracciones quilomicrónica, LMBD, LBD y LAD constituye el colesterol total en una muestra de sangre obtenida de un sujeto.

La cantidad total de colesterol, y las cantidades de colesterol en las subfracciones de colesterol individuales, y en cada una de ellas, se puede medir mediante una diversidad de medios conocidos en la técnica, y mediante los novedosos métodos y medios descritos en la presente memoria. Según se emplea en la presente memoria, la expresión "datos de medida de colesterol" se refiere a los datos resultantes de mediciones de colesterol en una muestra, y puede referirse a mediciones de CT, C-LMBD, C-LBD, C-LAD, colesterol quilomicrónico y combinaciones de los mismos, sin limitación. Por ejemplo, según se describe en la presente memoria, se puede medir el colesterol mediante cualquier medio adecuado, incluidas amperometría, voltametría u otros medios, incluso midiendo una propiedad óptica de una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre después de la adición de un reactivo o reactivos conforme a métodos y ensayos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, según se describe en la presente memoria, se puede medir colesterol midiendo la absorbancia de una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de sangre después de la adición de un reactivo o reactivos conforme a métodos y ensayos descritos en la presente memoria. En ciertos casos, los datos de medida de colesterol comprenden datos obtenidos al medir la absorbancia mediante un espectrofotómetro. En ciertos casos, los datos de medida de colesterol comprenden datos obtenidos al medir  $\Delta A$  mediante un espectrofotómetro, donde  $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a dos longitudes de onda, tales como, p. ej., entre aproximadamente 560 nm y aproximadamente 700 nm. Así, por ejemplo, se pueden obtener datos de medida de colesterol midiendo  $\Delta A$  utilizando un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 560 nm y a una longitud de onda de aproximadamente 700 nm, y calculando u obteniendo de otro modo la diferencia entre estas mediciones de absorbancia.

El término "absorbancia" se utiliza en la presente memoria conforme a su significado habitual y acostumbrado en la técnica, y se refiere a la propiedad óptica de una solución (por ejemplo, una muestra) relativa a la proporción de la cantidad de radiación óptica (p. ej., electromagnética) que incide sobre una solución, con respecto a la cantidad de radiación óptica transmitida a través de la solución (p. ej., la muestra).

Se puede medir la absorbancia midiendo la cantidad de luz absorbida durante el paso a través de un medio, midiendo la cantidad de luz que pasa a través de un medio, o mediante otro método conocido en la técnica. Se define típicamente la transmitancia (T) como la relación entre la cantidad de luz que pasa a través de una muestra con respecto a la cantidad de luz que pasa a través de un testigo (por ejemplo, un blanco), midiéndose típicamente la cantidad de luz como intensidad lumínica. La cantidad de luz que no pasa a través del medio es, por lo tanto,  $1 - T$ . Típicamente se define la absorbancia A como el negativo del logaritmo decimal de T. Por lo tanto, se miden juntas la absorbancia y la transmitancia, y la determinación de uno de estos valores permite la determinación del otro valor. Por lo tanto, según se emplea en la presente memoria, el término "absorbancia" también indica y hace referencia a "transmitancia", ya que la determinación de la absorbancia permite asimismo la determinación de la transmitancia.

Según se emplean en la presente memoria, la absorbancia (y la transmitancia) se pueden medir dentro de un intervalo particular de longitudes de onda, o a una longitud de onda particular, o a múltiples longitudes de onda particulares. La absorbancia medida a una longitud de onda particular se puede obtener mediante mediciones dentro de un intervalo de longitudes de onda centrado en torno a esa longitud de onda particular. Por ejemplo, se puede obtener la absorbancia a 560 nm midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 530 nm a aproximadamente 590 nm; midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 540 nm a aproximadamente 580 nm; opcionalmente, midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 570 nm; o entre otras longitudes de onda mayores y menores que 560 nm. Análogamente, se puede obtener la absorbancia a 700 nm midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 670 nm a aproximadamente 730 nm; midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 680 nm a aproximadamente 720 nm; opcionalmente, midiendo la absorbancia entre longitudes de onda de aproximadamente 690 nm a aproximadamente 710 nm; o entre otras longitudes de onda mayores y menores que 700 nm. En los ejemplos descritos en la presente memoria la absorbancia se ha medido utilizando un

espectrofotómetro.

5 Según se emplea en la presente memoria, la expresión " $\Delta A$ " se refiere a la diferencia entre la absorbancia medida a una primera longitud de onda y la absorbancia medida a una segunda longitud de onda; por ejemplo, una primera longitud de onda puede ser aproximadamente 560 nm y una segunda longitud de onda puede ser aproximadamente 700 nm. Por ejemplo, se puede medir  $\Delta A$  por la diferencia en la absorbancia medida a una longitud de onda de aproximadamente 560 nm y a una longitud de onda de aproximadamente 700 nm, y calcular u obtener de otro modo la diferencia entre estas mediciones de absorbancia. Así, por ejemplo, a una  $\Delta A$  medida a 560 nm y 700 nm se la puede denominar " $\Delta A$  (560-700 nm)".

10 Según se emplea en la presente memoria, el término "espectrofotómetro" se refiere a un dispositivo configurado para, y capaz de, medir la intensidad óptica dentro de un intervalo particular de longitudes de onda, o a una longitud de onda particular, o a múltiples longitudes de onda particulares. Un espectrofotómetro puede ser capaz de medir la absorbancia de una muestra. Un espectrofotómetro puede ser capaz de medir la luz emitida desde una muestra (por ejemplo, por fluorescencia y/o luminiscencia). Un espectrofotómetro puede ser capaz de medir la absorbancia de una muestra y de medir la luz emitida por una muestra.

15 Según se emplea en la presente memoria, el término "espectrofotometría" se refiere a la realización de mediciones utilizando un espectrofotómetro; p. ej., para realizar mediciones ópticas dentro de un intervalo particular de longitudes de onda, o a una longitud de onda particular, o a múltiples longitudes de onda particulares.

20 La expresión "detector óptico" según se emplea en la presente memoria, y los medios para medir una propiedad óptica (por ejemplo, de una solución coloreada), se refieren a cualquier medio óptico, dispositivo óptico, fotodetector y elemento de dispositivo óptico, adecuados para detectar radiación electromagnética (por ejemplo, luz de cualquier longitud de onda). Por ejemplo, se pueden emplear un detector óptico, y medios de detección ópticos, para detectar absorbancia, transmitancia, turbidez, luminiscencia (incluida la quimioluminiscencia), fluorescencia y/u otra señal óptica. Los detectores ópticos incluyen, pero sin estar limitados a ello, dispositivos para obtención de imágenes. Los medios ópticos, dispositivos ópticos, fotodetectores y elementos de dispositivos ópticos incluyen, pero sin estar limitados a ello, detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés, incluidos CCD superenfriados), fotodiodos (incluidos, p. ej., diodos PIN y fotodiodos de avalancha), fotomultiplicadores, fototubos, detectores de recuento de fotones, matrices de fotodiodos (incluidos, p. ej., matrices de diodos PIN y matrices de fotodiodos de avalancha), matrices de dispositivos de carga acoplada (incluidas matrices de CCD superenfriados), matrices de fotodiodos, matrices de fotomultiplicadores, matrices de fototubos, matrices de detectores de recuento de fotones y otros dispositivos de detección y elementos de detección. En algunos casos, un diodo PIN u otro elemento puede estar acoplado a un amplificador.

35 En algunos casos, un detector óptico puede incluir una cámara (p. ej., una cámara digital). Una cámara puede incluir una lente, o puede funcionar sin una lente. En algunos casos, las cámaras pueden incluir dispositivos CCD, pueden utilizar elementos de semiconductor metal-óxido complementario (CMOS, por sus siglas en inglés), pueden ser cámaras sin lente, cámaras con matriz de microlentes, cámaras de código abierto (entre ellas, p. ej., una Frankencamera como la descrita por Levoy, "Experimental Platforms for Computational Photography", *IEEE Computer Graphics and Applications*, vol. 30, n.º 5, septiembre/octubre, 2010, págs. 81-87) y pueden utilizar cualquier tecnología de detección visual conocida o que se desarrolle posteriormente en la técnica. Las cámaras pueden tomar imágenes convencionales y/o no convencionales, p. ej., imágenes holográficas, imágenes tomográficas, imágenes interferométricas, espectros de transformada de Fourier, cualquiera de las cuales o todas ellas pueden ser interpretadas con o sin la ayuda de métodos computacionales. Las cámaras pueden incluir una o varias funciones que pueden enfocar la cámara durante el uso, o bien pueden captar imágenes que se puedan enfocar posteriormente. En algunos casos, los dispositivos para obtención de imágenes pueden utilizar obtención de imágenes en dos dimensiones (2-D), obtención de imágenes en tres dimensiones (3-D) y/u obtención de imágenes en cuatro dimensiones (4-D) (que incorpora cambios en el tiempo). Los dispositivos para obtención de imágenes pueden captar imágenes estáticas. Los esquemas ópticos utilizados para conseguir imágenes en 3-D y 4-D pueden ser uno o varios de los distintos conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., microscopía de iluminación estructurada (SLM, por sus siglas en inglés), microscopía holográfica digital (DHM), microscopía confocal, microscopía de campo claro, etc. Las imágenes estáticas pueden capturarse en uno o varios puntos temporales. Los dispositivos para obtención de imágenes pueden captar imágenes de vídeo y/o imágenes dinámicas. Se pueden captar imágenes de vídeo de manera continua durante un período único, o bien se pueden captar a lo largo de uno o varios períodos de tiempo. Un dispositivo para obtención de imágenes puede recopilar la señal de un sistema óptico que barre un objetivo (p. ej., una muestra utilizada para un ensayo) con patrones de barrido arbitrarios (p. ej., en un barrido "ráster").

55 Un detector óptico y los medios de detección óptica incluyen, sin limitación, un microscopio, y los medios de detección óptica pueden incluir microscopía, inspección visual, a través de una película fotográfica, o pueden incluir el empleo de detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD), matrices de CCD superenfriados, fototubos, fotodetectores y otros dispositivos de detección conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Un detector óptico y los medios de detección óptica pueden incluir una fibra óptica o una pluralidad de fibras ópticas (por ejemplo, cables de fibra óptica) que pueden estar conectadas funcionalmente, por ejemplo, a un detector de CCD o a una matriz de PMT. Un haz de fibras ópticas puede comprender fibras

discretas y/o muchas fibras pequeñas fusionadas conjuntamente para formar un haz sólido.

Un detector óptico puede incluir una fuente luminosa, tal como una bombilla eléctrica, bombilla incandescente, lámpara electroluminiscente, láser, diodo láser, diodo fotoemisor (LED, por sus siglas en inglés), lámpara de descarga de gas, lámpara de descarga de alta intensidad, una fuente luminosa quimioluminiscente, una fuente luminosa bioluminiscente, una fuente luminosa fosforescente, una fuente luminosa fluorescente y luz solar natural. En ciertos casos, p. ej., cuando se requiera detectar quimioluminiscencia, la química del ensayo puede producir luz. En ciertos casos, una fuente luminosa puede iluminar un componente para ayudar a detectar los resultados. Por ejemplo, una fuente luminosa puede iluminar una solución durante el ensayo con el fin de detectar los resultados del ensayo. Por ejemplo, un ensayo puede ser un ensayo de fluorescencia o un ensayo de absorbancia, como se emplean comúnmente con ensayos de ácido nucleico. Un detector puede comprender elementos ópticos capaces de suministrar luz desde una fuente de luz a un ensayo o cámara de ensayo. Dicho elemento óptico puede incluir, sin limitación, por ejemplo una lente, un espejo (p. ej., un espejo de barrido o un espejo galvánico), un prisma, una fibra óptica o haz de fibras, una guía de luz (p. ej., una guía líquida de luz), y/u otro elemento óptico. Un detector óptico puede incluir tales elementos ópticos, donde tales elementos ópticos estén dispuestos de manera capaz de suministrar luz a un detector. Por ejemplo, un detector óptico puede estar configurado para detectar longitudes de onda seleccionadas o intervalos de longitudes de onda de radiación electromagnética. Un detector óptico puede estar configurado para moverse sobre una muestra o ver partes de la misma. Un detector óptico puede incluir un espejo, un motor, un elemento piezoeléctrico u otro elemento que permita la detección de luz desde distintas partes de una ubicación objetivo a distintos tiempos, p. ej., para escanear una muestra.

Se puede utilizar un detector óptico para detectar una o varias señales ópticas. Por ejemplo, se puede utilizar un detector para detectar la presencia o el avance de una reacción que proporcione luminiscencia. Se puede utilizar un detector para detectar una reacción que proporcione una o varias de fluorescencia, quimioluminiscencia, fotoluminiscencia, electroluminiscencia, sonoluminiscencia, absorbancia, turbidez, dispersión óptica rotatoria (DOR), dicroísmo circular (DC) o polarización. Un detector óptico puede ser capaz de detectar señales ópticas relacionadas con la intensidad de color y la fase o sus gradientes espaciales o temporales.

Según se emplea en la presente memoria, un medio para comunicar información desde dicho dispositivo a un ordenador u otro dispositivo externo, y un canal para comunicar información a un ordenador u otro dispositivo externo, se refieren sin limitación a una red informática, un teléfono, una red telefónica, y a un dispositivo configurado para visualizar información comunicada desde dicho dispositivo. En ciertos casos, un medio para comunicar información y un canal para comunicar información incluyen enlaces directos que utilizan cables (incluidos cables de par trenzado, coaxiales, de cinta y otros), medios inalámbricos y tecnología inalámbrica (p. ej., tecnología Bluetooth o tecnología RTM (modo de retransmisión)). Los medios de comunicación y los canales de comunicación incluyen cualquier método de comunicación adecuado, entre ellos una conexión cableada para llamada con un módem, un enlace directo a través de un cable, una conexión inalámbrica que incluye la infrarroja, celular, WiMAX, WiFi, satélite, buscapersonas, servicio general de radio por paquetes (GPRS, por sus siglas en inglés), sistema de transporte de datos local (tal como, p. ej., Ethernet o Token Ring a través de una red de área local (LAN, por sus siglas en inglés) u otra red).

Un dispositivo externo con el que se ha de comunicar puede ser cualquier dispositivo capaz de recibir tal comunicación. Por ejemplo, un dispositivo externo puede ser un dispositivo en red, que incluye un servidor, un ordenador personal, un ordenador portátil, una tableta, un dispositivo móvil, un teléfono móvil "tonto", un teléfono satelital, un teléfono inteligente (por ejemplo, iPhone®, Android™, BlackBerry®, Palm, Symbian, Windows®), un asistente digital personal (PDA, por sus siglas en inglés), un buscapersonas o cualquier otro dispositivo. En ciertos casos, un dispositivo externo puede ser un dispositivo de diagnóstico. En algunos casos, cuando un dispositivo externo comprende un dispositivo de diagnóstico, la relación entre dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria y un dispositivo externo puede comprender una relación maestro-esclavo, una relación entre iguales o una relación distribuida.

Según se emplea en la presente memoria, el término "lipasa" se refiere a una clase de enzimas que catalizan reacciones con un lípido como parte del sustrato de reacción. Las lipasas pueden catalizar reacciones tales como la hidrólisis u otras reacciones. Por ejemplo, una lipasa puede catalizar una reacción en la que se metaboliza un éster de colesterol para dar colesterol y un ácido graso.

Según se emplea en la presente memoria, la expresión "colesterol esterasa" se refiere a una enzima capaz de catalizar una reacción que elimina o altera un enlace éster, tal como un éster de ácido carboxílico, de una molécula de colesterol o un resto de colesterol de una molécula que contiene colesterol. Las colesterol esterasas (también denominadas "esterol esterasas" y "lipasas biliares") catalizan típicamente una reacción en la que un éster de esterilo se combina con agua para formar un esteroil y un ácido graso. Las colesterol esterasas son comunes, y se pueden encontrar en organismos unicelulares y multicelulares; muchas de las colesterol esterasas comercialmente útiles son colesterol esterasas bacterianas, aunque se conocen y también son útiles colesterol esterasas procedentes de otras fuentes. Por ejemplo, una colesterol esterasa útil puede ser una colesterol esterasa bacteriana, tal como una colesterol esterasa bacteriana obtenida de bacterias gramnegativas, entre ellas una colesterol esterasa de una especie de *Pseudomonas*.

Según se emplea en la presente memoria, la expresión "colesterol oxidasa" se refiere a una enzima capaz de catalizar una reacción en la que una molécula de colesterol o un resto de colesterol de una molécula que contiene colesterol se combina con oxígeno para formar un resto de colesterol oxidado tal como colest-4-en-3-ona (formando también peróxido de hidrógeno). Muchas colesterol oxidasas son colesterol oxidasas bacterianas. Por ejemplo, una colesterol oxidasa útil puede ser una colesterol oxidasa que se puede obtenerse de bacterias gramnegativas, entre ellas una colesterol oxidasa de una especie de *Pseudomonas*.

Según se emplea en la presente memoria, un "tampón" es un compuesto o grupo de compuestos que, en solución, tienden a mantener el pH de la solución en un valor particular o cerca del mismo. Por ejemplo, se pueden emplear sales de fosfato como tampones. Las sales de fosfato incluyen  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . También son adecuados otros tampones para su uso en los reactivos, ensayos y métodos descritos en la presente memoria, entre ellos, sin limitación, citrato, amonio, acetato, carbonato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), cloruro de colamina, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico (TES), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), acetamidoglicina, tricina (N-(2-hidroxil-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina), glicinamida, bicina (ácido 2-(bis(2-hidroxietil)amino)acético) y otros tampones. Se puede emplear cualquier tampón siempre que tampone una solución acuosa al pH deseado y sea por lo demás compatible con los ensayos y métodos descritos en la presente memoria. En ciertos casos, se puede emplear un tampón para tamponar el pH de una solución en un intervalo de pH de casi neutro a pH ligeramente ácido, por ejemplo de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, o de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 8, o de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 7,8 y, en ciertos casos, a un pH de aproximadamente pH 7 o de aproximadamente pH 7,4.

#### *Dispositivos y Sistemas*

Los ensayos y métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en un dispositivo, o en un sistema, para procesar una muestra. Los ensayos y métodos descritos en la presente memoria pueden incorporarse fácilmente a, y usarse en, un dispositivo para procesar una muestra o un sistema para procesar una muestra, que puede ser un dispositivo de ensayo automatizado, o puede ser un sistema de ensayo automatizado. Tal dispositivo y tal sistema pueden ser útiles para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un dispositivo puede ser útil para recibir una muestra. Un dispositivo puede ser útil para preparar o para procesar una muestra. Un dispositivo puede ser útil para realizar un ensayo en una muestra. Un dispositivo puede ser útil para obtener datos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para transmitir datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para desechar una muestra después del procesamiento o del ensayo de una muestra.

Un dispositivo puede ser parte de un sistema, uno de cuyos componentes puede ser un dispositivo para procesamiento de muestras. Un dispositivo puede ser un dispositivo para procesamiento de muestras. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para facilitar la recogida de una muestra, preparar una muestra para un ensayo clínico o efectuar una reacción química con uno o varios reactivos u otro procesamiento químico o físico, como se describe en la presente memoria. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para obtener datos de una muestra. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para transmitir datos obtenidos de una muestra. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para analizar datos de una muestra. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para comunicarse con otro dispositivo, un laboratorio o un individuo afiliado a un laboratorio, con el fin de analizar datos obtenidos de una muestra.

Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para colocarlo en o sobre un sujeto. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para aceptar una muestra de un sujeto, ya sea directa o indirectamente. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra obtenida de una punción digital o de una punción venosa o una muestra de sangre arterial), una muestra de orina, una muestra de biopsia, una rebanada de tejido, muestra de heces u otra muestra biológica; una muestra de agua, una muestra de suelo, una muestra de alimento, una muestra de aire; u otra muestra. Una muestra de sangre puede comprender, p. ej., sangre entera, plasma o suero. Un dispositivo para procesamiento de muestras puede recibir una muestra procedente del sujeto a través de una carcasa del dispositivo. La recogida de muestras se puede efectuar en un sitio de recogida de muestras o en otro lugar. La muestra se puede proporcionar al dispositivo en un sitio de recogida de muestras.

En algunos casos, se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para aceptar o contener un cartucho. En algunos casos, un dispositivo para procesamiento de muestras puede comprender un cartucho. El cartucho puede ser extraíble del dispositivo para procesamiento de muestras. En algunos casos, se puede proporcionar una muestra al cartucho del dispositivo para procesamiento de muestras. Como alternativa, se puede proporcionar una muestra a otra parte de un dispositivo para procesamiento de muestras. El cartucho y/o el dispositivo pueden comprender una unidad de recogida de muestras que puede estar configurada para aceptar una muestra.

Un cartucho puede incluir una muestra, y puede incluir reactivos para uso en el procesamiento o prueba de una muestra, materiales desechables para uso en el procesamiento o prueba de una muestra, u otros materiales. Tras la colocación de un cartucho en, o la inserción de un cartucho dentro de, un dispositivo para procesamiento de muestras, se pueden poner en comunicación fluidica uno o varios componentes del cartucho con otros componentes del dispositivo para procesamiento de muestras. Por ejemplo, si se recoge una muestra en un cartucho, se puede transferir la muestra a otras partes del dispositivo para procesamiento de muestras. Análogamente, si se proporcionan uno o varios reactivos en un cartucho, se pueden transferir los reactivos a otras partes del dispositivo para procesamiento de muestras, o se pueden llevar a los reactivos otros componentes del dispositivo para procesamiento de muestras. En algunos casos, los reactivos o componentes de un cartucho pueden permanecer a bordo del cartucho. En algunos casos no se incluyen elementos para fluidos, que requieran tubos o que requieran mantenimiento (p. ej., mantenimiento manual o automatizado).

Se puede transferir una muestra o reactivo a un dispositivo, tal como un dispositivo para procesamiento de muestras. Se puede transferir una muestra o reactivo dentro de un dispositivo. Tal transferencia de muestra o de reactivo se puede realizar sin proporcionar una vía fluidica continua desde el cartucho hasta el dispositivo. Tal transferencia de muestra o reactivo se puede realizar sin proporcionar una vía fluidica continua dentro de un dispositivo. En ciertos casos, tal transferencia de muestra o reactivo se puede realizar mediante un sistema de manipulación de muestras (por ejemplo, una pipeta); por ejemplo se puede aspirar una muestra, un reactivo o una parte alícuota de los mismos al interior de un componente de transferencia de punta abierta, tal como una punta de pipeta, que puede estar conectado operativamente a un sistema de manipulación de muestras que transfiere la punta, con la muestra, el reactivo o la parte alícuota de los mismos contenidos dentro de la punta, a una ubicación en o dentro del dispositivo para procesamiento de muestras. La muestra, el reactivo o la parte alícuota de los mismos se pueden depositar en una ubicación en o dentro del dispositivo para procesamiento de muestras. Se pueden mezclar la muestra y el reactivo, o múltiples reactivos, utilizando de una manera similar un sistema de manipulación de muestras. Se pueden transferir de manera automatizada uno o varios componentes del cartucho a otras partes del dispositivo para procesamiento de muestras, y viceversa.

Un dispositivo, tal como un dispositivo para procesamiento de muestras, puede tener un sistema de manipulación de fluidos. Un sistema de manipulación de fluidos puede realizar, o puede ayudar a realizar, el transporte, la dilución, extracción, división en partes alícuotas, mezcla y otras acciones con un fluido, tal como una muestra. En algunos casos, dentro de una carcasa de un dispositivo puede estar contenido un sistema de manipulación de fluidos. Un sistema de manipulación de fluidos puede permitir la recogida, entrega, procesamiento y/o transporte de un fluido, la disolución de reactivos secos, la mezcladura de líquidos y/o reactivos secos con un líquido, y asimismo la recogida, entrega, procesamiento y/o transporte de componentes, muestras o materiales no fluidos. El fluido puede ser una muestra, un reactivo, diluyente, lavado, tinte o cualquier otro fluido que el dispositivo pueda utilizar, y puede incluir, sin limitación, fluidos homogéneos, diferentes líquidos, emulsiones, suspensiones y otros fluidos. También se puede utilizar un sistema de manipulación de fluidos, que incluye sin limitación una pipeta, para transportar recipientes (con o sin fluido contenido en los mismos) en torno al dispositivo. El sistema de manipulación de fluidos puede dispensar o aspirar un fluido. La muestra puede incluir una o varias materias en partículas o materias sólidas flotando dentro de un fluido.

En ciertos casos, un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, punta de pipeta, jeringa, capilar u otro componente. El sistema de manipulación de fluidos puede tener una parte con una superficie interior y una superficie exterior y un extremo abierto. El sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, que puede incluir un cuerpo de pipeta y una boquilla de pipeta, y puede comprender una punta de pipeta. Una punta de pipeta puede ser o no extraíble de una boquilla de pipeta. En ciertos casos, un sistema de manipulación de fluidos puede utilizar una pipeta acoplada con una punta de pipeta; una punta de pipeta puede ser desechable. Una punta de pipeta puede formar un cierre estanco a fluidos cuando se acopla con una pipeta. Una punta de pipeta puede ser utilizada una, dos o más veces. En ciertos casos, un sistema de manipulación de fluidos puede utilizar una pipeta o dispositivo similar, con o sin una punta de pipeta, para aspirar, dispensar, mezclar, transportar o manipular de otra forma el fluido. El fluido se puede dispensar desde el sistema de manipulación de fluidos cuando se desee. El fluido puede estar contenido dentro de una punta de pipeta antes de ser dispensado, por ejemplo, desde un orificio en la punta de pipeta. En ciertos casos, o casos durante el uso, se puede dispensar todo el fluido; en otros casos, o casos durante el uso, se puede dispensar una parte del líquido contenido en una punta. Una pipeta puede aspirar selectivamente un fluido. La pipeta puede aspirar una cantidad seleccionada de fluido. La pipeta puede ser capaz de accionar mecanismos de agitación para mezclar el fluido dentro de la punta o dentro de un recipiente. La pipeta puede incorporar puntas o recipientes que creen bucles de flujo continuo para la mezcla, incluidos materiales o reactivos que estén en forma no líquida. Una punta de una pipeta también puede facilitar la mezcla mediante el suministro medido de múltiples fluidos simultáneamente o en secuencia, tal como en reacciones con sustrato en dos partes.

El sistema de manipulación de fluidos puede incluir una o varias unidades fluidicamente aisladas o hidráulicamente independientes. Por ejemplo, el sistema de manipulación de fluidos puede incluir una, dos o más puntas de pipeta. Las puntas de pipeta pueden estar configuradas para aceptar y confinar un fluido. Las puntas pueden estar fluidicamente aisladas entre sí o ser hidráulicamente independientes entre sí. El fluido contenido dentro de cada punta puede estar fluidicamente aislado o ser hidráulicamente independiente de un fluido en otras puntas y de otros fluidos dentro del dispositivo. Las unidades fluidicamente aisladas o hidráulicamente independientes se pueden

mover con respecto a otras partes del dispositivo y/o entre sí. Las unidades fluidicamente aisladas o hidráulicamente independientes se pueden mover individualmente. Un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una o varias bases o soportes. Una base o soporte puede sostener una o varias pipetas o unidades de pipeta. Una base o soporte puede conectar entre sí una o varias pipetas del sistema de manipulación de fluidos.

5 Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar pasos de procesamiento o acciones sobre una muestra obtenida de un sujeto. El procesamiento de muestras puede incluir la preparación de muestras, que incluye, p. ej., la dilución de muestras, división de una muestra en partes alícuotas, extracción, puesta en contacto con un reactivo, filtración, separación, centrifugación u otra acción o paso preparatorio o de procesamiento. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar sobre la muestra  
10 una o varias acciones o pasos de preparación de muestras. Opcionalmente, se puede preparar una muestra para una reacción química y/o un paso de procesamiento físico. Una acción o paso de preparación de muestras puede incluir uno o varios de los siguientes: centrifugación, separación, filtración, dilución, enriquecimiento, purificación, precipitación, incubación, pipeteo, transporte, cromatografía, lisis celular, citometría, pulverización, trituración, activación, ultrasonicación, procesamiento en microcolumna, procesamiento con perlas magnéticas, procesamiento con nanopartículas, u otra acción o pasos de preparación de muestras. Por ejemplo, la preparación de muestras  
15 puede incluir uno o varios pasos para separar la sangre en fracciones de suero y/o partículas, o para separar cualquier otra muestra en diversos componentes. La preparación de muestras puede incluir uno o varios pasos para diluir y/o concentrar una muestra, tal como una muestra de sangre u otras muestras biológicas. La preparación de muestras puede incluir añadir un anticoagulante u otros ingredientes a una muestra. La preparación de muestras también puede incluir la purificación de una muestra. En ciertos casos, todas las acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras los realiza un único dispositivo. En ciertos casos, todas las acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, la mayoría de las acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo.  
20 En ciertos casos, muchas acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, más de un dispositivo puede realizar acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras.

Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para ejecutar uno o varios ensayos sobre una muestra y para obtener datos de la muestra. Un ensayo puede incluir uno o varios tratamientos físicos o químicos, y  
30 puede incluir ejecutar una o varias reacciones químicas o físicas. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar uno, dos o más ensayos sobre una pequeña muestra de fluido corporal. Pueden tener lugar una o varias reacciones químicas en una muestra que tenga un volumen, como se describe en otra parte del presente documento. Por ejemplo, pueden tener lugar una o varias reacciones químicas en una píldora que tenga volúmenes inferiores a femtolitros. En un caso, la unidad de recogida de muestra está configurada para recibir un volumen de la muestra de fluido corporal equivalente a una sola gota, o menos, de sangre o fluido intersticial. En ciertos casos, el volumen de una muestra puede ser un volumen pequeño, donde un volumen pequeño puede ser un volumen que sea inferior a aproximadamente 1.000  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 250  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 150  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 75  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 40  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ , u otro volumen pequeño. En ciertos casos, todas las acciones o pasos del ensayo de muestras se realizan sobre una única muestra. En ciertos casos, todas las acciones o pasos del ensayo de muestras las realiza un único dispositivo. En ciertos casos, todas las acciones o pasos del ensayo de muestras se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, la mayoría de las acciones o pasos ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, muchas acciones o pasos del ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, las acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras los pueden realizar más de un dispositivo.  
40 En ciertos casos, muchas acciones o pasos del ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, más de un dispositivo puede realizar acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras.

Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar una pluralidad de ensayos sobre una muestra. En ciertos casos, se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar una pluralidad de ensayos sobre una única muestra. En ciertos casos, se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para realizar una pluralidad de ensayos sobre una única muestra, donde la muestra es una muestra pequeña. Por ejemplo, una muestra pequeña puede tener un volumen de muestra que sea un volumen pequeño inferior a aproximadamente 1.000  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 250  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 150  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 75  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 40  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ , o inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ , u otro volumen pequeño. Un dispositivo para procesamiento de muestras puede ser capaz de realizar ensayos multiplexados sobre una única muestra. Se pueden ejecutar simultáneamente una pluralidad de ensayos; se pueden ejecutar secuencialmente; o se pueden ejecutar simultáneamente algunos ensayos mientras que otros se ejecutan secuencialmente. También pueden estar incorporados en el dispositivo uno o varios ensayos de control y/o calibradores (por ejemplo, que incluyan una configuración con un control de un calibrador para el ensayo o las pruebas); los ensayos de control y el ensayo en calibradores pueden realizarse de manera simultánea a los ensayos realizados sobre una muestra, o se pueden realizar antes o después de los ensayos realizados sobre una muestra, o cualquier combinación de ello. En ciertos casos, todas las acciones o  
50 En ciertos casos, muchas acciones o pasos del ensayo de muestras las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, más de un dispositivo puede realizar acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras.

pasos de ensayo de muestras las realiza un único dispositivo. En ciertos casos, todas las acciones o pasos del ensayo se realizan dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, la mayoría de las acciones o pasos de ensayo de muestras, de una pluralidad de ensayos, las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, muchas acciones o pasos de ensayo de muestras, de una pluralidad de ensayos, las realiza un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de una carcasa de un único dispositivo. En ciertos casos, más de un dispositivo puede realizar las acciones o pasos de procesamiento, preparación o ensayo de muestras.

En ciertos casos, la totalidad de una pluralidad de ensayos se pueden realizar en un corto período de tiempo. En ciertos casos, tal período de tiempo corto comprende menos de aproximadamente tres horas, o menos de aproximadamente dos horas, o menos de aproximadamente una hora, o menos de aproximadamente 40 minutos, o menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 25 minutos, o menos de aproximadamente 20 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 10 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos, o menos de aproximadamente 4 minutos, o menos de aproximadamente 3 minutos, o menos de aproximadamente 2 minutos, o menos de aproximadamente 1 minuto, u otro corto período de tiempo.

Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para detectar una o varias señales relacionadas con la muestra. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para identificar una o varias propiedades de la muestra. Por ejemplo, se puede configurar el dispositivo para procesamiento de muestras para detectar la presencia o concentración de un analito o una pluralidad de análisis o un estado morbo en la muestra (p. ej., en o a través de un fluido corporal, secreción, tejido u otra muestra). Como alternativa, se puede configurar el dispositivo para procesamiento de muestras para detectar una señal o señales que se pueden analizar para detectar la presencia o concentración de uno o varios análisis (que pueden ser indicativos de un estado morbo) o un estado morbo en la muestra. Las señales pueden analizarse a bordo del dispositivo o en otra ubicación. La ejecución de una prueba clínica puede incluir o no cualquier análisis o comparación de datos recogidos.

Se puede realizar una reacción química u otro paso de procesamiento, con o sin la muestra. Los ejemplos de pasos, pruebas o ensayos que el dispositivo puede preparar o ejecutar pueden incluir, pero sin limitación, inmunoensayo, ensayo de ácido nucleico, ensayo basado en receptor, ensayo citométrico, ensayo colorimétrico, ensayo enzimático, ensayo electroforético, ensayo electroquímico, ensayo espectroscópico, ensayo cromatográfico, ensayo microscópico, ensayo topográfico, ensayo calorimétrico, ensayo turbidimétrico, ensayo de aglutinación, ensayo con radioisótopo, ensayo viscométrico, ensayo de coagulación, ensayo de tiempo de coagulación, ensayo de síntesis proteica, ensayo histológico, ensayo de cultivo, ensayo de osmolaridad y/u otros tipos de ensayos, centrifugación, separación, filtración, dilución, enriquecimiento, purificación, precipitación, pulverización, incubación, pipeteo, transporte, lisis celular, u otra acción o pasos de preparación de muestras, o combinaciones de los mismos. Los pasos, pruebas o ensayos que el dispositivo puede preparar o ejecutar pueden incluir obtención de imágenes, incluidas microscopía, citometría y otras técnicas que preparan o utilizan imágenes. Los pasos, pruebas o ensayos que el dispositivo puede preparar o ejecutar pueden incluir además una evaluación de histología, morfología, cinemática, dinámica y/o estado de una muestra, que puede incluir tal evaluación para las células.

Un dispositivo puede ser capaz de realizar todos los pasos a bordo (por ejemplo, pasos o acciones realizadas por un único dispositivo) en un breve plazo de tiempo. Un dispositivo puede ser capaz de realizar todos los pasos a bordo sobre una única muestra en un breve plazo de tiempo. Por ejemplo, desde la recogida de muestra de un sujeto hasta la transmisión de datos y/o el análisis pueden transcurrir aproximadamente 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 50 minutos o menos, 45 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos o 1 minuto o menos. El plazo de tiempo desde la aceptación de una muestra en el interior del dispositivo hasta la transmisión de datos y/o el análisis por el dispositivo con respecto a dicha muestra puede depender del tipo o número de pasos, pruebas o ensayos realizados sobre la muestra. El plazo de tiempo desde la aceptación de una muestra en el interior del dispositivo hasta la transmisión de datos y/o el análisis del dispositivo con respecto a dicha muestra puede requerir aproximadamente 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 50 minutos o menos, 45 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, 5 minutos o menos, 4 minutos o menos, 3 minutos o menos, 2 minutos o menos o 1 minuto o menos.

Se puede configurar un dispositivo para preparar una muestra para desecharla, o para desechar una muestra, tal como una muestra biológica, después del procesamiento o ensayo de una muestra.

En ciertos casos, se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras con el fin de transmitir datos obtenidos de una muestra. En ciertos casos, se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para comunicar a través de una red. Un dispositivo para procesamiento de muestras puede incluir un módulo de comunicaciones que puede interactuar con la red. Un dispositivo para procesamiento de muestras puede estar conectado a la red a través de una conexión por cable o de forma inalámbrica. La red puede ser una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN, por sus siglas en inglés), tal como Internet. En algunos casos, la red puede ser una red de área personal. La red puede incluir la nube. Se puede conectar a la red el dispositivo para procesamiento de muestras sin necesitar un dispositivo intermedio, o se puede necesitar un dispositivo intermedio para conectar un dispositivo para procesamiento de muestras a una red. Un dispositivo para procesamiento de

muestras se puede comunicar a través de una red con otro dispositivo, que puede ser cualquier tipo de dispositivo en red, incluidos, pero sin limitación, un ordenador personal, ordenador de servidor u ordenador portátil; asistentes digitales personales (PDA) tales como un dispositivo Windows CE; teléfonos tales como teléfonos móviles, teléfonos inteligentes (por ejemplo, iPhone, Android, Blackberry, etc.) o teléfonos portátiles con reconocimiento de ubicación (como GPS); un dispositivo de itinerancia, tal como un dispositivo de itinerancia conectado a red; un dispositivo inalámbrico, tal como un dispositivo de correo electrónico inalámbrico u otro dispositivo capaz de comunicarse de forma inalámbrica con una red informática; o cualquier otro tipo de dispositivo de red que pueda comunicarse eventualmente a través de una red y gestionar transacciones electrónicas. Dicha comunicación puede incluir proporcionar datos a una infraestructura de computación en nube o cualquier otro tipo de infraestructura de almacenamiento de datos a la que puedan acceder otros dispositivos.

Un dispositivo para procesamiento de muestras puede proporcionar datos acerca de una muestra a, por ejemplo, un profesional sanitario, una ubicación de un profesional sanitario, tal como un laboratorio, o a un afiliado del mismo. Uno o varios de un laboratorio, profesional sanitario o sujeto puede tener un dispositivo de red capaz de recibir o acceder a los datos proporcionados por el dispositivo para procesamiento de muestras. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para proporcionar datos acerca de una muestra a una base de datos. Se puede configurar un dispositivo para procesamiento de muestras para proporcionar datos acerca de una muestra a un sistema de historiales médicos electrónicos, a un sistema de información de laboratorio, a un sistema de automatización de laboratorio, o a otro sistema o *software*. Un dispositivo para procesamiento de muestras puede proporcionar datos en forma de informe.

Un laboratorio, dispositivo u otra entidad o *software* puede realizar en tiempo real análisis sobre datos relativos a una muestra. Un sistema de *software* puede realizar análisis químicos y/o análisis patológicos, o estos podrían distribuirse entre combinaciones de personal de laboratorio, clínico y especializado o experto. El análisis puede incluir la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. El análisis de los datos puede incluir una posterior evaluación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. Opcionalmente, se puede generar un informe basado en datos sin procesar, datos preprocesados o datos analizados. Se puede preparar dicho informe para mantener la confidencialidad de los datos obtenidos de la muestra, la identidad y otra información relativa al sujeto del cual se ha obtenido la muestra, el análisis de los datos y otra información confidencial. Se pueden transmitir a un profesional sanitario el informe y/o los datos. Se pueden proporcionar los datos obtenidos por un dispositivo para procesamiento de muestras, o el análisis de dichos datos, o informes, a una base de datos, un sistema de historiales médicos electrónicos, un sistema de información de laboratorio, un sistema de automatización de laboratorio u otro sistema o *software*.

Se pueden encontrar la descripción y puesta en conocimiento de ejemplos de reactivos, ensayos, métodos, kits, dispositivos y sistemas que pueden emplear, o se pueden emplear con, complejos, composiciones, anticuerpos u otros reactivos descritos en la presente memoria, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 8.088.593; la patente de EE. UU. 8.380.541; la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 13/769.798, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 13/769.779, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 13/244.947, presentada el 26 de septiembre de 2011; el documento PCT/US2012/57155, presentado el 25 de septiembre de 2012; la solicitud de EE.UU. con n.º de serie 13/244.946, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de EE.UU. 13/244.949, presentada el 26 de septiembre de 2011; y la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 61/673.245, presentada el 26 de septiembre de 2011, siendo incorporadas a la presente memoria por referencia y en su totalidad las descripciones de tales patentes y solicitudes de patente.

#### *Métodos y ensayos de lípidos y fracciones lipídicas*

Los novedosos métodos y ensayos descritos en la presente memoria hacen uso del hallazgo de los solicitantes de que las subespecies de colesterol se convierten en el producto medido a velocidades distintas. Así, C-LAD se convierte muy rápidamente en producto, mientras que C-LBD se convierte en producto más lentamente de lo que C-LAD se convierte en producto, y C-LMBD y quilomicrones se convierten aún más lentamente. La conversión completa de colesterol total en producto es incluso más lenta que la conversión de C-LAD o C-LBD en producto. Tales diferencias en las velocidades de conversión en producto permiten realizar la medición de colesterol de distintas especies lipoproteicas en una única solución a tiempos distintos, disminuyendo así el número de pasos requeridos para tales mediciones, reduciendo posibles errores y simplificando los procedimientos. En ciertos casos descritos en la presente memoria, "producto" puede ser un producto coloreado, tal como, p. ej., un producto coloreado formado por una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante. Al realizar mediciones de producto coloreado a, por ejemplo, (1) tiempos muy tempranos (por ejemplo, 0-2 minutos), a tiempos un poco más tardíos (por ejemplo, 2-6 minutos) y a un tiempo tardío (por ejemplo, 10 minutos o más tarde) se pueden medir en un único ensayo las dos subfracciones de colesterol más importantes (C-LAD y C-LBD) y el colesterol total (CT). Es importante destacar que, dado que el ensayo se realiza en una única mezcla de reacción, las proporciones de las subfracciones de colesterol con respecto al colesterol total se determinan con mayor precisión y precisión de lo que se esperaría al realizar varios ensayos diferentes en distintas mezclas de reacción. Además, los ensayos y métodos descritos en la presente memoria, al realizarse en una única mezcla de reacción, pueden reducir significativamente los costes de las mediciones de colesterol en comparación con los costes de métodos y ensayos anteriores que requieren llevar a cabo tres o más análisis para obtener los valores de las subfracciones de colesterol y del



colesterol total.

Los métodos y ensayos descritos en la presente memoria hacen uso de las velocidades diferenciales a las que una lipasa (p. ej., una colesterol esterasa) y una oxidasa (p. ej., una colesterol oxidasa) actúan sobre cada fracción lipoproteica que contiene colesterol. Las lipoproteínas difieren en la composición de los lípidos que contienen (p. ej., lípidos que incluyen triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos) y en las apolipoproteínas que ayudan a solubilizar los lípidos para su transporte a través de la sangre. Las lipoproteínas son muy heterogéneas, pero las fracciones que se consideran de mayor utilidad para evaluar el estado lipídico con fines de diagnóstico clínico son suficientemente distintas en sus propiedades físicas y químicas, y se han distinguido en métodos de la técnica anterior por las velocidades a las que se desplazan bajo la fuerza centrífuga o cuando son sometidas a separación electroforética.

Contrariamente a los métodos de la técnica anterior, los ensayos y métodos descritos en la presente memoria utilizan, y los reactivos descritos en la presente memoria proporcionan, condiciones en las que las lipoproteínas LAD, LBD y LMBD reaccionan con la química del ensayo a velocidades suficientemente distintas en la misma solución sin precipitación sustancial, de modo que se puede medir cada fracción en un único ensayo utilizando múltiples mediciones a tiempos diferentes. Por lo tanto, en un ejemplo de los métodos descritos en la presente memoria, el C-LAD se consume por completo en aproximadamente dos minutos, mientras que el C-LBD requiere aproximadamente seis minutos para convertirse completamente en producto medido. Esperando un poco más (p. ej., diez minutos o más), se convierte todo el colesterol de la muestra. Según los métodos descritos en la presente memoria, se puede estimar el colesterol total en el punto final del ensayo midiendo la absorbancia del producto coloreado. Según los métodos descritos en la presente memoria, se puede medir el C-LBD registrando la tasa de producción de color a lo largo de un intervalo de tiempo (por ejemplo, 2-6 minutos). Durante parte más temprana de la reacción (p. ej., 0-2 minutos) se consumen tanto LAD como LBD; se puede estimar la contribución de LAD utilizando la concentración de LBD medida dentro del ensayo (p. ej., una vez que se conoce la concentración de LBD a partir de mediciones realizadas con el ensayo). Según se describe en la presente memoria, se ha establecido un método para realizar el cálculo. Por lo tanto, los presentes métodos permiten el uso de datos exclusivamente de velocidad para calcular C-LAD y C-LBD y C-total. Se puede calcular C-LBD a partir de datos cinéticos tomados de la parte media de la reacción del ensayo (p. ej., mediciones tomadas aproximadamente de 2 a 6 minutos después del inicio del ensayo) y se puede estimar C-LAD a partir de la parte temprana (por ejemplo, aproximadamente de 0 a 2 minutos después del inicio del ensayo) de la reacción, lo que permite la contribución de LBD.

Los solicitantes han encontrado que un aspecto de ensayos descritos en la presente memoria implica establecer condiciones de ensayo (p. ej., reactivos, protocolo y temperatura) de modo que, en la misma solución sin precipitación sustancial de lipoproteínas, la cinética de las reacciones que convierten C-LAD, C-LBD, quilomicrones y C-LMBD en producto coloreado avancen a velocidades significativamente distintas, permitiendo al mismo tiempo la reacción esencialmente completa de todas las especies lipoproteicas (p. ej., LAD, LBD y LMBD) antes del final del ensayo. Los reactivos y métodos descritos en la presente memoria proporcionan las condiciones que permiten la diferenciación en el tiempo entre distintas fracciones lipoproteicas dentro de una única mezcla de reacción sin precipitación sustancial de lipoproteína.

Por ejemplo, en las condiciones descritas en la presente memoria, el curso temporal para C-LAD tiene una semivida estimada inferior a un minuto, mientras que la conversión de C-LBD tiene una fase de retraso y una forma general sigmoide centrada en aproximadamente tres minutos. En las condiciones descritas en la presente memoria, el colesterol lipoproteico restante (quilomicrones y C-LMBD) reacciona aún más lentamente (por ejemplo, con una semivida de aproximadamente cinco minutos o más). Estas diferencias en la semivida y en la cinética de reacción entre diferentes especies de colesterol lipoproteico permiten la desagregación de la señal de ensayo en lo que se puede atribuir a cada especie, utilizando un algoritmo simple, aunque, por ejemplo, más de una especie esté produciendo señal durante ciertos períodos durante el ensayo. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria permiten una determinación rápida, conveniente y precisa de colesterol en las principales fracciones lipoproteicas.

En los ensayos convencionales de la técnica anterior, se precipitan LBD y LMBD mediante uno de una variedad de reactivos. Por ejemplo, el sulfato de dextrano y los iones de magnesio pueden formar puentes entre las partículas de lipoproteína cargadas negativamente, de manera que se agregan para formar, por ejemplo, complejos  $\text{LBD}:\text{Mg}^{2+}:\text{sulfato de dextrano}:\text{Mg}^{2+}:\text{LBD}$ . La formación de precipitado en tales ensayos convencionales requiere concentraciones particulares de ambos reactivos en las proporciones correctas. Los precipitados de tales ensayos convencionales se pueden retirar después mediante centrifugación o filtración. Se conocen otros reactivos para precipitar LBD y LMBD, tales como el ácido fosfotungstácico, poli(sulfato de vinilo), heparina con cloruro de manganeso, polietilenglicol (PEG) 6000, fosfotungstato de sodio con cloruro de magnesio y anticuerpos monoclonales específicos anti-apolipoproteína-B.

Por el contrario, las formulaciones de reactivo para uso en los ensayos y métodos descritos en la presente memoria están diseñadas para lograr la diferenciación cinética descrita en lo que antecede sin requerir la precipitación de ninguna lipoproteína. En los reactivos descritos en la presente memoria, la formación de complejos con magnesio y sulfato de dextrano se logra en condiciones en las que esencialmente no se produce precipitación de lipoproteína. Diversos tensioactivos y otros reactivos tales como  $\alpha$ -ciclodextrina son adecuados para ser empleados con el fin de

mantener solubles las lipoproteínas. Las superficies de las partículas de LBD y LMBD se modifican de tal manera que restringen pero no impiden el acceso al colesterol de LBD y de LMBD y a los ésteres de colesterol. El uso de reactivos y métodos adecuados para tal modificación de las superficies de las partículas de LBD y LMBD permite retardar la formación de producto coloreado a partir de estas especies lipoproteicas.

- 5 Una composición de reactivo ilustrativa que se muestra a continuación en la Tabla 3 utiliza un sulfato de dextrano de peso molecular más bajo y una concentración de iones magnesio y una relación de iones magnesio con respecto a sulfato de dextrano mucho mayores en comparación con los métodos establecidos en la técnica anterior. Tanto en el presente método como en los métodos establecidos, en el primer paso del ensayo se reducen a la mitad las concentraciones de estos ingredientes debido a la adición de muestra.
- 10 Se entenderá que los ingredientes particulares y sus cantidades pueden variar en los reactivos utilizados en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Las composiciones de reactivos que se muestran en la Tabla 3 proporcionan un ejemplo de muchos reactivos posibles que son adecuados para su uso en estos métodos. En general, los reactivos incluirán cationes, y los cationes en reactivos adecuados para su uso en estos métodos serán opcionalmente cationes divalentes, tales como magnesio, manganeso, calcio, bario y otros cationes
- 15 divalentes. En ciertos casos de los reactivos para uso en los métodos descritos en la presente memoria, la concentración de catión divalente estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, de manera opcional entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, o de manera opcional entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 8 mM. En general, los reactivos incluirán polisacáridos cargados negativamente, y los polisacáridos cargados negativamente en reactivos adecuados para su uso en estos métodos
- 20 serán opcionalmente ésteres de dextrano, tales como sulfato de dextrano. En ciertos casos de los reactivos para uso en los métodos descritos en la presente memoria, la cantidad de polisacárido cargado negativamente (p. ej., sulfato de dextrano) estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 g/L a aproximadamente 20 g/L, de manera opcional entre aproximadamente 0,3 g/L y aproximadamente 10 g/L, u opcionalmente entre aproximadamente 0,5 g/L y aproximadamente 5 g/L. En casos particulares de reactivos adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, los polisacáridos cargados negativamente (p. ej., sulfato de dextrano) tendrán pesos moleculares en el intervalo entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 1.000.000, de manera opcional en el intervalo entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 500.000, de manera opcional en el intervalo entre aproximadamente 25.000 y aproximadamente 100.000, u opcionalmente en el intervalo entre aproximadamente 30.000 y aproximadamente 80.000. En casos particulares de reactivos adecuados para uso en los métodos descritos
- 30 en la presente memoria, la proporción de polisacáridos cargados negativamente (por ejemplo, sulfato de dextrano) con respecto a cationes divalentes estará en el intervalo entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,1, de manera opcional en el intervalo entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,05, de manera opcional en el intervalo entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,02, u opcionalmente en el intervalo entre aproximadamente 0,003 y aproximadamente 0,007.
- 35 En los ejemplos descritos en la presente memoria, las mediciones de referencia (por el método "establecido") de colesterol y subfracciones de colesterol se realizaron utilizando la química y métodos Advia<sup>®</sup>, empleando una máquina Advia<sup>®</sup> 1800 según las instrucciones sugeridas proporcionadas por el fabricante y suministrador de los productos Advia<sup>®</sup>, Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY 10591, EE. UU.).

40 Por consiguiente, como se ha descrito más arriba, los reactivos, ensayos y métodos que proporcionan polisacáridos cargados negativamente (tales como ésteres de dextrano, p. ej., sulfato de dextrano), ciclodextrinas opcionalmente cargadas negativamente (tales como sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina) y cationes (por ejemplo, cationes divalentes tales como magnesio) en los reactivos combinados con una muestra de sangre durante el ensayo después de un tiempo inicial como se ha discutido en lo que antecede, permiten originar distintas velocidades de degradación del colesterol desde diferentes fracciones lipoproteicas, de forma que la medición del avance de la reacción a distintos tiempos y/o

45 durante distintos períodos de tiempo, como se ha comentado en lo que antecede, permite medir y determinar C-LAD, C-LBD, C-LMBD y/o CT.

En casos alternativos de los reactivos, ensayos y métodos descritos en la presente memoria, se pueden combinar durante un ensayo una lipasa (p. ej., una colesterol esterasa), una deshidrogenasa (p. ej., una colesterol deshidrogenasa) y nicotinadeninucleótido (NAD), p. ej., se puede añadir una muestra de sangre a un reactivo o

50 mezcla de reactivos, de modo que la muestra de sangre, la lipasa, la deshidrogenasa y NAD (por ejemplo, en su forma oxidada NAD<sup>+</sup>) estén todos presentes en una solución que permita que la lipasa pueda actuar para liberar colesterol desde ésteres de colesterol en lipoproteínas de la muestra, y la deshidrogenasa y nicotinadeninucleótido reaccionen eficazmente para proporcionar una forma reducida de nicotinadeninucleótido (NADH) y colest-4-en-3-ona u otra forma de colesterol, capaz de proporcionar un producto coloreado (p. ej., NADH) u otro producto detectable. En tales casos alternativos, en los reactivos y en los reactivos combinados durante el ensayo después de un tiempo inicial, como se ha comentado en lo que antecede, están presentes cantidades similares de polisacáridos cargados negativamente (tales como ésteres de dextrano, p. ej., sulfato de dextrano), ciclodextrinas opcionalmente cargadas negativamente (tales como  $\alpha$ -ciclodextrina) y cationes

55 (p. ej., cationes divalentes tales como magnesio), que permiten originar distintas velocidades de degradación del colesterol desde diferentes fracciones lipoproteicas, de forma que la medición del avance de la reacción a distintos tiempos y/o durante distintos períodos de tiempo, como se ha comentado en lo que antecede, permite medir y determinar C-LAD, C-LBD, C-LMBD y/o CT.

Por lo tanto, en tales casos alternativos, el nicotinadeninucleótido es un colorante. El NADH se puede detectar por medios espectrofotométricos u otros, como se ha comentado en lo que antecede, que permiten detectar y medir los niveles de colesterol. Por ejemplo, se puede detectar NADH y se pueden determinar sus niveles mediante mediciones de absorbancia a 340 nm o en un intervalo de longitudes de onda centrado en aproximadamente 340 nm. El NADH puede ser excitado por luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 340 nm, y emite luz con longitudes de onda de aproximadamente 440 nm; por lo tanto, se puede detectar NADH por excitación a aproximadamente 340 nm y midiendo la emisión a aproximadamente 440 nm. Otros métodos para detectar y medir los niveles de NADH (p. ej., para determinar los niveles de colesterol en una muestra de sangre) incluyen la medición de la formación de NADH utilizando moléculas sensibles a oxidación-reducción (redox) tales como las sales de tetrazolio en presencia de un mediador redox tal como la diaforasa; métodos amperométricos y métodos luminogénicos que consumen NADH (por ejemplo, utilizando la producción de luz mediada por luciferasa, tal como mediante el uso de una luciferasa bacteriana).

Debe entenderse que, aunque la descripción que precede se ha descrito junto con los casos específicos de la misma, la descripción precedente, así como los ejemplos que siguen, pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 Química y reactivos

Química del ensayo para colesterol:

Se pueden emplear ensayos descritos en la presente memoria para formar producto coloreado a partir de reacciones con colesterol y derivados de colesterol (p. ej., ésteres de colesterol) que se encuentran en una muestra de sangre. Como se muestra en la Figura 1, ésteres de colesterol pueden reaccionar con una colesterol esterasa para proporcionar colesterol libre. El colesterol libre puede reaccionar con una colesterol oxidasa y oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. Se puede emplear el peróxido de hidrógeno formado en tal reacción para cuantificar la cantidad de colesterol en la muestra. El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con una peroxidasa para formar un producto coloreado, p. ej., en presencia de un colorante, o mediante el uso de un colorante, y se puede detectar y cuantificar tal reacción. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, en presencia de peroxidasa de rábano picante y colorantes tales como compuestos de aminoantipireno (p. ej., 4-aminoantipireno) y N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, reacciona para formar un producto coloreado (p. ej., un tinte de Trinder (quinonaimina) como se indica en la Figura 1).

Reactivos del ensayo para colesterol:

En las Tablas 1 y 2 a continuación se exponen composiciones de dos reactivos ilustrativos, AC y BC. El reactivo AC proporciona un ejemplo de un primer reactivo como se describe en la presente memoria, y el reactivo BC proporciona un ejemplo de un segundo reactivo como se describe en la presente memoria. Los reactivos AC y BC pueden tener las composiciones descritas en las Tablas 1A y 1B:

Tabla 1A: Composición del reactivo AC

Componente	Concentración
ciclodextrina (p. ej., una $\alpha$ -, $\beta$ - o $\gamma$ -ciclodextrina como, p. ej., un sulfato o fosfato)	0,1 mM - 10 mM
dextrano cargado negativamente (p. mol. 50.000) (por ejemplo, en forma de sulfato o fosfato)	0,1 g/L - 20 g/L
sal de magnesio (p. ej., cloruro, sulfato, acetato, carbonato u otra sal)	1 mM - 10 mM
4-aminoantipireno	1 - 5 mM
$\text{Na}_x\text{PO}_4$ (pH entre aproximadamente pH 6 - pH 8, p. ej., pH 7,4)	20 mM - 300 mM

Tabla 1B: Composición del reactivo BC

Componente	Concentración
Na <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> (pH entre aproximadamente pH 6 - pH 8, p. ej., pH 7,4)	10 mM - 200 mM
Triton X-100 (etoxilato de octilfenol)	0,01% - 1%
Pluronic L64 (copolímero de bloque de polietilenglicol-polipropilenglicol)	0,5 g/L - 20 g/L
ALPS	0,5 mM - 20 mM
peroxidasa de rábano picante	0,5 kU/L - 20 kU/L
colesterol esterasa de <i>Pseudomonas sp.</i>	100 U/L - 5.000 U/L
colesterol oxidasa de <i>Pseudomonas sp.</i>	0,25 kU/L - 10 kU/L

5 donde "ALPS" es N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina y "Na<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>" es NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en proporciones que pueden proporcionar un pH entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8,5; p. ej., aproximadamente pH 7,4.

Por ejemplo, en casos particulares, los reactivos AC y BC pueden tener las siguientes composiciones que se exponen en las Tablas 2A y 2B a continuación:

Tabla 2A: Composición del reactivo AC

Componente	Concentración
sulfato de α-ciclodextrina	1 mM
sulfato de dextrano (p. mol. 50.000)	1 g/L
cloruro de magnesio	4 mM
4-aminoantipireno	2,25 mM
Na <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	100 mM

10

Tabla 2B: Composición del reactivo B

Componente	Concentración
Na <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	50 mM
Triton X-100 (etoxilato de octilfenol)	0,06%
Pluronic L64 (copolímero de bloque de polietilenglicol-polipropilenglicol)	3 g/L
ALPS	3 mM
peroxidasa de rábano picante	3 kU/L
colesterol esterasa de <i>Pseudomonas sp.</i>	750 U/L
colesterol oxidasa de <i>Pseudomonas sp.</i>	1,5 kU/L

donde "ALPS" es N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina y "Na<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>" es NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en proporciones que pueden proporcionar un pH entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 8,5, p. ej., aproximadamente pH 7,4.

La Tabla 3 proporciona una comparación entre las cantidades de sulfato de dextrano y de cloruro de magnesio empleadas en los novedosos reactivos y ensayos descritos en la presente memoria, y las cantidades de sulfato de dextrano y de cloruro de magnesio empleadas en los métodos de la técnica anterior. En algunos ensayos de la técnica anterior se pueden utilizar sulfato de dextrano y cloruro de magnesio para precipitar lipoproteínas durante los ensayos para colesterol y ésteres de colesterol. Como se ilustra en la Tabla 3, los presentes ensayos incluyen concentraciones diferentes de sulfato de dextrano y de cloruro de magnesio, de forma que sustancialmente no hay precipitación de lipoproteínas en los presentes ensayos.

Tabla 3: Comparación de algunas concentraciones de componentes de reactivo

Interactuante	Presentes ensayos novedosos (concentración)	Método establecido <sup>‡</sup> (concentración)
sulfato de dextrano	1 g/L	0,0091 g/L
cloruro de magnesio	4 mM	32 mM

<sup>‡</sup> método establecido: método de sulfato de dextrano-cloruro de magnesio de Kimberly *et al.*, *Clinical Chemistry* 45(10):1803-1812 (1999).

Ejemplo 2 - Ensayos para colesterol

1) Se combinaron, a 37 °C, 30 µL de muestra (plasma puro o suero diluido 1:30 en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS)) con 20 µL de reactivo AC en un pocillo de un lector de microplacas de 384 pocillos (MTP).

2) Se agitó mediante sacudidas la placa durante 2 segundos a 1.800 rpm.

3) Se incubó la placa a 37 °C durante 5 minutos.

4) Se añadieron 20 µL de reactivo BC. Se agitó mediante sacudidas la placa durante 2 segundos a 1.800 revoluciones por minuto (rpm).

5) Se incubó la placa a 37 °C durante 12 minutos en un espectrofotómetro capaz de leer la absorbancia a intervalos de tiempo determinados.

6) Se registró la absorbancia (A) a 560 nm y 700 nm cada 30 segundos (se utilizó un espectrofotómetro M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para realizar las mediciones). Nótese que también son adecuados otros intervalos, incluso intervalos más largos.

Muestras:

La Figura 2 muestra el contenido lipídico de lipoproteínas medido en las muestras clínicas de suero (incluidos los resultados para triglicérido) utilizadas para los estudios que se muestran en los ejemplos. Como puede verse, existía una correlación escasa o nula entre el colesterol de las diversas subformas de lipoproteína. Además, los niveles de colesterol abarcaban el rango observado en sujetos normales y en los aquejados de lipemia, por lo que proporcionaban un buen conjunto de prueba para los métodos de la invención. En los datos a continuación, las muestras se analizaron también mediante un método de referencia utilizando el sistema químico Advia<sup>®</sup> Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Tarrytown, NY).

Curso temporal de la reacción del ensayo para colesterol:

La formación de color se produce en el presente método de ensayo para colesterol en varias fases. Se ilustran ejemplos de dicha formación de color por fases en los resultados obtenidos para una muestra medida en un experimento ilustrativo, como se presenta en la Figura 3 (los tiempos se refieren al tiempo después de añadir el reactivo BC). Las fases incluyeron:

1. Una fase rápida (de 0 a aproximadamente 2 minutos) en la que se consumieron C-LAD y C-LBD.
2. Un proceso sigmoidal correspondiente a un ligero "retraso" seguido de un rápido aumento en la formación de color (de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 minutos) en el que se consumió el C-LBD restante.
3. Un consumo relativamente lento de colesterol de LMB (aproximadamente 6 - 10 minutos o más) en una tercera fase.

Medición de especies lipoproteicas mediante el presente método y correlaciones con resultados de métodos de referencia:

En algunos casos también se midieron materiales testigo comercialmente disponibles. El CT se midió utilizando  $\Delta A$  (560-700 nm) a los diez minutos. El C-LBD se midió por la diferencia en  $\Delta A$  (560-700 nm) que se produjo entre dos y seis minutos. El C-LAD se midió mediante  $\Delta A_t$ , el cambio en  $\Delta A$  (560-700 nm) que se produjo entre cero y dos minutos ( $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a 560 nm y la absorbancia medida a 700 nm). En los experimentos del presente ejemplo se midió  $\Delta A$  mediante un espectrofotómetro M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Las mediciones marcadas como "Ensayo de referencia" se realizaron utilizando la química y los métodos Advia® de Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.).

Se obtuvieron las siguientes correlaciones que satisfacen los requisitos de ensayos clínicos:

10 Colesterol de LBD: para 15 muestras y testigos:  $y = 0,989x$ ;  $R^2 = 0,978$ ; rango de  $x$ : 7,7 - 230 mg/dL; media de  $x = 118,1$ ; error estándar de la estimación/media = 6,8%

Colesterol de LAD: para 10 muestras:  $y = 0,98x + 1,35$ ;  $R^2 = 0,98$ ; rango de  $x$  40,3 - 103,4 mg/dL; media de  $x$  67,2 mg/dL; error estándar de la estimación/media = 4,0%

15 Colesterol total: para 14 muestras y testigos:  $y = 0,977x$ ;  $R^2 = 0,980$ ; rango de  $x$  15 - 304 mg/dL; media de  $x = 195,6$  mg/dL; error estándar de la estimación/media = 4,3% (donde \* indica multiplicación).

En la Figura 4 se muestran en forma gráfica estos resultados de los presentes métodos y los métodos de referencia. En la Figura 4A se muestran en forma gráfica los resultados de C-LBD de los presentes métodos y los métodos de referencia. En la Figura 4B se muestran en forma gráfica los resultados de C-LAD de los presentes métodos y los métodos de referencia. En la Figura 4C se muestran en forma gráfica los resultados de CT de los presentes métodos y los métodos de referencia.

La fórmula para calcular C-LAD se dedujo utilizando la estimación de C-LBD del mismo ensayo más la velocidad medida entre 0 y 2 minutos (donde \* indica multiplicación):

$$\text{Colesterol de LAD} = 1,30 - 0,446 * \text{C-LBD} + 1.255,5 * (\Delta A (560-700 \text{ nm}), 2 \text{ min.} - (\Delta A (560 - 700 \text{ nm}), 0 \text{ min.}))$$

25 La fórmula para calcular C-LAD se dedujo utilizando la estimación de C-LBD del mismo ensayo más la velocidad medida entre 0 y 2 minutos (donde \* indica multiplicación):

$$\text{Colesterol de LAD} = 1,30 - 0,446 * \text{C-LBD} + 1.255,5 * (\Delta A (560-700 \text{ nm}), 2 \text{ min.} - (\Delta A (560 - 700 \text{ nm}), 0 \text{ min.}))$$

Ambos factores (C-LBD y  $(\Delta A (560-700 \text{ nm}), 2 \text{ min.} - (\Delta A (560-700 \text{ nm}), 0 \text{ min.}))$ ) estaban correlacionados de manera muy significativa ( $p < 0,0001$ ).

30 La ecuación anterior se dedujo mediante un análisis por regresión múltiple de resultados de ensayo presentados en la presente memoria utilizando combinaciones de prueba y error de las absorbancias medidas, CT y C-LBD calculados a partir de los datos de absorbancia.

Conclusión : el uso de formulaciones específicas de reactivos y la medición cinética del producto de reacción permiten medir simultáneamente colesterol total, LBD y LAD.

### Ejemplo 3 Ensayos para triglicérido

35 Los niveles de triglicérido (TG) se pueden medir mediante un ensayo en el cual se descomponen en sus ácidos grasos constitutivos y glicerol los triglicéridos de una muestra, y se miden fotométricamente los niveles de glicerol como se indica en la Figura 1B. El glicerol puede ser fosforilado por la glicerol cinasa en presencia de adenosintrifosfato (ATP), y el fosfato de glicerol resultante puede ser oxidado por la glicerol 3-fosfato oxidasa para producir fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, con peroxidasa de rábano picante (u otra peroxidasa) puede reaccionar con colorantes para producir un tinte que se puede medir mediante un espectrofotómetro para determinar el contenido de triglicérido de la muestra. En la Tabla 4 se muestran reactivos ilustrativos, reactivo AT y reactivo BT, para uso en este ensayo de TG. Como se muestra en el presente ejemplo, 4-aminoantipireno con N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina reaccionarán con peroxidasa de rábano picante en presencia de peróxido de hidrógeno para formar un tinte púrpura de quinonaimina; la cantidad de tinte formado se puede determinar midiendo la absorbancia a 560 nm, como se indica en el procedimiento que sigue, y como se demuestra en los resultados experimentales expuestos en la Figura 5.

### Reactivos de ensayo para triglicérido

50 Este ensayo utiliza una cascada de reacciones enzimáticas que origina la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que es utilizado por la peroxidasa de rábano picante (HRP) para producir un producto de color púrpura. Los reactivos utilizados en tales ensayos incluyen un reactivo AT y un reactivo BT. En la Tabla 4A se muestran ejemplos de composiciones adecuadas para tales reactivos, y en la Tabla 4B se muestran las composiciones de reactivos AT y BT ilustrativos específicos particulares.

Tabla 4A - Reactivos de ensayo para triglicérido

Componentes del reactivo AT	Rango de concentración
sal de adenosin-5'-trifosfato (ATP) (de sodio, potasio, acetato u otra sal)	de 0,1 mM a 10 mM
sal de magnesio (p. ej., cloruro, sulfato, acetato, carbonato u otra sal)	de 0,5 mM a 50 mM
lipasa (p. ej., una lipasa bacteriana)	de 1.000 a 1.000.000 U/L
tensioactivo (por ejemplo, un tensioactivo Triton™, TWEEN® o Pluronic®)	de 0,01% a 5%
solución salina tamponada (p. ej., solución tamponada con fosfato, HEPES o MOPS)	de 1 a 300 mM

Componentes del reactivo BT	Concentración
peroxidasa (p. ej., de rábano picante, HRP)	de 150 U/L a 15.000 U/L
4-aminoantipireno (4-AA)	de 0,1 mM a 10 mM
N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina, sal de sodio (ALPS)	de 0,4 mM a 40 mM
glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO)	de 100 U/L a 20.000 U/L
glicerol cinasa (GK) (por ejemplo, de bacterias)	de 5 U/L a 5.000 U/L
solución salina tamponada (p. ej., solución tamponada con fosfato, HEPES o MOPS)	de 1 mM a 300 mM

- 5 Se pueden preparar reactivos AT y BT particulares ilustrativos conforme a los ingredientes y cantidades que se exponen en la Tabla 4B.

Tabla 4B - Reactivos de ensayo para triglicérido

Componentes del reactivo AT	Concentración
sal disódica de adenosin-5'-trifosfato (ATP)	1,5 mM
cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ), anhidro	20 mM
lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	400.000 U/L
etoxilato de octilfenol (p. ej., Triton X-100®)	0,3%
PBS con Tween 20®	diluido a "1X" (K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> ~10 mM, NaCl ~138 mM, KCl ~2,7 mM, ~0,05% de Tween 20®)

Componentes del reactivo BT	Concentración
peroxidasa de rábano picante (HRP)	5.000 U/L
4-aminoantipireno (4-AA)	1 mM
N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina, sal de sodio (ALPS)	4 mM

glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) de microorganismo	5.000 U/L
glicerol cinasa (GK) de <i>Cellulomonas sp.</i>	250 U/L
PBS con Tween 20®	diluido a "1X" (K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> ~10 mM, NaCl ~138 mM, KCl ~2,7 mM, ~0,05% de Tween 20®)

Procedimiento de ensayo ilustrativo para triglicérido en suero sanguíneo de plasma anticoagulado con AEDT:

1. Se diluyeron las muestras (y/o calibradores) 1:30 con agua.
2. Antes del ensayo se llevaron a 37 °C los reactivos y las muestras diluidas.
3. En los pocillos de una placa de microvaloración de 384 pocillos se mezclaron respectivamente 20 µL de muestra diluida, de reactivo AT y de reactivo BT como se describen en la Tabla 4B.
4. Se incubó a 37 °C durante 10 minutos la mezcla de muestra diluida, reactivo AT y reactivo BT como se describen en la Tabla 4B.
5. Después del paso 4 se leyó en un lector de placas de microvaloración (Molecular Devices M5) la absorbancia a 560 nm

En la Figura 5 se muestran las mediciones de TG realizadas conforme a los métodos descritos en lo que antecede (las mediciones que proporcionan la posición de los puntos de datos están a lo largo del eje vertical); los puntos de datos se representan gráficamente frente a las mediciones de TG según un método de la técnica anterior (el método sugerido por Tecco Diagnostics, utilizando los reactivos del kit Tecco comercialmente disponible (Tecco Diagnostics, Anaheim, CA 92807)). Los TG medidos por los presentes métodos coincidieron muy estrechamente con las mediciones de TG según la técnica anterior. Si hubiera habido un acuerdo perfecto entre la técnica anterior y los presentes métodos, la pendiente de la línea trazada a través de estos puntos tendría una pendiente 1. Como se muestra en la Figura 5, la pendiente de la línea trazada mediante regresión lineal a través de estos puntos tenía una pendiente muy cercana a uno (pendiente = 0,9536). Por lo tanto, los métodos de determinación de TG mostrados en este ejemplo se correlacionan muy bien con los de otros métodos bien aceptados.

#### Ejemplo 4 Mediciones combinadas de colesterol y triglicérido en sangre

Se pueden realizar mediciones de colesterol (C) y triglicérido (TG) sobre partes alícuotas de la misma muestra de sangre, o sobre muestras de sangre separadas, tomadas del mismo paciente, con el fin de proporcionar información clínica más completa de la que estaría disponible a partir de la medición de C solo o de TG solo. Además, se pueden utilizar las mediciones de TG para proporcionar una medida de la LMBD en la muestra de sangre. Por lo tanto, mediante los métodos de los Ejemplos 1, 2 y 3, y estimando C-LMBD por la fórmula:

$$C-LMBD = TG/5$$

se pueden obtener medidas de C-LBD, C-LAD, CT, C-LMBD y TG.

El CT se puede medir directamente según los métodos y ensayos descritos en la presente memoria; se pueden medir directamente, de manera similar, C-LAD y C-LBD según los métodos y ensayos descritos en la presente memoria. Al ser CT una medida del colesterol total en una muestra, CT es la suma del colesterol presente en las fracciones lipoproteicas de la muestra, por lo que se puede estimar por la relación  $CT = C-LAD + C-LBD + C-LMBD$ . Por consiguiente, reorganizándolo, se puede obtener una mejor determinación de C-LMBD a partir de las cantidades medidas de C-LAD, C-LBD y CT de la siguiente manera:

$$C-LMBD = CT - C-LAD - C-LBD$$

y se puede determinar según los métodos y fórmulas descritos en la presente memoria.

Como se ha discutido más arriba, se describen métodos adicionales para determinar C-LMBD a partir de los valores medidos de C-LAD, C-LBD y CT, y de los valores medidos de TG, C-LAD, C-LBD y CT. Por ejemplo, en ciertos casos, el nivel de C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto se puede calcular mediante la siguiente relación:

$$C-LMBD = \alpha TC + \beta C-LAD + \gamma C-LBD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$$

donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, C-LBD, TG y al término cruzado  $(TG + \epsilon)(CT + \kappa)$ , respectivamente, (en un término cruzado los términos de un paréntesis multiplican a los términos del otro paréntesis); y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente. En un caso particular, cuando  $\gamma = 0$ , a partir de estas mediciones se puede calcular el nivel de



C-LMBD en una única muestra, o una única parte de una muestra, de sangre de un sujeto, por ejemplo mediante la relación:

$$\text{C-LMBD} = \alpha\text{TC} + \beta\text{C-LAD} + \delta\text{TG} + a_1(\text{TG} + \epsilon)(\text{CT} + \kappa) + \lambda$$

5 donde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $a_1$  son constantes que multiplican a CT, C-LAD, TG y  $(\text{TG} + \epsilon)(\text{CT} + \kappa)$ , respectivamente; y donde  $\epsilon$ ,  $\kappa$  y  $\lambda$  son constantes aditivas que suman a TG, CT y la suma de todos los demás factores, respectivamente.

10 En la Figura 6 se muestra un ejemplo de tal cálculo de C-LMBD, donde se representan gráficamente 20 valores de C-LMBD determinados mediante la anterior ecuación, basándose en mediciones como se describen en la presente memoria (representadas a lo largo del eje y) frente a las mediciones correspondientes de C-LMBD realizadas mediante métodos de ultracentrifugación de la técnica anterior (representadas a lo largo del eje x). Como se muestra en la Figura 6, los valores de C-LMBD calculados según la fórmula anterior concuerdan con bastante precisión con los obtenidos mediante métodos de la técnica anterior. En la representación gráfica mostrada en la Figura 6,  $\lambda$  (la "intersección") tiene un valor de -2,62;  $\alpha$  tiene un valor de 0,15;  $\beta$  tiene un valor de -0,55;  $\delta$  tiene un valor de 0,15;  $a_1$  tiene un valor de 0,0015;  $\epsilon$  tiene un valor de -192; y  $\kappa$  tiene un valor de -188. Los valores de C-LMBD calculados mediante la anterior ecuación concuerdan muy bien con los valores de C-LMBD obtenidos por métodos de ultracentrifugación (R al cuadrado vale 0,959). La línea de mejor ajuste que se muestra en la figura se calculó utilizando el software JMP (SAS Institute, Inc., Cary NC, 27513), y el análisis de varianza para este modelo y estos parámetros tenía una relación F de 93,4, lo que indica que se encontraría por casualidad un ajuste tan bueno con una probabilidad inferior a 0,001, lo que representa un resultado altamente significativo.

20 Aunque lo que antecede es una descripción del caso que se describe en la presente memoria, es posible emplear diversas alternativas, modificaciones y equivalentes. Debe entenderse que, tal como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, los significados de "un/uno/una" y "el/la" incluyen la referencia en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Además, tal como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre", salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por último, tal como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, los significados de "y" y "o" incluyen tanto la conjunción como la disyunción, y se pueden usar indistintamente salvo que el contexto indique expresamente otra cosa. Así, en contextos en donde se usan los términos "y" u "o", el uso de tales conjunciones no excluye un significado de "y/o", salvo que el contexto indique expresamente otra cosa.

30 El presente documento contiene material sujeto a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor (solicitante en la presente memoria) no tiene ninguna objeción a la reproducción facsimilar de los documentos y descripciones de patente, tal como aparecen en el archivo o los registros de patente de la US Patent and Trademark Office (Oficina de patentes y marcas de los EE. UU.), pero en todo lo demás se reserva todos los derechos de autor de cualquier tipo. Se aplicará el siguiente aviso: Copyright 2012 Theranos, Inc.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para medir al menos dos componentes lipoproteicos en una muestra de sangre procedente de un sujeto, en donde dichos al menos dos componentes lipoproteicos se seleccionan de colesterol total (CT), colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LBD) y colesterol de lipoproteína de alta densidad (C-LAD), comprendiendo dicho método:
- 10 combinar al menos una parte de dicha muestra de sangre con un primer reactivo para proporcionar una primera solución combinada, en donde dicho primer reactivo comprende un agente de solubilización de lipoproteína, un interactuante con lipoproteína y un tampón; en donde el interactuante con lipoproteína comprende un polisacárido cargado negativamente y un catión divalente, o una sal del mismo, en una proporción entre 0,001 y 0,1 y en donde dicho interactuante con lipoproteína está presente a un nivel de concentración que origina la conversión de colesterol de LAD en un producto coloreado medible, a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LBD en un producto coloreado medible y a una velocidad sustancialmente distinta que la conversión de colesterol de LMBD en un producto coloreado medible
- 15 añadir a dicha primera solución combinada un segundo reactivo para proporcionar una segunda solución combinada, en donde dicho segundo reactivo comprende un tampón, un agente anfífilo, una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y un colorante, en donde a dicho momento de adición de dicho segundo reactivo a dicha primera solución combinada se le denomina momento inicial; y
- 20 medir la absorbancia lumínica de dicha segunda solución combinada dentro de un primer período de tiempo, dentro de un segundo período de tiempo y después de un tercer tiempo, en donde dichos períodos de tiempo y dicho tercer tiempo se pueden determinar con respecto a dicho momento inicial, y
- medir las cantidades de lipoproteína de al menos dos componentes lipoproteicos en la muestra de sangre a partir de dichas mediciones de absorbancia,
- con lo que se miden al menos dos componentes lipoproteicos en una muestra de sangre procedente de un sujeto.
- 25 2. El método según la reivindicación 1, que comprende medir al menos dos componentes lipoproteicos seleccionados de CT, C-LBD y C-LAD,
- en donde se mide C-LAD por la diferencia entre la  $\Delta A$  medida en dicho momento inicial y la  $\Delta A$  medida al final de dicho primer período de tiempo, donde  $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a dos longitudes de onda luminosa distintas;
- 30 en donde se mide C-LBD por la diferencia entre la  $\Delta A$  medida al comienzo de dicho segundo período de tiempo y la  $\Delta A$  medida al final de dicho segundo período de tiempo; y
- en donde se mide CT por la  $\Delta A$  medida en dicho tercer tiempo;
- con lo que se miden en una muestra de sangre dos o más de C-LAD, C-LBD y CT.
- 35 3. El método según la reivindicación 2, que comprende la medición combinada de todas las lipoproteínas colesterol de lipoproteína de alta densidad (C-LAD), colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LBD) y colesterol total (CT) en la misma muestra de sangre, o la misma parte de una muestra de sangre, y opcionalmente en donde se miden dichas lipoproteínas en una muestra de sangre sin precipitación sustancial de las lipoproteínas.
4. El método según la reivindicación 2, donde  $\Delta A$  es la diferencia entre la absorbancia medida a 560 nm y a 700 nm.
- 40 5. El método según la reivindicación 2, en donde dicho agente anfífilo comprende un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos no iónicos; tensioactivos aniónicos; tensioactivos catiónicos; tensioactivos zwitteriónicos; y derivados, análogos y combinaciones de los mismos, y
- en donde dicho colorante comprende uno o varios de una peroxidasa, un sustrato para peroxidasa, un compuesto de aminoantipireno y un compuesto que contiene anilina.
- 45 6. El método según la reivindicación 2, en donde dicho primer reactivo comprende sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón de fosfato de sodio, y dicho segundo reactivo comprende Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.*, colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.* y un tampón de fosfato de sodio.
7. El método según la reivindicación 2, que comprende además
- 50 medir triglicérido (TG) en una segunda muestra de sangre o una segunda parte de una muestra de sangre procedente de dicho sujeto; y calcular colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (C-LMBD) dividiendo por 5 la concentración de TG en la muestra;

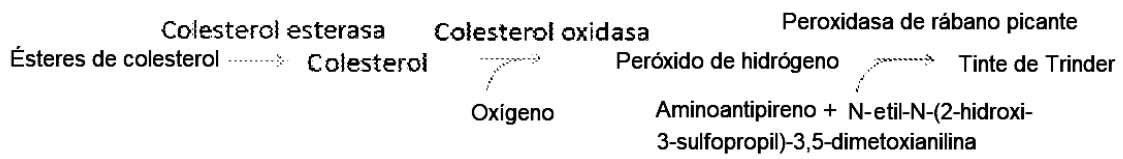
con lo que se obtiene la medición combinada de C-LAD, C-LBD, C-LMBD, CT y TG en dos muestras de sangre o dos partes de una muestra de sangre.

8. El método según la reivindicación 7, en donde calcular C-LMBD comprende calcular C-LMBD mediante la fórmula:

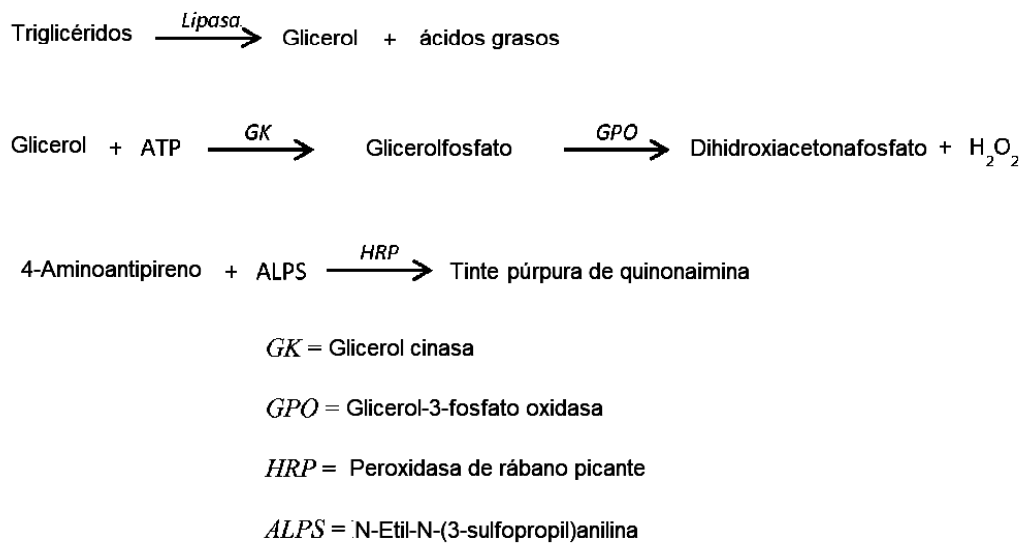
$$C-LMBD = \alpha TC + \beta C-LAD + \delta TG + a_1(TG + \epsilon)(CT + \kappa) + \lambda$$

5 donde  $\lambda$  tiene un valor entre aproximadamente 0 y aproximadamente -5;  $\alpha$  tiene un valor entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,3;  $\beta$  tiene un valor entre aproximadamente 0 y aproximadamente -2;  $\delta$  tiene un valor entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,3;  $a_1$  tiene un valor entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,003;  $\epsilon$  y  $\kappa$  tienen un valor entre aproximadamente -100 y aproximadamente -300.

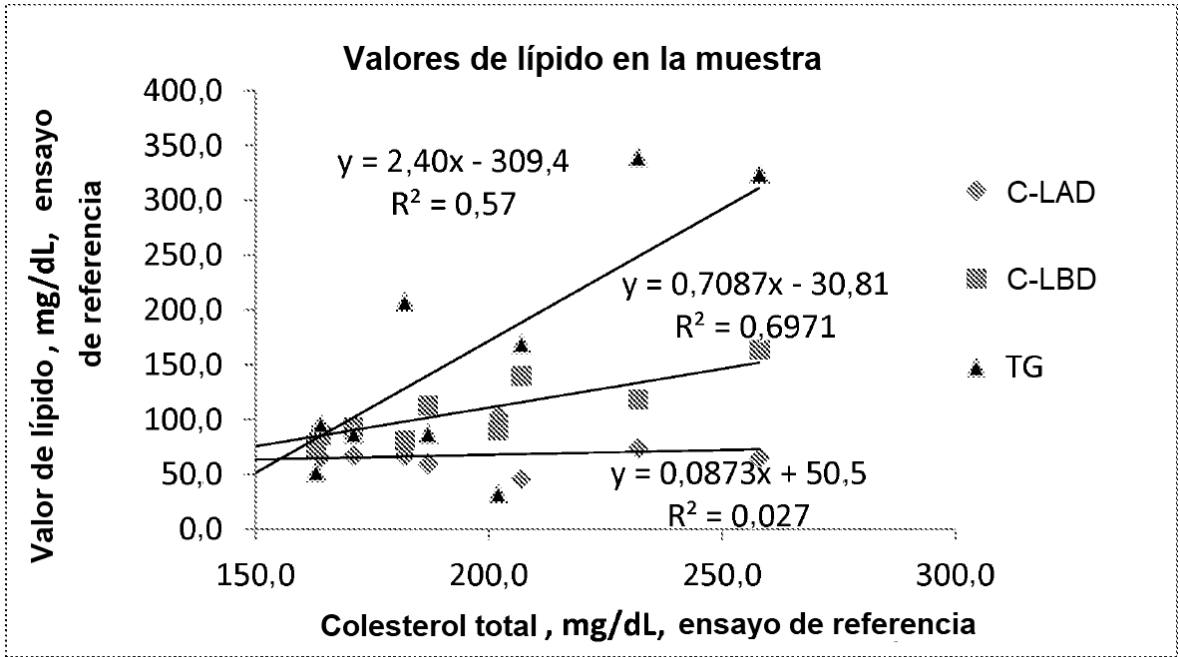
10 9. El método según la reivindicación 7, en donde dicho primer reactivo comprende sulfato de  $\alpha$ -ciclodextrina, sulfato de dextrano, cloruro de magnesio, 4-aminoantipireno y un tampón de fosfato de sodio, y dicho segundo reactivo comprende Triton X-100, Pluronic L64, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (ALPS), colesterol esterasa de *Pseudomonas sp.*, colesterol oxidasa de *Pseudomonas sp.* y un tampón de fosfato de sodio.



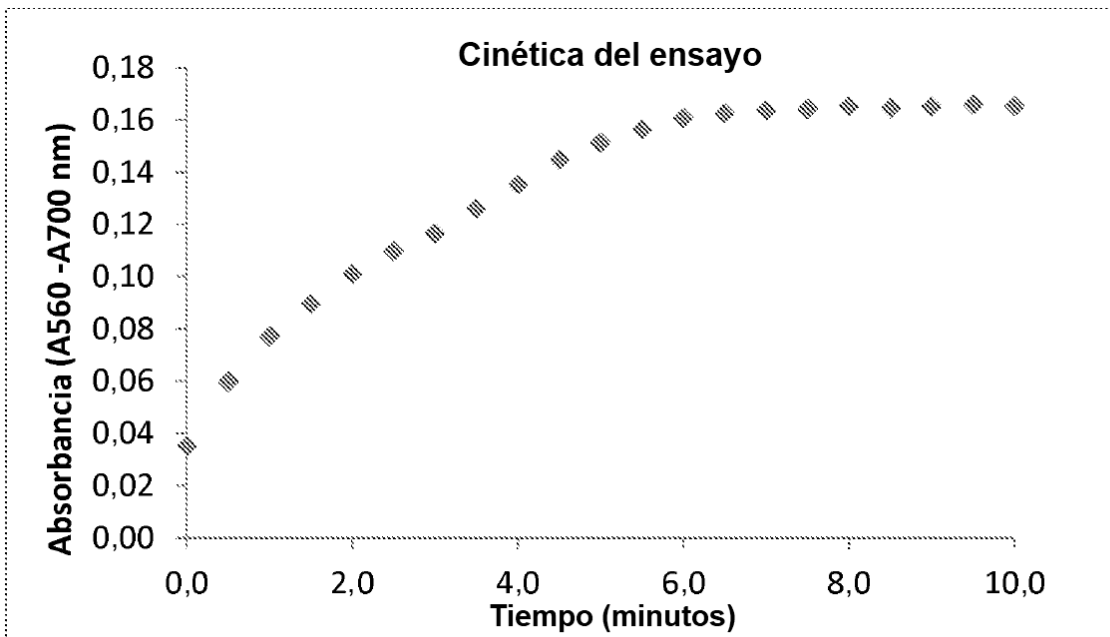
**Fig. 1A**



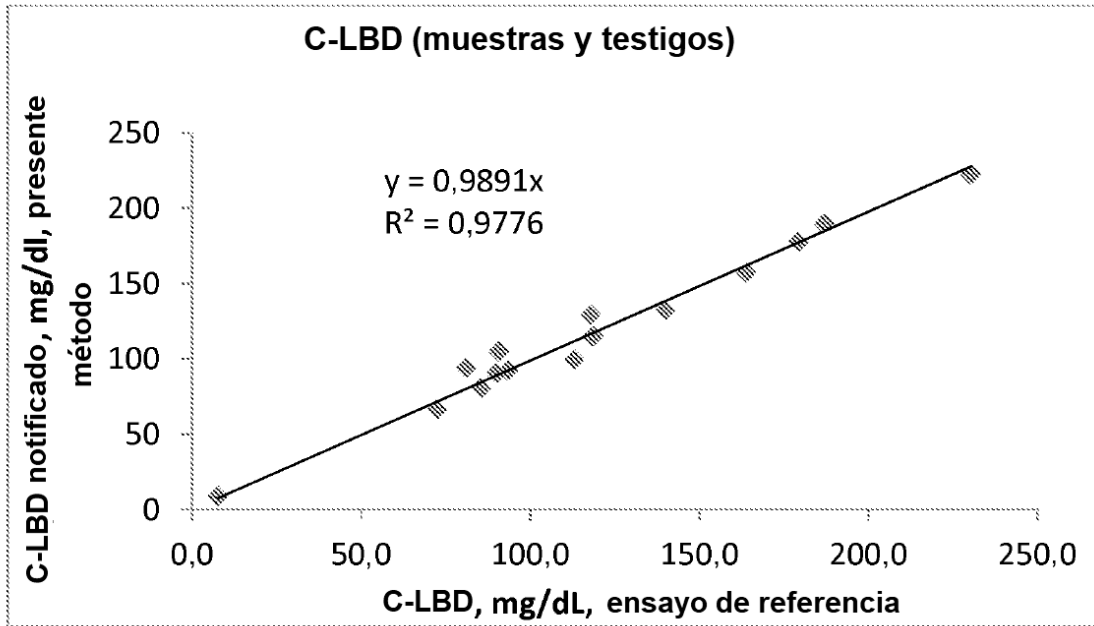
**Fig. 1B**



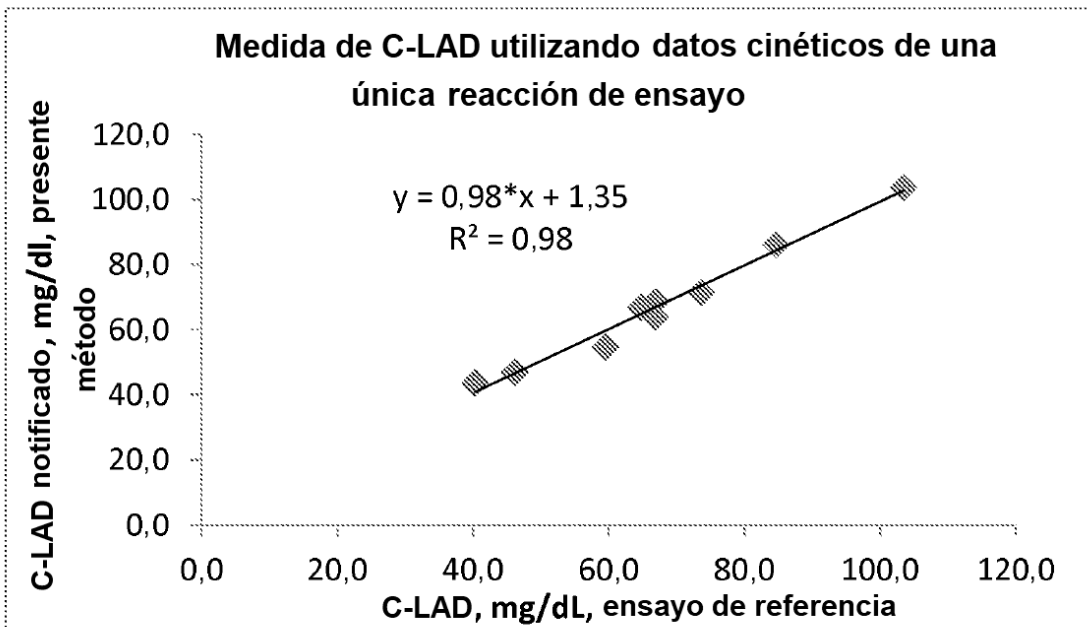
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4A**



**Fig. 4B**

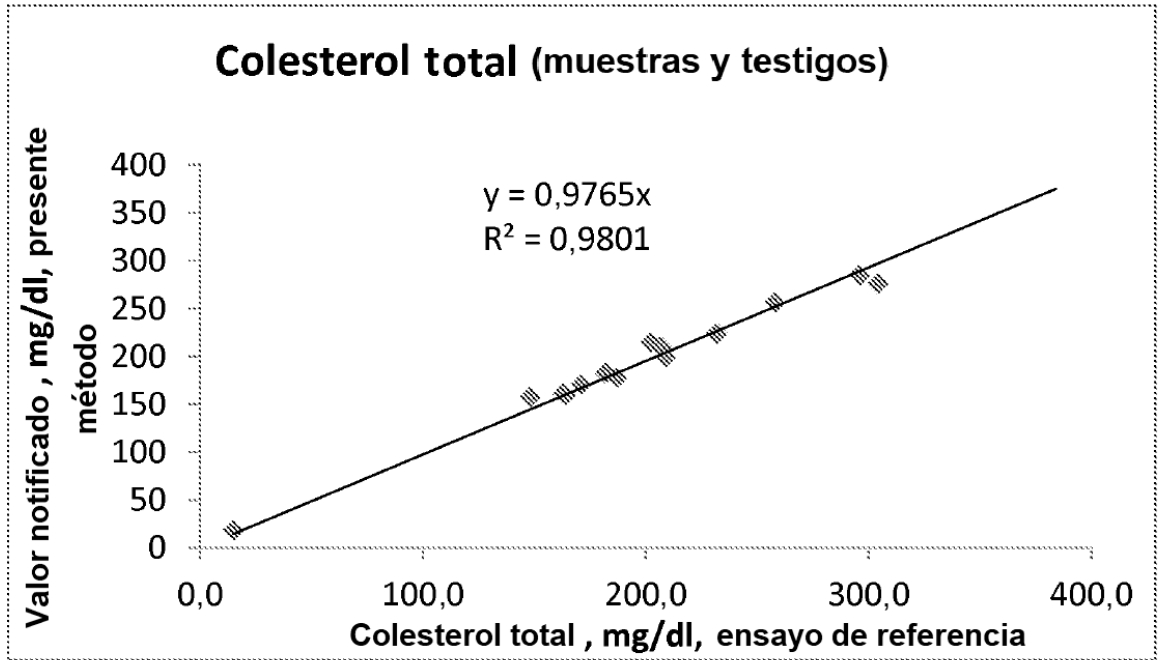


Fig. 4C

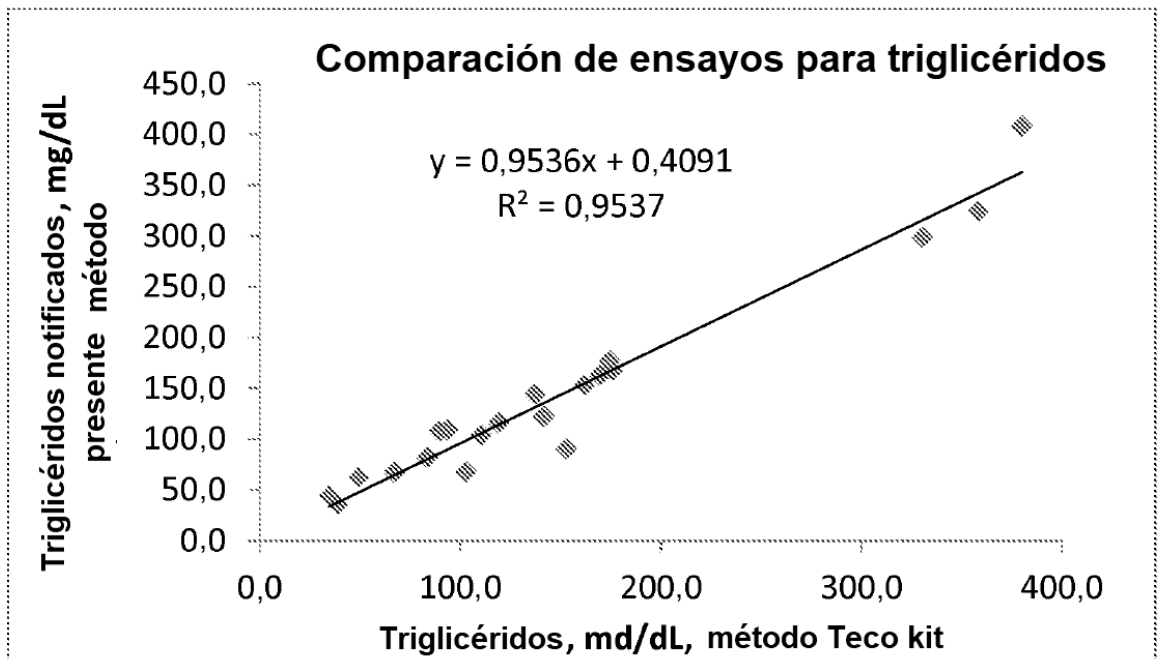
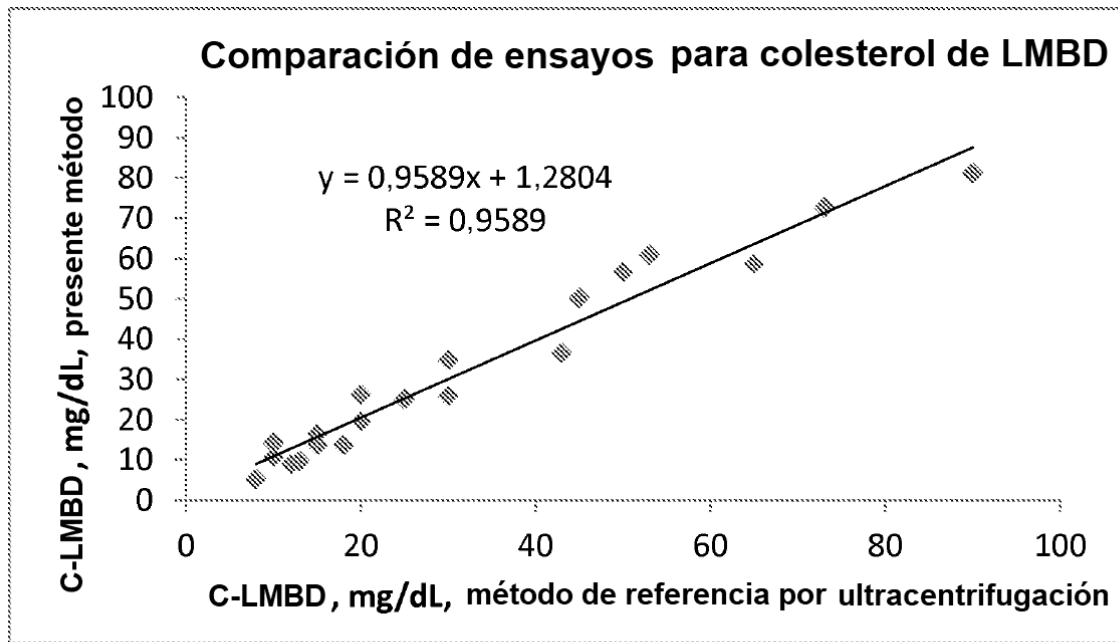


Fig. 5



**Fig. 6**