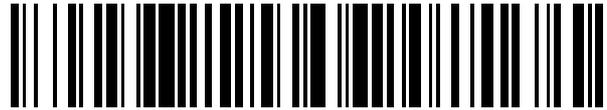


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 963**

21 Número de solicitud: 201831028

51 Int. Cl.:

C07B 63/00 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 LEIOA (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**VECINO CORDERO, Elena;
ACERA OSA, María Aranzazu;
OCHOA OLASCOAGA, Begoña;
ABAD GARCÍA, Beatriz;
RUEDA ESTEVEZ, Yuri y
PEREIRO DÍEZ, Xandra**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA EXTRAER LÍPIDOS DE LA LÁGRIMA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método para extraer lípidos de la lágrima mediante el empleo de isopropanol así como a métodos de análisis lipidómico a partir de los extractos obtenidos con dicho método y a métodos de diagnóstico de enfermedades oculares a partir de dicho perfil lipidómico. Adicionalmente, la invención se refiere a un kit para la extracción de los lípidos de la lágrima.

ES 2 755 963 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA EXTRAER LÍPIDOS DE LA LÁGRIMA

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con un método para extraer lípidos de la lágrima y con un método para detectar diferencias en el perfil lipídico entre dos muestras diferentes, así como con un kit para la extracción de los lípidos de la lágrima.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La lágrima es un fluido que cubre la superficie de la córnea y mantiene la homeostasis de la superficie ocular. Hidrata y lubrica las membranas que constituyen la superficie ocular y nutre a la córnea avascular. Aunque el volumen de la lágrima es muy pequeño (3-5 microlitros), es un fluido tremendamente complejo por la cantidad de proteínas/péptidos, electrolitos, lípidos y metabolitos que la componen.

El fluido lagrimal forma una película sobre la córnea y la conjuntiva que tiene varias funciones importantes como lubricante, protectora frente a patógenos, nutritiva, humectante y mejora las propiedades ópticas modificando el índice de refracción de la córnea. La lágrima tiene una estructura trilaminar con un gradiente de concentración dependiente. Consiste aproximadamente en una capa mucosa interna enriquecida en mucina, una capa acuosa media y una capa lipídica externa. El mantenimiento del agua y la naturaleza viscosa de la capa mucosa sugiere que las mucinas aumentan las propiedades humectantes y la estabilidad de la película lagrimal. La capa acuosa contiene una gran cantidad de proteínas, muchas de ellas involucradas en la curación de heridas, procesos inflamatorios, así como la protección corneal de diversos patógenos. Algunas de las proteínas interactúan con la capa de lípidos y así pueden tener una función biofísica en la estabilización y organización de la capa lipídica de la lágrima. La capa acuosa también contiene electrolitos y metabolitos. La capa de lípidos estabiliza la película lagrimal al reducir la tensión superficial y controlar la evaporación del agua. La capa de lípidos está en contacto con la piel del párpado y actúa como una barrera para la capa acuosa. Los lípidos forman un sello hermético cuando los párpados están cerrados. Parte de estos lípidos son secretados por las glándulas de Meibomio.

35

Durante las últimas cuatro décadas se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la composición lipídica de la lágrima demostrando que dependiendo del método de análisis, varía la composición lipídica. A pesar de las variaciones en las composiciones publicadas, los ésteres de esteroles y los ésteres de cera parecen ser la especie de lípidos más abundantes en el meibum. Sin embargo, la composición lipídica del fluido lagrimal es mucho más compleja que la del meibum.

Por todo esto, es muy importante un correcto análisis de la composición de la lágrima, que permita obtener una composición completa de los lípidos de la lágrima en un sujeto y poder conocer alteraciones que reflejen patologías oculares.

Se conocen en el estado de la técnica distintos métodos para la obtención de lípidos totales a partir de muestras biológicas. Estos métodos se basan en el empleo de mezclas de solventes puesto que permiten una extracción más exhaustiva que los sistemas de solventes simples. Métodos conocidos en el estado de la técnica para la extracción de lípidos a partir de muestras biológicas incluyen, entre otros:

- Método de Folch: Este método se basa en el empleo de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Aunque se considera el método más fiable para la recuperación de los lípidos totales, en la extracción el perfil de los ácidos grasos permanecen estables, el método subestima sistemáticamente concentraciones en las muestras que contienen más de 2% de lípidos.
- Método Bligh and Dyer (BD): Este método se basa en un sistema bifásico de equilibrio Líquido- Líquido. Las muestras pueden ser analizadas directamente sin necesidad de pre-secarlas y los lípidos obtenidos pueden ser usados para futura determinación. El procedimiento consiste en realizar una cuantificación gravimétrica, en la cual se tienen en cuenta tres pasos para la extracción: 1) Metanol+ cloroformo, 2) Cloroformo y 3) Agua. Después de la separación de fases lípidos totales se determinan en la fase de cloroformo por análisis gravimétrico seguido de la evaporación del solvente. Este método presenta la desventaja de que requiere el empleo de cloroformo, que es un compuesto con cierta toxicidad.
- Método de Röse-Gottlieb: Este método se lleva a cabo mediante el empleo de amoníaco y etanol con un posterior efecto de deshidratación sobre los fosfolípidos. La grasa es disuelta en éter recién destilado y se añade algo de petróleo de tal suerte que se separen algunos compuestos no lipídicos que se puedan encontrar en la fase etérea. Esta mezcla es completamente inmiscible en agua de manera que

mediante una extracción adecuada se puede dejar la grasa en la fase etérea y pesar el residuo graso.

- 5 - Método de Gerber: este, así como los demás métodos volumétricos presentan un carácter un tanto empírico ya que varios factores afectan la gravedad específica de la grasa separada, variaciones propias de la grasa, ácidos grasos presentes, solubilidad de la grasa en los disolventes, etc. Con estos métodos volumétricos la muestra se sitúa en un butirómetro y se descompone utilizando ácidos o álcalis de manera que la grasa es liberada, esta se separa por métodos mecánicos (centrifuga) y se colecta en el cuello calibrado.
- 10 - Métodos basados en el empleo de fluidos supercríticos: Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión. El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que no es ni tóxico, ni inflamable, ni corrosivo, es incoloro, económico, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles. Después del paso del CO₂, este es evaporado y los lípidos son medidos. Las ventajas que presenta este método es que es rápido, utiliza solventes orgánicos y los lípidos pueden ser usados para futuros análisis. Sin embargo el alto costo de los equipos y su complejidad, limita el uso de esta técnica.
- 15
- 20

Los criterios para la selección del método de preparación de la muestra más adecuados deben contemplar el análisis de la recuperación (% de extracción) y cobertura (tipos de lípidos que se extraen), simpleza del procedimiento y reproducibilidad, eficiencia en la eliminación de las proteínas, coste y posibilidad de automatización. Los métodos más comunes para la extracción de lípidos de muestras biológicas son aquellos que se basan en cloroformo:metanol (Folch and Bligh and Dyer) o cloroformo/metanol/agua (2:1:1 v/v/v) (método de Bigh and Dyer).

30 Existe por tanto una necesidad en el estado de la técnica de identificar métodos alternativos a los conocidos que eviten las desventajas de éstos y, particularmente, que reduzca el empleo de disolventes tóxicos pero que a la vez permitan una recuperación eficaz del mayor número de especies de lípidos presentes en la lágrima.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto la invención se relaciona con un método para extraer lípidos de la
5 lágrima de un sujeto que comprende:

- (i) poner en contacto una muestra de lágrima con isopropanol en condiciones adecuadas para extraer lípidos,
- (ii) aplicar a la muestra condiciones adecuadas para la separación de las fases acuosa y alcohólica, y
- 10 (iii) recuperar la fase alcohólica.

En un segundo aspecto la invención se relaciona con un método para diagnosticar en un sujeto una enfermedad caracterizada por una alteración en el contenido de al menos un lípido de la lágrima que comprende:

- 15 (i) extraer lípidos de la lágrima de dicho sujeto a partir de una muestra de lágrima mediante el método del primer aspecto,
 - (ii) determinar el contenido de dicho lípido en el extracto obtenido en la etapa (i) y
 - (iii) comparar el contenido de dicho lípido con un valor de referencia
- en donde una alteración en el contenido de dicho lípido con respecto al valor de referencia
20 es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad.

En un tercer aspecto la invención se relaciona con un método para detectar diferencias en el perfil lipídico entre dos muestras de lágrima que comprende:

- 25 (i) extraer los lípidos de ambas muestras empleando el método según el método del primer aspecto,
- (ii) caracterizar el perfil lipídico de cada muestra, y
- (iii) comparar los perfiles lipídicos de ambas muestras.

En un cuarto aspecto la invención se relaciona con un kit para análisis de lípidos de la
30 lágrima que comprende:

- (i) al menos un éster de cera,
- (ii) al menos un esteroles,
- (iii) al menos un esfingolípido ,
- (iv) al menos un ácido graso omega O-acilado ,
- 35 (v) al menos un glicerolípido y
- (vi) al menos un glicerofosfolípido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Reproducibilidad. Análisis PCA en modos ESI+ y ESI- con el protocolo IPA. Se observa que el método IPA resulta en una menor dispersión y, por tanto, en una mayor reproducibilidad que el método BD.

Figura 2. Reproducibilidad. Histogramas en los que se muestra una mayor reproducibilidad de los datos mediante el método de extracción IPA que BD. (OC= Quality control, patrón de control interno).

Figura 3. Porcentaje de recuperación de lípidos mediante los métodos IPA y BD en el análisis de los lípidos de la lágrima en ESI negativo. Porcentaje de recuperación de cada clase de lípido según el protocolo de extracción empleado. Los resultados muestran que la recuperación es muy similar en los dos casos pero hay más variabilidad en los datos obtenidos mediante BD que mediante IPA. Se observa que en ESI negativo la recuperación de los lípidos es mayor mediante el método IPA que mediante el método BD. Se observan bastantes diferencias en los lípidos de las familias PG y PI, ya que el porcentaje es mayor en IPA que en BD.

Figura 4. Porcentaje de recuperación de lípidos mediante los métodos IPA y BD en el análisis de los lípidos de la lágrima en ESI positivo. Porcentaje de recuperación de cada clase de lípido según el protocolo de extracción empleado. Los resultados muestran que la recuperación es muy similar en los dos casos pero que hay más variabilidad en los datos obtenidos mediante BD que mediante IPA. En el análisis ESI- se observan bastantes diferencias en los lípidos de las familias PG y PI ya que el porcentaje es mayor en IPA que en BD.

Figura 5. Cobertura lipídica. PCA loadings plots (Figure c, d) mostraron que las principales diferencias entre los dos métodos de preparación de las muestras (B&D y IPA) se debe a la selectividad lipídica intrínseca de cada disolvente. Por esta razón, los lípidos polares (PC, LPC, LPE, SM, Cer) fueron extraídos en mayor medida en IPA que en B&D, mientras que para los no polares (TG, DG, CE y WE), ocurrió lo contrario.

Figura 6. Determinación de la composición de la lágrima. Contenido de lípidos presentes en la lágrima en porcentaje (paneles superiores) y en $\mu\text{g/mL}$ (panel inferior) determinados empleando el método BD y el método IPA. Se observa que ambos métodos proporcionan resultados similares.

5

Figura 7. Representación de la concentración de cada lípido identificado en $\mu\text{g/mL}$. Gráfico de barras mostrando el contenido en lágrima de cada uno de los lípidos analizados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para extraer lípidos de la lágrima basado en el empleo de isopropanol que, además de simplificar los procedimientos de extracción conocidos en la técnica, presenta una reproducibilidad mayor que los métodos conocidos. En concreto, el método puesto a punto por los investigadores, en comparación con el método BD, permite reducir la contaminación al extraer la fase acuosa con las proteínas puesto que la fase lipídica se encuentra en la fase superior mientras que en el método BD la fase orgánica se encuentra en la parte inferior, permite su uso directo en cromatografía sin necesidad de una etapa de secado, que es necesaria en el método BD ya que los solventes clorados usados en este método puede interferir en la separación cromatográfica de los lípidos, reduce la pérdida de lípidos asociada a la etapa de precipitación que se lleva a cabo en el método BD en presencia de metanol y acetonitrilo, reduce el coste de la extracción puesto que el isopropanol es más barato que los solventes empleados en el método BD y el tiempo requerido es menor y, además, se aumenta la seguridad del procedimiento puesto que el isopropanol es un solvente relativamente seguro en comparación con los solventes empleados en el método BD. Adicionalmente, el método objeto de la presente invención se caracteriza por mostrar una mayor reproducibilidad, y mayor tasa de recuperación de dos familias de lípidos, en concreto, los fosfatidilglicérols y los fosfatidilinositols (mencionados como PG y PI respectivamente).

25
30

Los lípidos extraídos de acuerdo con el método de la invención pueden ser empleados para el diagnóstico de todas aquellas enfermedades oculares en las que exista una alteración en el perfil de lípidos en sangre.

Método para extraer lípidos de la lágrima

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para extraer lípidos de la lágrima de un sujeto que comprende:

- (i) poner en contacto una muestra de lágrima con isopropanol en condiciones adecuadas para extraer lípidos,
- 5 (ii) aplicar a la muestra condiciones adecuadas para la separación de las fases acuosa y alcohólica, y
- (iii) recuperar la fase alcohólica.

El término "lípidos", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas hidrófobas o anfipáticas, que se caracterizan por ser sustancias solubles en solventes orgánicos e insolubles o poco solubles en soluciones acuosas. De manera no limitativa el término se refiere a: uno o más ácidos grasos (incluyendo ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos), fosfolípidos, triacilgliceroles (triglicéridos), diacilglicéridos, monoacilglicéridos, lisofosfolípidos, jabones, fosfátidos, ceras, esteroides, esfingolípidos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, y otros lípidos conocidos por los expertos en la técnica. Los lípidos incluyen lípidos polares y lípidos neutros. "Lípido polar" se refiere a lípidos que contienen un grupo polar y son más fácilmente solubles en disolventes polares. Los lípidos polares incluyen fosfolípidos. "Fosfolípido" se refiere a lípidos que tienen un grupo fosfato. "Lípido neutro" se refiere a lípidos que no contienen áreas de polaridad y son más fácilmente solubles en disolventes no polares. Los lípidos neutros incluyen triacilgliceroles (TAG). Los ácidos grasos se clasifican en función de la longitud y las características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos de cadena corta, cadena media o cadena larga en función del número de carbonos presentes en la cadena. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos saturados cuando no hay dobles enlaces entre los átomos de carbono, y se denominan ácidos grasos insaturados cuando están presentes dobles enlaces. Los ácidos grasos de cadena larga insaturados son monoinsaturados cuando solo hay un doble enlace y son poliinsaturados cuando hay más de un doble enlace. Los ácidos grasos presentes en el lípido pueden tener de 4 a 28 átomos de carbono. En algunas realizaciones, un lípido comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se clasifican según la posición del primer doble enlace del extremo metilo del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que el omega-6 (n-6) los ácidos grasos contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, a menudo designado como "22: 6 n-3". Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) se definen

como ácidos grasos de 18 y más longitud de cadena carbonada, y son preferiblemente ácidos grasos de 20 o más cadenas de carbono, que contienen 3 o más dobles enlaces. Los LC-PUFA de la serie omega-6 incluyen, pero no se limitan a, ácido di-homo-gammalinoleico (C20: 3n-6), ácido araquidónico (C20: 4n-6) ("ARA"), ácido docosatetraenoico o adrenético (C22: 4n-6) y ácido docosapentaenoico (C22: 5n-6) ("DPA n-6"). Los LC-PUFAs de la serie omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido eicosatrienoico (C20: 3n-3), ácido eicosatetraenoico (C20: 4n-3), ácido eicosapentaenoico (C20: 5n-3) ("EPA "), Ácido docosapentaenoico (C22: 5n-3) y ácido docosahexaenoico (C22: 6n-3). Los LC-PUFA también incluyen ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más enlaces dobles que incluyen, pero no se limitan a, C24: 6 (n-3) y C28: 8 (n-3). Los términos "ácido graso", "ácido graso poliinsaturado" y "PUFA" incluyen no solo la forma de ácido graso libre, sino también otras formas, como la forma de triacilglicerol (TAG), la forma de fosfolípido (PL) y otras esterificadas formas. Como se usa en el presente documento, los términos "éster" y "esterificado" se refieren a la sustitución del hidrógeno en el grupo de ácido carboxílico de una molécula de PUFA con otro sustituyente. Los expertos en la técnica conocen ésteres típicos, entre los que se incluyen, de forma no limitativa, metilo, etilo, tricloroetilo, propilo, butilo, pentilo, terc-butilo, bencilo, nitrobencilo, metoxibencilo y benzhidrilo. De forma no limitativa, entre los lípidos biológicos se incluyen: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, isoprenoides, glucolípidos y poliquétidos.

El término "lágrima" se refiere a la secreción de la glándula lacrimal que se vierte por los ojos. Interviene fundamentalmente en la óptica ocular y en el normal funcionamiento del globo ocular y de sus estructuras. En una realización particular, la muestra de lágrima puede congelarse después de su extracción. En otra realización particular la muestra de lágrima puede estar constituida por un pool de muestras de lágrima, provenientes de uno o de los dos ojos de un único sujeto, o de varios sujetos.

En una primera etapa, el método para el aislamiento de lípidos de lágrima comprende la etapa de poner en contacto una muestra de lágrima con isopropanol en condiciones adecuadas para extraer lípidos.

La muestra de lágrima se puede obtener empleando cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica, tales como tiras de Schirmer, bastones de poliéster, hemostetas y capilares de vidrio. En una realización preferida las muestras de lágrima se obtienen por medio de capilares de vidrio. En una realización más preferida, la muestra de lágrima tiene un volumen de entre 2 y 10 μ l.

Por "condiciones adecuadas para extraer lípidos" se entiende cualquier condición que permita solubilizar los lípidos de la lágrima en el isopropanol. De manera no limitativa, los parámetros que pueden afectar a dicha solubilización son cualquiera de los conocidos en la técnica para solubilizar compuestos de muestras biológicas, tales como: añadir un solvente a la muestra de lágrima hasta un volumen óptimo para su posterior manipulación, volumen de solvente con respecto al volumen final de muestra, tiempo de incubación de la muestra en el solvente correspondiente, temperatura de incubación, emplear uno o más pulsos de agitación (como puede ser por ejemplo con un vortex) para mezclar adecuadamente, condiciones de pH, concentración de sales y/o repetir el procedimiento de extracción más de una vez a partir de la misma muestra. De acuerdo con la invención, una vez obtenida la muestra de lágrima, el volumen final de la muestra a solubilizar en isopropanol puede ser cualquiera que resulte de interés añadiendo cualquier solvente conocido a la muestra de lágrima extraída. En una realización particular la muestra a solubilizar en isopropanol puede estar constituida por un pool de muestras de lágrima, provenientes de uno o de los dos ojos de un único sujeto, o de varios sujetos.

En una realización preferida, la muestra de lágrima se diluye en un solvente antes de ponerlo en contacto con el isopropanol. En una realización más preferida, el solvente añadido a la muestra es un solvente acuoso, preferiblemente agua. En otra realización preferida, la muestra de lágrima se diluye un factor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 10^4 , 10^5 o más antes de llevar a cabo la extracción. En una forma preferida de realización, el volumen de la muestra es de 10 μ l. En otra forma preferida de realización, la muestra se diluye aproximadamente 10 veces que, en el caso de que se parta de una muestra de 10 μ l implica la adición de 90 μ l del diluyente. En una forma preferida de realización, el diluyente es agua, preferiblemente agua ultrapura.

Una vez extraída la lágrima y diluida en el volumen de interés se mantendrá la muestra en condiciones adecuadas para la extracción de los lípidos. En una realización preferida las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden añadir un volumen de isopropanol de al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces el volumen de muestra. En una realización más preferida el volumen de isopropanol es de entre 2 y 6 veces el volumen de muestra. En una realización aún más preferida el volumen de isopropanol es de 4 veces el volumen de muestra.

En una realización preferida las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden un período de agitación después de añadir el isopropanol, de cualquier período de duración. En una realización preferida el período de agitación es de al menos 15 segundos, al menos 30 segundos, al menos 45 segundos, al menos 60 segundos. En otra realización preferida el período de agitación es de al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5 minutos. En una realización más preferida el período de agitación es de 1 minuto. De manera preferida, la agitación se realiza empleando un agitador tipo vórtex.

10

En una realización preferida las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden una etapa de incubación posterior a la etapa de agitación. En una realización preferida el período de incubación es de al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5 minutos, al menos 6 minutos, al menos 7 minutos, al menos 8 minutos, al menos 9 minutos, al menos 10 minutos, al menos 11 minutos, al menos 12 minutos, al menos 13 minutos, al menos 14 minutos, al menos 15 minutos, al menos 16 minutos, al menos 17 minutos, al menos 18 minutos, al menos 19 minutos, al menos 20 minutos. En una realización más preferida el período de incubación es de entre 5 y 15 minutos. En una realización aún más preferida el período de incubación es de 10 minutos.

20

En otra realización preferida la etapa de incubación se realiza a una temperatura de al menos 4°C, al menos 5°C, al menos 6°C, al menos 7°C, al menos 8°C, al menos 9°C, al menos 10°C, al menos 11°C, al menos 12°C, al menos 13°C, al menos 14°C, al menos 15°C, al menos 16°C, al menos 17°C, al menos 18°C, al menos 19°C, al menos 20°C, al menos 21°C, al menos 22°C, al menos 23°C, al menos 24°C, al menos 25°C, al menos 26°C, al menos 27°C, al menos 28°C, al menos 29°C, al menos 30°C. En una realización más preferida la etapa de incubación se realiza a una temperatura de entre 20°C y 30°C. En una realización aún más preferida la etapa de incubación se realiza a una temperatura de entre 22°C y 28°C, preferiblemente a 25°C.

30

En otra realización preferida las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden: diluir la muestra de lágrima en cualquier solvente conocido antes de ponerlo en contacto con el isopropanol, añadir un volumen adecuado de isopropanol, agitar la muestra después de añadir el isopropanol e incubar la muestra en isopropanol después de la agitación durante un tiempo y temperatura adecuados. En una realización más preferida, las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden: añadir un solvente acuoso a la muestra, añadir

35

un volumen de isopropanol es de entre 2 y 6 veces el volumen de muestra, agitar la muestra entre 15 segundos y 5 minutos, preferiblemente mediante vortex, e incubar la muestra en isopropanol después de la agitación entre 1 y 20 minutos y realizar la incubación a una temperatura de entre 4°C y 30°C. En una realización aún más preferida, las condiciones adecuadas para extraer lípidos comprenden: añadir un volumen de 90 µl de solvente acuoso a 10 µl de muestra, añadir un volumen de isopropanol de 4 veces el volumen de muestra, agitar la muestra durante 1 minuto, preferiblemente mediante vortex, e incubar la muestra en isopropanol después de la agitación durante 10 minutos y realizar la incubación a una temperatura de 25°C.

10

El término "isopropanol" se refiere al alcohol también denominado isopropil alcohol, 2-propanol, propan-2-ol, ((ch3)2choh), iso-propanol, isopropol alcohol, con número CAS 67-63-0. El experto en la materia entenderá que el isopropanol empleado es isopropanol sustancialmente puro, lo que implica que puede contener trazas de otros compuestos. En una forma preferida de realización, el isopropanol empleado tiene una pureza de al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 99,1%, al menos el 99,2%, al menos el 99,3%, al menos el 99,4%, al menos el 99,5%, al menos el 99,6%, al menos el 99,7%, al menos el 99,8% o al menos el 99,9%. En una forma preferida de realización, el isopropanol empleado en la extracción se encuentra sustancialmente libre de metanol y/o sustancialmente libre de cloroformo. En otra forma preferida de realización, el método de acuerdo a la presente invención no incluye etapas adicionales de extracción de la muestra con otros solventes ni antes ni después de la etapa de extracción con isopropanol.

15

20

En una segunda etapa, una vez que la muestra que se ha puesto en contacto con el isopropanol en condiciones adecuadas para la extracción de lípidos, se aplican condiciones adecuadas para la separación de las fases acuosa y alcohólica.

25

Por "condiciones adecuadas para separar las fases acuosa y alcohólica" se entiende cualquier condición que permita separar las fases acuosa y alcohólica en dos fases independientes que permitan la extracción de una de ellas sin apenas contaminación con la otra, o con ninguna contaminación. De forma no limitativa, la separación se produce después de un proceso de centrifugado, a cualquier velocidad que permita dicha separación seguido de la recuperación de la fase alcohólica mediante absorción con una pipeta del sobrenadante, o fase superior.

30

35

Una vez extraídos los lípidos de la muestra, esta se mantendrá en unas condiciones adecuadas para la separación de las fases acuosa y alcohólica. En una realización preferida la separación de ambas fases se realiza por medio de una centrifugación, a una velocidad de al menos 1.000g, al menos 2.000g, al menos 3.000g, al menos 4.000g, al menos 5.000g, al menos 6.000g, al menos 7.000g, al menos 8.000g, al menos 9.000g, al menos 10.000g, al menos 11.000g, al menos 12.000g, al menos 13.000g, al menos 14.000g, al menos 15.000g, al menos 16.000g, 17.000g, al menos 18.000g, al menos 19.000g, al menos 20.000g. En una realización más preferida la separación de ambas fases se realiza por medio de una centrifugación, a una velocidad de entre 10.000g y 20.000g. En una realización aún más preferida la separación de ambas fases se realiza a una velocidad de entre 12.000g y 16.000g, preferiblemente a 14.000g.

En otra realización preferida la separación de ambas fases se realiza por medio de una centrifugación durante un período de tiempo de al menos 1 minuto, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 25 minutos, al menos 30 minutos, 35 minutos, al menos 40 minutos. En una realización más preferida el período de centrifugación es de entre 10 y 30 minutos. En una realización aún más preferida el período de centrifugación es de 20 minutos.

En otra realización preferida la separación de ambas fases se realiza por medio de una centrifugación a una temperatura de al menos 1°C, al menos 2°C, al menos 3°C, al menos 4°C, al menos 5°C, al menos 6°C, al menos 7°C, al menos 8°C, al menos 9°C, al menos 10°C, al menos 11°C, al menos 12°C, al menos 13°C, al menos 14°C, al menos 15°C, al menos 16°C, al menos 17°C, al menos 18°C, al menos 19°C, al menos 20°C. En una realización más preferida la etapa de separación se realiza a una temperatura de entre 1°C y 10°C. En una realización aún más preferida la etapa de separación se realiza a 4°C.

En otra realización preferida, la separación de ambas fases puede realizarse a cualquiera de las velocidades de centrifugación comprendidas entre 1.000g y 20.000g, durante una duración de tiempo de entre 1 y 40 minutos, y a una temperatura de entre 1°C y 20°C, simultáneamente, y con cualquier combinación de los tres factores. Preferiblemente, la separación se realiza a 14.000g, durante un período de 20 minutos y a 4°C.

En una tercera etapa, una vez que se ha producido la separación de la fase acuosa y la fase lipídica, se recupera la fase alcohólica que es la que contienen los lípidos originalmente presentes en la muestra.

La fase alcohólica se recupera absorbiendo la fase superior de la muestra, preferiblemente por medio de una pipeta. La recuperación de la fase alcohólica puede ser, con respecto al total de muestra correspondiente, del 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%. Preferiblemente, la recuperación de la fase alcohólica es del 95-65%. Más preferiblemente, la recuperación de la fase alcohólica es del 90-70%, aún más preferiblemente del 80%.

En una realización preferida, una vez recuperada la fase alcohólica, se lleva a cabo un secado de la muestra con el fin de eliminar el isopropanol empleado. El secado se puede llevar a cabo por cualquier sistema de evaporación de muestras conocido en la técnica. En una realización preferida, la etapa de secado se realiza a una temperatura de al menos 25°C, al menos 30°C, al menos 35°C, al menos 40°C, al menos 45°C, al menos 50°C, al menos 55°C, al menos 60°C, al menos 65°C. En una realización más preferida, la etapa de secado se realiza a una temperatura de entre 40°C y 50°C, preferiblemente a 45°C.

En otra realización preferida, la etapa de secado se realiza durante un tiempo de al menos 30 minutos, al menos 1h, al menos 1,5 horas, al menos 2h, al menos 2,5 horas, al menos 3h, al menos 3,5 horas, al menos 4 horas. En una realización más preferida, la etapa de secado se realiza durante un tiempo de entre 1,5 horas y 3 horas.

En otra realización preferida, la etapa de secado puede realizarse a cualquiera de las temperaturas comprendidas entre 15°C y 60°C, y durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 3,5 horas. En una realización más preferida la temperatura de secado es de 45°C, durante un tiempo de entre 1,5 y 3 horas.

Una vez secada la muestra, los lípidos se pueden resuspender en cualquier solvente adecuado para su posterior análisis. En una forma preferida de realización, los lípidos se resuspenden en un solvente o mezcla de solventes adecuados para la separación de los lípidos mediante cromatografía, preferiblemente cromatografía líquida de ultra alta resolución. Preferiblemente los lípidos se resuspenden en una mezcla de metanol (número CAS 67-56-1) y tolueno (número CAS 108-88-3). En una realización aún más preferida, la relación de metanol y tolueno en la mezcla es de 9:1 (v/v).

Método para el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por una alteración en el contenido y proporción de lípidos en lágrima.

En un segundo aspecto la invención se refiere a un método para diagnosticar en un sujeto una enfermedad caracterizada por una alteración en el contenido y/o proporción de al menos un lípido de la lágrima que comprende:

- 5 (i) extraer lípidos de la lágrima de dicho sujeto a partir de una muestra de lágrima mediante el método de la invención,
- (ii) determinar el contenido y/o proporción de dicho lípido en el extracto obtenido en la etapa (i) y
- 10 (iii) comparar el contenido y/o proporción de dicho lípido con un valor de referencia, en donde una alteración en el contenido y/o proporción de dicho lípido con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad.

El término "diagnosticar" tal como se usa en la presente invención significa el proceso de determinar qué enfermedad o estado explica los síntomas y signos de una persona.

15 Por "alteración en el contenido y/o proporción de al menos un lípido" tal y como se usa en la presente invención, se entiende la diferencia en la concentración de un determinado lípido en una muestra respecto a un valor de referencia, de manera que cualquier variación con respecto a dicho valor se considere una alteración en el contenido de dicho lípido, o bien la presencia o ausencia de un determinado lípido en una muestra con respecto a una muestra

20 de referencia. En una realización preferida la enfermedad está caracterizada por una alteración en el contenido y/o proporción de al menos 1 lípido, al menos 2 lípidos, al menos 3 lípidos, al menos 4 lípidos, al menos 5 lípidos, al menos 6 lípidos, al menos 7 lípidos, al menos 8 lípidos, al menos 9 lípidos, al menos 10 lípidos, al menos 15 lípidos, al menos 20 lípidos, al menos 25 lípidos o más lípidos de la lágrima.

25 Por "muestra de lágrima", tal y como se usa en la presente invención, se entiende material de lágrima aislado de un sujeto y que puede comprender material celular y/o no celular del sujeto. La muestra de lágrima se puede obtener por cualquier procedimiento conocido para el experto en la materia, tal y como:

- 30 - Método basado en tiras de Schirmer.
- Método basado en bastones de Poliéster.
- Método basado en hemostetas y
- Método basado en el empleo de capilares de vidrio

35 En una forma preferida de realización, la muestra de lágrima se congela a -80°C hasta su posterior análisis.

Por “muestra de referencia” se entiende cualquier muestra de lágrima con la que se quiera comparar el contenido y/o proporción de al menos un lípido respecto a otra muestra concreta. En una realización preferida la muestra de referencia corresponde a una muestra
5 una muestra de lágrima obtenida de un sujeto sano. En otra realización preferida, la muestra de referencia corresponde a una muestra de lágrima de un sujeto que no padece ninguna enfermedad ocular. En otra realización preferida, la muestra de referencia corresponde a una muestra de lágrima de un sujeto que no recibe ningún tratamiento o que recibe un tratamiento que no afecta a la composición de la lágrima. En una forma preferida de
10 realización, la muestra de referencia

El término “sujeto” o “paciente”, tal como se usa aquí, incluye a cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, aunque no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos,
15 cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

Antes de analizar la muestra, puede ser necesario realizar una o más operaciones de preparación de dicha muestra para separar la molécula que se va a determinar de otras
20 moléculas que se encuentran en la muestra. De manera no limitativa, estas operaciones de preparación de las muestras pueden incluir manipulaciones tales como: concentración, suspensión, dilución y similares. Estos procedimientos son bien conocidos por un experto en la materia.

En una realización particular, la muestra biológica es una muestra que contiene lípidos procedentes de un pool de muestras de lágrima. En otra realización particular la muestra biológica es una muestra de una única lágrima. Un experto en la materia conoce técnicas para extraer dichas muestras, tales como: tiras de Schirmer, bastones de poliéster, hemostetas o capilares de vidrio. En una realización preferida, la muestra se extrae
30 mediante capilares de vidrio. En otra realización preferida, una vez recogida la muestra de lágrima se congela a -80°C hasta su utilización.

Una vez extraídos los lípidos de la muestra de lágrima el experto en la materia puede determinar el contenido de los lípidos extraídos, y analizar y cuantificar los lípidos presentes
35 en la muestra mediante técnicas habituales, como por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), neutralización de la acidez libre o cromatografía de gases

utilizando patrones puros de cada una de las clases de lípidos y la cuantificación mediante rectas de calibrado de cada uno de los lípidos detectados. La cantidad de lípidos neutros se pueden determinar mediante HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz según el método previamente descrito por Torres et al. [Journal of Chromatography A, 2005, 1078(1), 28-34]. La cantidad de lípidos polares se pueden determinar mediante HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz según la metodología descrita por Casado et al. [Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 99, 14-19]. En una realización preferida los lípidos de la muestra se analizan y cuantifican mediante cromatografía líquida.

10

Una vez determinado el contenido en un determinado lípido en una muestra de lágrima, se compara con un valor de referencia, de manera que una alteración en el contenido de dicho lípido con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad.

15

Por "valor de referencia" para el contenido de un determinado lípido de acuerdo con la invención se entiende: un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tenga límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor de la mediana, un valor medio, o un valor en comparación con un control particular o un valor de partida. Un valor de referencia se puede basar en un valor de muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está sometiendo a prueba. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, por ejemplo a partir de una población de sujetos de la misma edad, o se puede basar en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que se va a someter a prueba. Se tienen en cuenta varias consideraciones cuando se determina el valor de referencia de un lípido. Entre dichas consideraciones se podrían encontrar la edad, peso, sexo, afección física general del paciente y similares, o suministro de un determinado tratamiento. Por ejemplo, cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 sujetos, preferentemente clasificadas de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo de acuerdo con varias categorías de edad, se pueden tomar como el grupo de referencia. En una realización particular, el valor de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia.

20

25

30

En una realización particular, el valor de referencia de un lípido corresponde a la concentración de dicho lípido en un sujeto sano. En otra realización particular, el valor de referencia de un lípido corresponde a la concentración de dicho lípido en un sujeto que no

35

padece ninguna enfermedad ocular. En otra realización particular, el valor de referencia de un lípido corresponde a la concentración de dicho lípido en una muestra de lágrima de un sujeto que no recibe ningún tratamiento o que recibe un tratamiento que no afecta a la composición de la lágrima. En otra realización particular el valor de referencia de un lípido puede ser la ausencia de dicho lípido, o la presencia en cantidades indetectables. En otra realización particular el valor de referencia de un lípido puede ser un incremento en la concentración, o que dicho lípido esté presente en cantidades detectables en la muestra de lágrima.

5

10

Una vez que el valor de referencia es establecido para el lípido de interés correspondiente, la concentración del lípido de interés determinado en una muestra biológica del sujeto se compara con el valor de referencia, y por tanto se puede asignar como “incremento” o “disminución” en la concentración de dicho lípido, y poder determinar si presenta alguna alteración en la composición lipídica de la lágrima. En una realización particular el lípido de interés ausente en la muestra del sujeto de referencia puede ser detectado en la muestra biológica del sujeto que sufre una enfermedad ocular, y/o que recibe un tratamiento que puede afectar a la composición lipídica de la lágrima. En otra realización particular el lípido de interés presente en la muestra del sujeto de referencia no puede ser detectado en la muestra biológica del sujeto que sufre una enfermedad ocular, y/o que recibe un tratamiento que puede afectar a la composición lipídica de la lágrima.

15

20

En una realización preferida se produce un incremento en el contenido de un determinado lípido respecto a un valor de referencia. En una realización más preferida el incremento es de al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % en comparación con el valor de referencia correspondiente.

25

30

En otra realización preferida se produce una disminución en el contenido de un determinado lípido respecto a un valor de referencia. En otra realización más preferida la disminución es de al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un

35

90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % en comparación con el valor de referencia correspondiente.

5 En otra realización preferida se detecta al menos 1 lípido más, al menos 2 lípidos más, al menos 3 lípidos más, al menos 4 lípidos más, al menos 5 lípidos más, al menos 6 lípidos más, al menos 7 lípidos más, al menos 8 lípidos más, al menos 9 lípidos más, al menos 10 lípidos más, o más en la muestra respecto a una muestra de referencia, en la cual no se detecta ese mismo lípido.

10 En otra realización preferida se detecta al menos 1 lípido menos, al menos 2 lípidos menos, al menos 3 lípidos menos, al menos 4 lípidos menos, al menos 5 lípidos menos, al menos 6 lípidos menos, al menos 7 lípidos menos, al menos 8 lípidos menos, al menos 9 lípidos menos, al menos 10 lípidos menos, o menos en la muestra respecto a una muestra de referencia, en la cual sí se detecta ese mismo lípido.

15 Una alteración en el contenido de un determinado lípido con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece una enfermedad, preferiblemente ocular.

20 Los términos y limitaciones descritos anteriormente en relación con el método para extraer lípidos de la lágrima de la invención son igualmente aplicables a este aspecto.

Método para detectar diferencias en el perfil lipídico entre dos muestras

25 En un tercer aspecto la invención se refiere a un método para detectar diferencias en el perfil lipídico entre dos muestras de lágrima que comprende:

- (i) extraer los lípidos de ambas muestras empleando el método según la invención,
- (ii) caracterizar el perfil lipídico de cada muestra, y
- (iii) comparar los perfiles lipídicos de ambas muestras.

30 Por “perfil lipídico”, tal y como se usa en la presente invención, se entiende la composición y abundancia de los lípidos contenidos en una determinada muestra, preferiblemente de lágrima. Técnicas para determinar los lípidos presentes en la muestra se han descrito anteriormente. Por “diferencias en el perfil lipídico” se entiende el incremento y/o disminución en la cantidad de un determinado lípido o lípidos, y/o la presencia o
35 ausencia de un determinado lípido o lípidos en una primera muestra (A), con respecto a una

segunda muestra (B). El perfil lipídico se determina después de extraer los lípidos de ambas muestras de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Una vez extraídos los lípidos de una primera muestra (A) se detectan las diferencias en el perfil lipídico con respecto a los lípidos extraídos de una segunda muestra (B). El experto en la técnica puede determinar fácilmente si existen diferencias en el perfil lipídico de dos muestras usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores de p, prueba de la t de Student, prueba Mann-Whitney, etc. los detalles se encuentran en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983. Los intervalos preferentes de confianza son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores p son preferentemente 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

Las muestras A y B pueden proceder, indistintamente, del mismo paciente (antes de iniciar un tratamiento, durante la aplicación de un tratamiento o después de finalizar un tratamiento) o de pacientes diferentes. En caso de proceder del mismo paciente pueden proceder del mismo ojo o de ojos diferentes. En otra realización las muestras A y B proceden del mismo paciente. En otra realización la muestra A se obtiene antes de que el paciente inicie un tratamiento, y la muestra B después de iniciarlo y/o después de terminarlo. En otra realización las muestras A y B proceden de pacientes diferentes. En otra realización la muestra A procede un único paciente y la muestra B es un pool procedente de una mezcla de muestras de lágrima de dos o más sujetos. En otra realización la muestra A procede de un paciente que sufre una enfermedad ocular antes de recibir un tratamiento y la muestra B procede del mismo paciente después de iniciar dicho tratamiento, y/o después de finalizarlo. En otra realización las muestras A y B proceden de distintos ojos de un mismo paciente, en cualquier circunstancia.

En una realización preferida la primera (A) y la segunda (B) muestra son muestras obtenidas de un mismo sujeto que está siendo tratado o que va a ser tratado con una terapia y en donde las muestras se toman en distintos momentos durante la administración de dicha terapia.

El término “tratamiento”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, mejora o reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. Así, “tratamiento”, “tratar”, y sus términos

equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, "tratamiento" incluye (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (2) interrumpir o finalizar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (3), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune. De forma secundaria a la aplicación de un tratamiento pueden aparecer otros síntomas de afección patológica, como puede ser una alteración en la composición lipídica de la lágrima. En una realización preferida, el tratamiento recibido por el paciente es conocido por causar problemas oculares, preferiblemente debidos a una alteración en la composición lipídica.

En una realización preferida el sujeto sufre una enfermedad ocular.

En una realización preferida la primera muestra (A) procede de un sujeto que sufre una enfermedad ocular y la segunda muestra (B) procede de un sujeto de referencia.

Los términos y limitaciones descritos anteriormente en relación con el método para extraer lípidos de la lágrima y el método para diagnosticar una enfermedad de la invención son igualmente aplicables a este aspecto.

Kit de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante "kit de la invención", para la extracción de los lípidos de la lágrima que comprende:

- (i) al menos un éster de cera ,
- (ii) al menos un esteroles,
- (iii) al menos un esfingolípido ,
- (iv) al menos un ácido graso omega O-acilado ,
- (v) al menos un glicerolípido y
- (vi) al menos un glicerofosfolípido.

El término “kit”, tal como aquí se usa, se entiende como un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o por separado de los diferentes componentes que están en el kit. Dichas instrucciones pueden ser en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones susceptibles de ser leídas o entendidas, tales como, por ejemplo, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas) o medios ópticos (ej. CD-ROM, DVD) o materiales de audio. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

De acuerdo con la invención, el kit comprende: al menos un éster de cera, al menos un esteroide, al menos un esfingolípido, al menos un ácido graso omega O-acilado, al menos un glicerolípido y al menos un glicerofosfolípido.

En una realización preferida el éster de cera es 18:1(Δ 9)/26:0 (fórmula química: $C_{44}H_{77}D_9O_2$).

En otra realización preferida el esteroide es colesterol (fórmula química: $C_{27}H_{39}D_7O$) o un éster de colesterol. En otra realización preferida el éster de colesterol es 18:1(Δ 7) Chol Ester (fórmula química: $C_{45}H_{71}D_7O_2$).

En otra realización preferida el esfingolípido se selecciona del grupo formado por: D18:1-18:1(Δ 9) esfingomielina (fórmula química: $C_{41}H_{72}D_9N_2O_6P$), esfingosina C17 (fórmula química: $C_{17}H_{35}NO_2$), esfinganina C17 (fórmula química: $C_{17}H_{37}NO_2$), esfingosina 1-fosfato (C17) (fórmula química: $C_{17}H_{36}NO_5P$), esfinganina-1-fosfato C17 (fórmula química: $C_{17}H_{38}NO_5P$), ceramida C12 (fórmula química: $C_{30}H_{59}NO_3$), ceramida C25 (fórmula química: $C_{43}H_{85}NO_3$), ceramida 1-fosfato (fórmula química: $C_{30}H_{60}NO_6P$), esfingomielina C12 (fórmula química: $C_{35}H_{71}N_2O_6P$), C12 ceramida, Glicosil(β) C12 ceramida (fórmula química: $C_{36}H_{69}NO_8$), y Lactosil (β) C12 ceramida (fórmula química: $C_{42}H_{79}NO_{13}$).

En otra realización preferida el ácido graso omega O-acilado es OAHFA (18:1/16:0) (fórmula química: $C_{34}H_{64}O_4$).

En otra realización preferida el glicerolípido se selecciona del grupo formado por 18:1(Δ 7) monoacilglicerol (fórmula química: $C_{21}H_{33}D_7O_4$), 15:0-18:1(Δ 7) diacilglicerol (fórmula química: $C_{36}H_{61}D_7O_5$), 15:0-18:1(Δ 7)-15:0 triacilglicerol (fórmula química: $C_{51}H_{89}D_7O_6$).

- 5 En otra realización preferida el glicerofosfolípido se selecciona del grupo formado por 15:0-18:1(Δ 7) fosfocolina (fórmula química: $C_{41}H_{73}D_7NO_8P$), 18:1(Δ 7) lisofosfatidilcolina (fórmula química: $C_{26}H_{45}D_7NO_7P$), 18:1(Δ 7) lisofosfatidiletanolamina (fórmula química: $C_{23}H_{39}D_7NO_7P$), 15:0-18:1(Δ 7) PE (fórmula química: $C_{38}H_{67}D_7NO_8P$), 15:0-18:1(Δ 7) PS (fórmula química: $C_{39}H_{66}D_7NNO_{10}P$), 15:0-18:1(Δ 7) PG (fórmula química: $C_{39}H_{67}D_7NaO_{10}P$),
 10 15:0-18:1(Δ 7) PI (fórmula química: $C_{42}H_{75}D_7NO_{13}P$) y 15:0-18:1(Δ 7) PA (fórmula química: $C_{36}H_{61}D_7NaO_8P$).

En otra realización preferida los lípidos están marcados, preferiblemente por medio de un radioisótopo. Tal como se usa en la presente invención, marcar un lípido por medio de un
 15 radioisótopo implica incluir isótopos poco usuales en la composición química del lípido o lípidos de interés, de manera que puedan ser detectados posteriormente, preferiblemente por medio de espectrometría de masas o infrarroja. En una realización más preferida, el marcaje es una deuteración.

20 En una realización preferida el kit comprende adicionalmente isopropanol. En otra realización preferida el kit comprende adicionalmente metanol y/o etanol. En otra realización más preferida el kit comprende adicionalmente isopropanol y metanol y/o etanol (número CAS 64-17-5).

25 Los términos y limitaciones descritos en relación a los aspectos inventivos anteriores son igualmente aplicables a este aspecto.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos, que deben ser considerados como meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos del ámbito de la
 30 presente invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

35

Diseño del estudio

- En la primera fase se recogieron muestras de lágrima de 10 sujetos sanos (10 µl de cada ojo) para la comparación entre los métodos de extracción. Para cada método comparado (IPA y BD) se realizó primero un *pool* o mezcla con toda la lágrima recogida y, posteriormente, se realizaron 5 alícuotas con 10 microlitros de lágrima en cada alícuota. Los estándares se agregaron después de la extracción. El propósito de esta fase fue comparar los dos protocolos de extracción de acuerdo con un conjunto de criterios que incluyen la eficiencia de recuperación, reproducibilidad, la cobertura de lípidos y la simplicidad de la manipulación.
- 5
- 10 La segunda fase se refiere a la fase de identificación, en la que los lípidos de la lágrima se analizaron por UHPLC-QTOF para identificar y cuantificar la abundancia de lípidos en la lágrima normal.

Recolección de fluido lagrimal

- Este trabajo se ha realizado en estricta conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki sobre investigación biomédica que involucra sujetos humanos. Se recogieron muestras de lágrimas de 10 voluntarios sanos ($27 \pm 2,5$ años, 6 mujeres y 4 hombres) del saco conjuntival inferior usando capilares de vidrio, que permiten recoger un volumen de 10 µl de lágrima (IntraMARK Blaubrand®, Wertheim, Alemania). La recolección se realizó en sesiones múltiples con la menor irritación posible de la conjuntiva para minimizar la contaminación celular y la dilución de la muestra causada por la rotura refleja. Las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta que se analizaron.
- 15
- 20

Protocolos de preparación de muestra

Se usaron dos procedimientos para la extracción de lípidos del fluido lagrimal:

1. Extracción de BD

- 25 Los lípidos se extrajeron exhaustivamente del líquido lagrimal agrupado siguiendo el método de Bligh y Dyer (Bligh EG, Dyer WJ. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37:911-7) para volúmenes de muestra pequeños. Se usaron tubos de vidrio y pipetas. Brevemente, se diluyeron 10 µL de fluido lacrimal con 90 µL de agua ultrapura para obtener un volumen fácil de manipular. Luego, 10 µL de cada mezcla SI (Splash LipidoMix, Ceramida / Esphingoid
- 30 Internal Standard Mixture y OAHFA y WE) se agregaron al grupo previamente enriquecido. Las muestras se mezclaron a fondo con 15 volúmenes de cloroformo / metanol (1:2, v:v) y posteriormente con 5 volúmenes de cloroformo y 24 volúmenes de agua ultrapura. Después

de una centrifugación de 1100 g (4 ° C, 15 min) se recogió la fase clorofórmica y la fase metanólica y el sedimento de proteína se volvieron a extraer con 36 volúmenes de cloroformo / metanol / agua (1:1:1, v: v: v). Los tubos se centrifugaron como se indicado anteriormente y las dos fases clorofórmicas se combinaron. Finalmente, el cloroformo se evaporó (Thermo Scientific Savant A-290) y los extractos secos se almacenaron a -80 ° C en atmósfera de nitrógeno hasta su uso. Procedimiento idéntico para la extracción de lípidos se realizó en el grupo post-adicionado, excepto que los estándares internos se agregaron a los tubos una vez que los lípidos se habían extraído de la muestra. Los valores *post-spiked* representan el lípido extraíble y los valores pre-agregados del lípido extraído.

10 2. Precipitación de IPA

Este método es una adaptación del procedimiento descrito por Sarafian et al. (Sarafian MH, et al. *Anal Chem* 2014; 86:5766-74) para analizar los lípidos en plasma. De nuevo, se prepararon 10 muestras de 10 µl de fluido lacrimal agrupado en tubos Eppendorf. Las muestras se diluyeron con 90 µl de agua ultrapura y se añadieron patrones como se ha indicado anteriormente. Se añadieron cuatro volúmenes de isopropanol preenfriados a -20°C (la baja temperatura mejora la precipitación de proteína). Las muestras se mezclaron a fondo, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 14,000 g (4 ° C, 20 min). El 80% superior del volumen sobrenadante se recogió para evitar la contaminación con los componentes del sedimento. El isopropanol se evaporó y los extractos secos se almacenaron a -80°C bajo atmósfera de nitrógeno hasta su uso.

Todos los extractos de lípidos secos se reconstituyeron en 100 µL de metanol:tolueno (90:10, v / v) antes de su inyección en el sistema UHPLC.

Determinación del porcentaje de recuperación

Los métodos de BD e IPA se evaluaron añadiendo 10 µl de cada mezcla de IS a la muestra antes (*prespiked*) y después (*postspiked*) del método de preparación de la muestra. La reproducibilidad del método se confirmó con 5 muestras *prespiked* con los patrones añadidos antes de la extracción y 5 muestras *postspiked* con los patrones añadidos tras la extracción (fig, 1). Un análisis previo de estándares internos por UHPLC-MSE en ESI + y ESI permitió la caracterización de m / z y el tiempo de retención de iones, aductos y fragmentos moleculares. Para cada estándar, se seleccionó el pico de iones más intenso para los cálculos de recuperación.

Teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni en el método de BD entre las muestras pre-spiked (que definen la cantidad de estándar exógeno detectado) ni en las muestras post-spiked (usadas para definir la cantidad de estándar exógeno detectable) ($p = 0.749$) y tampoco mostraron 5 diferencias estadísticamente significativas utilizando el método IPA ($p = 0,631$). La conclusión en este apartado es que se puede añadir los estándares (o patrones) antes de la extracción de los lípidos de la muestra de lágrima.

La recuperación de las extracciones se observa en la dispersión de los datos en la figura 1 donde se observa el PCA.

10

Análisis de PCA

El análisis de componentes principales (PCA según sus iniciales en inglés) es una técnica utilizada para describir un set de datos en términos de nuevas variables ("componentes") no correlacionadas. Los componentes se ordenan por la cantidad de varianza original que 15 describen, por lo que la técnica es útil para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Permite la proyección según la cual los datos queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados. Esta convierte un conjunto de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un conjunto de valores de variables sin correlación lineal llamadas componentes principales.

20 El PCA construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado el Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Para construir esta transformación lineal debe construirse primero la matriz de covarianza o matriz de 25 coeficientes de correlación. Debido a la simetría de esta matriz existe una base completa de vectores propios de la misma.

Linealidad

Debido a los diferentes rangos de concentración de los lípidos en los análisis, es esencial 30 que los métodos analíticos muestren un amplio rango dinámico y ofrezcan la sensibilidad suficiente para permitir la cuantificación de moléculas presentes en concentraciones bajas y altas. Para determinar estos parámetros, se agregaron cantidades crecientes de patrón interno de lípidos antes de la preparación de la muestra. Se obtuvieron curvas de calibración

de alta linealidad ($R^2 = 0.97-0.99$). La sensibilidad fue dada por la pendiente de la curva de calibración. La pendiente más alta se obtuvo para la ceramida (C12), mientras que 18: 1 (d7) CE mostró la sensibilidad más baja. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon como los correspondientes a las relaciones de señal a ruido de 3: 1 y 10: 1, respectivamente. Los valores más bajos de LOD y LOQ fueron para ceramida (C12) (LOD 0.02 $\mu\text{g} / \text{mL}$; LOQ 0.03 $\mu\text{g} / \text{mL}$) y los más altos para 18: 1 (d7) CE (LOD 0.47 $\mu\text{g} / \text{mL}$; LOQ 2.82 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (tabla 1). Los resultados obtenidos para los límites de cuantificación mostraron que el método de precipitación con IPA es lo suficientemente sensible para la determinación de compuestos lipídicos en muestras de lágrimas.

10

Comp. No	Lípido	Rango lineal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Pendiente	OO	R^2	RSD% (n=3)	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
3	18:1(d7) Liso PC	0.05-2.55	795	-47	0.9992	0.04	0.062	0.068
		2.55-25.50	3161	-8299	0.9954	0.4		
5	Lactosil(β) C12 Ceramida	0.2-21	54	-28	0.9972	0.2	0.19	0.24
6	Glucosil(β) C12 Ceramida	0.03-1.61	358	-8	0.9995	0.03	0.033	0.046
		1.61-16.09	567	-450	0.9994	0.08		
7	Ceramida (C12)	0.03-12.04	1323	-51	0.9972	0.3	0.024	0.030
8	d18:1-18:1(d9) SM	0.074-10.34	583	-522	0.9759	1	0.065	0.074
9	15:0-18:1(d7) PC	0.32-16.07	348	-193	0.9982	0.02	0.17	0.26
		16.07-160.7	1972	-36084	0.9930	0.5		
10	15:0-18:1(d7) DG	0.094-9.4	298	-83	0.9977	0.2	0.064	0.078
11	Ceramida (C25)	0.05-1.67	442	-5	0.9998	0.01	0.038	0.048
12	15:0-18:1(d7) -15:0 TG	0.1-5.7	795	-150	0.9983	0.03	0.15	0.15
		5.7-57.3	3241	-19370	0.9937	0.6		
13	18:1(d7) Chol Ester	0.7-356.1	1.2	219.5	0.9947	0.02	0.47	2.82
14	18:1(d9)-26:0 WE	1.2-120	2	2	0.9998	0.02	0.29	1.26
15	18:1(d7) Liso PE	0.53-5.30	60	-10	0.9998	0.03	0.23	0.28
16	15:0-18:1(d7) PI (NH4 Salt)	0.91-9.10	67	-26	0.9995	0.04	0.30	0.38
17	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	1.4-4.2	3.0	-0.1	0.9952	0.09	0.42	1.40
18	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	0.29-29.1	47	-46	0.9956	0.3	0.30	0.38
19	15:0-18:1(d7) PE	0.57-5.70	46	-7	0.9980	0.2	0.14	0.22
20	18:1-16:0 OAHFA	0.2-40	37	-34	0.9955	0.4	0.10	0.27

Tabla 1. Linealidad y valores de sensibilidad de estándares internos detectados. Abreviaturas: LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación

Análisis UHPLC-MSE

15 La cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) se llevó a cabo utilizando un sistema ACQUITY UPLCTM de Waters (Milford, MA, EE. UU.), equipado con una bomba binaria de suministro de disolvente, un inyector automático y un horno de columna. Se

usaron una columna de fase inversa (Acquity UPLC C18 CSH, 100 × 2.1 mm, 1.7 µm) y una precolumna (Acquity UPLC C18 CSH de 1.7 µm VanGuard™) a 65°C para la separación de lípidos individuales. Las fases móviles consistieron en acetonitrilo y agua (40:60, v / v) con formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0,1% (fase A), y acetonitrilo e isopropanol (10:90, v / v) con formiato de amonio 10 mM y 0.1% de ácido fórmico (fase B). La velocidad de flujo fue de 500 µL / min y el volumen de inyección fue de 7.5 µL. Todas las muestras se mantuvieron a 4°C antes del análisis. La tabla 2 muestra la composición lipídica de la mezcla de estándares internos. La tabla 3 muestra el gradiente utilizado para el perfil de lípidos por UHPLC-MSE.

Mezcla de estándares internos	Nombre del compuesto	Masa Exacta	Fórmula química	Conc. (µg/mL)
Splash LipidoMix Avanti Number: 330707	15:0-18:1(d7) PC	752.6061	C ₄₁ H ₇₃ D ₇ NO ₈ P	160.7
	15:0-18:1(d7) PE	710.5591	C ₃₈ H ₆₇ D ₇ NO ₈ P	5.7
	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	776.5309	C ₃₉ H ₆₆ D ₇ NNaO ₁₀ P	4.2
	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	763.5357	C ₃₉ H ₆₇ D ₇ NaO ₁₀ P	29.1
	15:0-18:1(d7) PI (NH ₄ Salt)	846.5963	C ₄₂ H ₇₅ D ₇ NO ₁₃ P	9.1
	15:0-18:1(d7) PA (Na Salt)	689.4994	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ NaO ₈ P	7.4
	18:1(d7) Liso PC	528.3921	C ₂₆ H ₄₅ D ₇ NO ₇ P	25.5
	18:1(d7) Liso PE	486.3451	C ₂₃ H ₃₉ D ₇ NO ₇ P	5.3
	18:1(d7) Chol Ester	657.6441	C ₄₅ H ₇₁ D ₇ O ₂	356.1
	18:1(d7) MG	363.3366	C ₂₁ H ₃₃ D ₇ O ₄	2.0
	15:0-18:1(d7) DG	587.5506	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ O ₅	9.4
	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	811.7646	C ₅₁ H ₈₉ D ₇ O ₆	57.3
	d18:1-18:1(d9) SM	737.6397	C ₄₁ H ₇₂ D ₉ N ₂ O ₆ P	30.9
	Colesterol (d7)	393.3988	C ₂₇ H ₃₉ D ₇ O	98.4
Ceramida/Esfingoide Mezcla I Estándar Interno Avanti Number: LM-6002	Esfingosina (C17)	285.2668	C ₁₇ H ₃₅ NO ₂	7.2
	Esfinganina (C17)	287.2824	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	7.3
	Esfingosina-1-PO ₄ (C17)	365.2331	C ₁₇ H ₃₆ NO ₅ P	9.1
	Esfinganina-1-PO ₄ (C17)	367.2488	C ₁₇ H ₃₈ NO ₅ P	8.9
	Ceramida (C12)	481.4495	C ₃₀ H ₅₉ NO ₃	12.3
	Ceramida (C25)	663.6529	C ₄₃ H ₈₅ NO ₃	16.7
	Ceramida-1-PO ₄ (C12)	561.4158	C ₃₀ H ₆₀ NO ₆ P	14.3
	Sphingomyelin (C12)	646.5050	C ₃₅ H ₇₁ N ₂ O ₆ P	16.0
	Glucosil(β) C12 Ceramida	643.5023	C ₃₆ H ₆₉ NO ₈	16.5
Lactosil(β) C12 Ceramida	805.5550	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₃	21.0	
Estándar Interno Sintetizado	18:1-16:0 OAHFA	536.4805	C ₃₄ H ₆₄ O ₄	50.0
	18.1(d9)-26:0 WE	655.7193	C ₄₄ H ₇₇ D ₉ O ₂	80.0

Tabla 2: Composición lipídica de la mezcla de estándares internos.

Comp. No	Lípido	LC Rt (min)	ESI-Q-ToF		
			Modo ESI	Pico de iones más intenso	Exp. Acc. Mass
1	Esfingosina (C17)	0.78	ESI+	[M+H-H ₂ O] ⁺	268.2640
2	Esfinganina (C17)	0.84	ESI+	[M+H-H ₂ O] ⁺	270.2797
3	18:1(d7) Liso PC	0.99	ESI+	[M+H] ⁺	529.3999
4	Esfingomielina (C12)	2.66	ESI+	[M+H] ⁺	647.5122
5	Lactosil(β) C12 Ceramida	2.74	ESI+	[M+Na] ⁺	828.5449
6	Glucosil(β) C12 Ceramida	2.92	ESI+	[M+Na] ⁺	666.4921
7	Ceramida (C12)	3.58	ESI+	[M+Na] ⁺	504.4393
8	d18:1-18:1(d9) SM	4.38	ESI+	[M+H] ⁺	738.6475
9	15:0-18:1(d7) PC	5.08	ESI+	[M+H] ⁺	753.6134
10	15:0-18:1(d7) DG	8.75	ESI+	[M+Na] ⁺	610.5404
11	Ceramida (C25)	13.75	ESI+	[M+Na] ⁺	686.6427
12	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	15.09	ESI+	[M+NH ₄] ⁺	829.7990
13	18:1(d7) Chol Ester	15.48	ESI+	[M+Na] ⁺	680.6339
14	18:1(d9)-26:0(d9)WE	15.96	ESI+	[M+H] ⁺	656.7271
15	18:1(d7) Liso PE	1.03	ESI-	[M-H] ⁻	485.3379
16	15:0-18:1(d7) PI (NH ₄ Salt)	3.88	ESI-	[M-H] ⁻	828.5619
17	15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	4.10	ESI-	[M-H] ⁻	753.5417
18	15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	4.17	ESI-	[M-H] ⁻	740.5464
19	15:0-18:1(d7) PE	5.43	ESI-	[M-H] ⁻	709.5519
20	18:1-16:0 OAHFA	6.98	ESI-	[M-H] ⁻	535.4732
---	15:0-18:1(d7) PA (Na Salt)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	18:1(d7) MG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Esfingosina-1-PO ₄ (C17)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Esfinganina-1-PO ₄ (C17)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Ceramida-1-PO ₄ (C12)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
---	Colesterol (d7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 3. Lista de lípidos estándar utilizados en el estudio de recuperación y pico de iones más intenso para cada estándar interno. Abreviaturas: LC Rt, tiempo de retención en cromatografía líquida.

5 Todos los datos UHPLC-MSE se adquirieron en un HDN SYNAPT G2, con una configuración cuadrupolo de tiempo de vuelo (Q-ToF) (Waters, Milford, MA, EE. UU.) Equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) que puede operarse en modos tanto positivo (+) como negativo (-). El voltaje capilar se estableció en 1 kV (ESI + y ESI-). El nitrógeno se usó como gas de desolvatación y cono, a caudales de 1000 L/h y 10 L/h, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120°C y la temperatura de desolvatación fue de 500 °C.

10

Todos los espectros adquiridos se corrigieron automáticamente durante la adquisición utilizando la masa de bloqueo. Antes del análisis, el espectrómetro de masas se calibró con una solución de formiato de sodio 0,5 mM.

Diseño del análisis

- 5 Se incluyó un blanco, que consiste en 90:10 (v / v) solución de metanol: tolueno, que fue el disolvente de resuspensión elegido, al principio y al final de la prueba para probar cualquier posible contaminación o efecto de arrastre. Una muestra de control de calidad (QC), preparada combinando alícuotas iguales de las repeticiones de cada método, se inyectó regularmente cada cinco inyecciones a lo largo de la ejecución para controlar la sensibilidad
- 10 y la estabilidad de la plataforma UHPLC-ESI-Q-TOF_MS. Esta muestra de control de calidad también se usó para acondicionar el sistema al comienzo del análisis. Se observó en una prueba previa que al menos 15 inyecciones de una muestra que contenía la matriz estudiada eran necesarias para estabilizar el sistema. El orden de inyección de las muestras (repeticiones de cada protocolo) se aleatorizó para minimizar el efecto de la deriva
- 15 instrumental derivada de la degradación de la columna o la contaminación de la fuente MS en la evaluación de la reproducibilidad dentro de cada protocolo.

Identificación de lípidos

- Los datos generados por UHPLC-MSE se extrajeron usando MSE Data Viewer (Waters MS Technologies, Manchester, U.K.). Este software se utilizó para alinear los espectros del precursor y del producto de acuerdo con los tiempos de retención, generando un archivo de
- 20 texto exportable, que se usó para la identificación de lípidos usando el software SimLipid (Premier Biosoft, EE. UU.). La identidad de los compuestos se dilucidó usando el espectro de MSE de baja colisión en modos positivo y negativo para determinar el peso molecular, y el espectro de MSE de alta colisión de energía para producir la fragmentación que se usó
- 25 para elucidar otros detalles estructurales. La tolerancia para la identificación de MS y MSMS se estableció en 5 mDa.

Procesamiento de datos MS

- Los datos se adquirieron con el software MassLynx V4.1 como archivos sin procesar, se convirtieron en archivos NetCDF utilizando el convertidor DataBridge 3.5 (Waters, Milford, EE. UU.) y se agruparon según los diferentes protocolos de preparación de muestras. Los
- 30 blancos y las muestras de QC se trataron como grupos separados. Los archivos NetCDF se procesaron utilizando XCMS 1.42.0 (Metlin, La Jolla, CA, EE. UU.) Para codificar los datos tridimensionales LC-MS (RT, m / z, intensidad) en una tabla de características detectadas

alineadas en el tiempo, con RT, m / z e intensidad para cada muestra. XCMS se escribió en el lenguaje de programación estadística R que estaba disponible gratuitamente bajo una licencia de fuente abierta. La versión de R usada fue 3.2.2. El algoritmo de detección MachedFilter se utilizó para la identificación de los picos. Para evitar los artefactos LC-MS (los picos que no presentan iones moleculares de metabolitos tales como isótopos, aductos y fragmentos comunes, estados de carga múltiples, etc.), se usó CAMARA R-paquete para filtrar los picos detectados. Las tablas de marcadores de picos (que comprenden pares m / z-RT y sus intensidades correspondientes para cada muestra) generadas se exportaron a SPSS para el análisis univariado y a SIMCA 14.1 (Umetrics, Umea, Suecia) para el análisis multivariado.

Análisis estadístico

Análisis estadístico univariado: se usaron estadísticas univariadas para comparar la distribución de CV de la intensidad de características entre las repeticiones para cada protocolo de preparación de muestras. Se trazó un histograma del valor C (fig. 2), definido como la desviación estándar dividida por la media de la intensidad de cada característica entre las repeticiones para cada protocolo, para cada método de preparación de muestras. Para comparar la distribución de CV entre los protocolos de preparación de muestras de IPA y BD, se calculó el porcentaje (o número) de características que tienen un CV inferior al 30%, que es el valor aceptable en el análisis de biomarcadores. Además, la variabilidad instrumental también se estimó mediante el cálculo del CV en muestras de control de calidad, constituido por el agrupamiento de 20 µL de cada uno de los 20 extractos. Los grupos de IPA, BD y QC se compararon usando la prueba no paramétrica ANOVA de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron en SPSS versión 20. La significación estadística se definió como $p < .05$

25 Resultados

Los resultados muestran a continuación dos métodos de preparación de muestras para el perfil lipídico no focalizado por UHPLC-QTOF del fluido lagrimal, que es una muestra con una concentración de lípidos comprometida: un procedimiento tradicional de extracción de lípidos basado en BD y un método de precipitación de proteínas IPA. Para la comparación se han empleado un conjunto de criterios cuantitativos, que incluyen la cuantificación de lípidos, la repetitividad y la eficiencia de recuperación, y los criterios cualitativos, así como la simplicidad y la adecuación para el análisis a gran escala. Además, esta metodología se utilizó para la identificación y cuantificación de muestras de lágrimas recogidas de 10 individuos sanos.

Simplicidad de la preparación de la muestra

Teniendo en cuenta que el método BD utiliza cloroformo:metanol, la recolección de la fracción lipídica requiere un pipeteo cuidadoso de la fase orgánica más densa y baja, evitando la contaminación de las proteínas en la interfaz, lo que podría causar contaminación y disminuir el rendimiento. Sin embargo, los protocolos de precipitación proteica dan como resultado una mezcla monofásica de disolventes con un sedimento de proteína en el fondo del tubo, evitando así todos los problemas asociados con la presencia de una interfaz y disminuyendo los riesgos de contaminación del extracto lipídico con proteínas. En el presente estudio, el pipeteo fue manual, pero estos pasos de pipeteo son críticos cuando se considera la preparación de muestras de forma robotizada.

Otro paso crítico es el proceso de resuspensión de los extractos secos. Los dos protocolos de extracción analizados implican una etapa de secado seguida de reconstitución por medio de una mezcla de disolventes próxima a la fase móvil inicial. Esto se debe al hecho de que la inyección directa de disolventes clorados puede dar como resultado una separación cromatográfica deficiente de las clases de lípidos. Este intercambio de disolvente prolonga el tiempo de preparación de la muestra y aumenta el riesgo de introducir errores de procedimiento o alterar el perfil metabólico debido a la pérdida de metabolitos volátiles o la degradación de moléculas lábiles. Sin embargo, en la presente invención no se han detectado diferencias en el rendimiento de extracción obtenido por los dos métodos.

20 *Detección de lípidos*

Se usaron modos de ionización por electrospray positivo y negativo. Se detectaron 11 clases de lípidos pertenecientes a seis familias de lípidos diferentes en la lágrima (relación señal / ruido > 3). Las clases de lípidos examinadas en este estudio son: ácidos grasos (ácidos grasos (FA) y ácido O-acil- ω -hidroxi-graso) (OAHFA); Esfingolípidos (esfingomielina (SM) y ceramida (Cer)); Glicerofosfolípidos (liso-fosfatidilcolina (LPC), liso-fosfatidiletanolamina (LPE) y fosfatidilcolina (PC)); Glicerolípidos (triglicéridos (TG) y diglicéridos (DG)); Lípidos de esteroil (éster de colesterilo (CE)) y éster de cera (WE).

Para SM, Cer, TG, DG, PC, LPC, CE y WE, el ion más intenso se detectó en modo positivo, mientras que LPE, FA y OAHFA se observaron mejor en el modo negativo.

30 El ion más intenso para PC, LPC, SM y WE fue $[M + H]^+$, mientras que para FA y OAHFA fue $[M-H]^-$. Como se esperaba, la adición de formiato de amonio a las fases móviles del modo de ion positivo mejoró la señal de TG, que se detectaron como $[M + NH_4]^+$. A pesar del uso de formiato de amonio, también se detectaron algunos aductos de sodio $[M + Na]^+$.

En el caso de Cer, DAG y CE, este aducto de sodio fue el ion detectado más intenso, mientras que para PC, LPC, SM fue el segundo ion más intenso después del ion molecular protonado.

5 En total, se detectaron 4000 características en ambas polaridades usando la plataforma completa, donde 67 características correspondieron a diferentes especies de lípidos.

El PCA se usó para evaluar la diferente cobertura entre los métodos de preparación de muestras en los modos ESI + y ESI. Los gráficos de puntuación mostraron una separación entre la extracción y la precipitación. Se investigaron las principales fuentes de variación en la PCA mediante la inspección de las parcelas de carga. Las parcelas de carga mostraron
10 que la diferencia principal entre los métodos de preparación de muestras se debía a la interacción específica de diferentes clases de lípidos con el disolvente de extracción de acuerdo con su solubilidad. Por lo tanto, la extracción de CHCl_3 da como resultado un aumento de TG, DG, WE, CE y FA mientras que el protocolo de precipitación de IPA aumenta considerablemente la capacidad de estudiar LPC, PC y SM. Este hecho puede
15 deberse a las diferencias de extracción observadas entre glicerofosfolípidos y esfingomielinas (anfipáticas) y TG, DG, WE y CE (neutro).

Recuperación

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos en el porcentaje de recuperación en el análisis en ESI negativo ($p = 0,225$) (fig. 3) y en ESI
20 positivo ($p = 0,362$) (fig. 4).

Las principales diferencias entre los dos métodos analizados (BD e IPA) se debieron a la selectividad lipídica intrínseca de cada disolvente. Por esta razón, los lípidos polares (PC, LPC, LPE, SM, Cer) se extrajeron en mayor medida en IPA que en BD, mientras que para los no polares (TG, DG, CE y WE), ocurrió lo contrario (fig. 5, 6 y 7).

25

REIVINDICACIONES

- 1- Un método para extraer lípidos de la lágrima de un sujeto que comprende:
- 5 (i) poner en contacto una muestra de lágrima con isopropanol en condiciones adecuadas para extraer lípidos,
- (ii) aplicar a la muestra condiciones adecuadas para la separación de las fases acuosa y alcohólica, y
- (iii) recuperar la fase alcohólica.
- 10 2- Método según reivindicación 1 en donde la muestra de lágrima se diluye en un solvente acuoso antes de ponerlo en contacto con el isopropanol.
- 3- Método según la reivindicación 2 en donde el volumen de isopropanol empleado en la etapa (i) es de 4 veces el volumen de la dilución de la muestra de lágrima en el solvente
- 15 acuoso.
- 4- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde la etapa (i) se lleva a cabo a temperatura ambiente.
- 20 5- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde la etapa (ii) se lleva a cabo mediante centrifugación.
- 6- Método según reivindicación 5 donde la centrifugación se realiza a 4°C.
- 25 7- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde después de la etapa (iii) se realiza una etapa de secado.
- 8- Método según la reivindicación 7 donde la etapa de secado se realiza a una temperatura de entre 30°-60°C y durante un período de entre 1,5 y 3 horas.
- 30 9- Método según la reivindicación 8 en donde el residuo seco se resuspende en una mezcla de metanol y tolueno.
10. Método según la reivindicación 9 en donde el contenido de metanol y tolueno en la
- 35 mezcla es de 9:1 v/v.

11- Un método para diagnosticar en un sujeto una enfermedad caracterizada por una alteración en el contenido y/o proporción de al menos un lípido de la lágrima que comprende:

- 5
- (i) extraer lípidos de la lágrima de dicho sujeto a partir de una muestra de lágrima mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - (ii) determinar el contenido y/o proporción de dicho lípido en el extracto obtenido en la etapa (i) y
 - (iii) comparar el contenido y/o proporción de dicho lípido con un valor de referencia
- 10 en donde una alteración en el contenido y/o proporción de dicho lípido con respecto al valor de referencia es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad.

12 – Un método para detectar diferencias en el perfil lipídico entre dos muestras de lágrima que comprende:

- 15
- (i) extraer los lípidos de ambas muestras empleando el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - (ii) caracterizar el perfil lipídico de cada muestra, y
 - (iii) comparar los perfiles lipídicos de ambas muestras.

13- Método según la reivindicación 12 en donde la primera y la segunda muestra son muestras obtenidas de un mismo sujeto que está siendo tratado o que va a ser tratado con una terapia y en donde las muestras se toman en distintos momentos durante la administración de dicha terapia.

20

14- Método según la reivindicación 12 en donde las muestras proceden de sujetos diferentes.

25

15- Método según la reivindicación 16 donde las muestras proceden de un sujeto que sufre una enfermedad ocular y de un sujeto de referencia.

30 16- Un kit para análisis de lípidos de la lágrima que comprende:

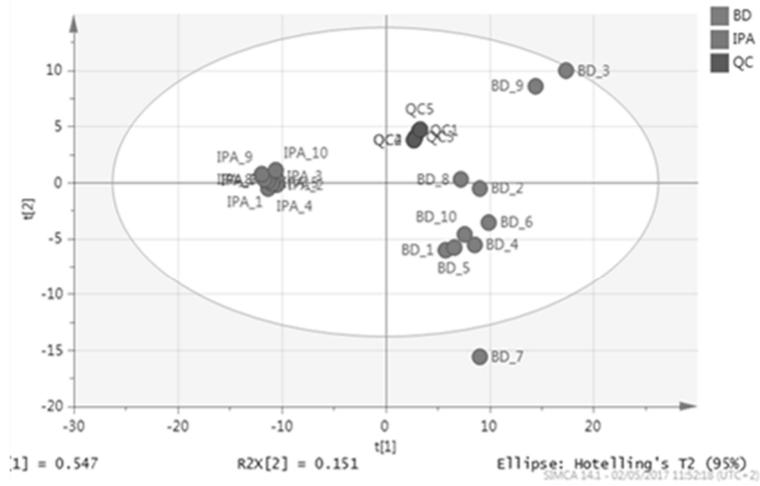
- (i) al menos un éster de cera ,
 - (ii) al menos un esteroles,
 - (iii) al menos un esfingolípido ,
 - (iv) al menos un ácido graso omega O-acilado ,
 - (v) al menos un glicerolípido y
 - (vi) al menos un glicerofosfolípido.
- 35

17. El kit de acuerdo a la reivindicación 16 en donde el éster de cera es 18:1(Δ 9)/26:0,
18. El kit de acuerdo a las reivindicaciones 17 o 18 en donde el esteroles es colesterol o un
5 ester de colesterol.
- 19- El kit de acuerdo a la reivindicación 18 en donde el ester de colesterol es 18:1(Δ 7) Chol Ester,
- 10 20. El kit de acuerdo a las reivindicaciones 16 a 19 en donde el esfingolípido se selecciona del grupo formado por D18:1-18:1(Δ 9) esfingomielina, esfingosina C17, esfinganina C17, esfingosina 1-fosfato (C17), esfinganina-1-fosfato C17, ceramida C12, ceramida C25, ceramida 1-fosfato, esfingolienina C12, C12 ceramida, Glicosil(β) C12 ceramida, y Lactosil (β) C12 ceramida.
- 15 22. El kit de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 en donde el ácido graso omega O-acilado es OAHFA (18:1/16:0).
23. El kit de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 en donde el glicerolípido
20 se selecciona del grupo formado por 18:1(Δ 7) monoacilglicerol, 15:0-18:1(Δ 7) diacilglicerol, 15:0-18:1(Δ 7)-15:0 triacilglicerol.
24. El kit de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23 en donde el glicerofosfolípido se selecciona del grupo formado por 15:0-18:1(Δ 7) fosfocolina, 18:1(Δ 7)
25 lisofosfatidilcolina, 18:1(Δ 7) lisofosfatidiletanolamina 15:0-18:1(Δ 7) PE, 15:0-18:1(Δ 7) PS, 15:0-18:1(Δ 7) PG, 15:0-18:1(Δ 7) PI y 15:0-18:1(Δ 7) PA.
25. El kit de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24 en donde los lípidos están
30 marcados.
26. El kit de acuerdo a la reivindicación 25 en donde el marcaje es una deuteración.
27. El kit de acuerdo a las reivindicaciones 16 a 28 que comprende adicionalmente
35 isopropanol.

28. El kit de acuerdo a las reivindicaciones 16 a 26 en donde el kit comprende adicionalmente metanol y/o etanol.

Reproducibilidad

ESI+



ESI-

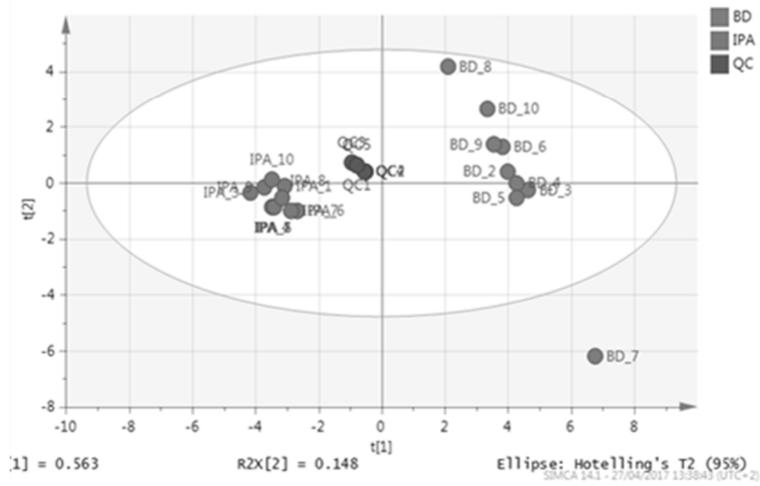


Fig. 1

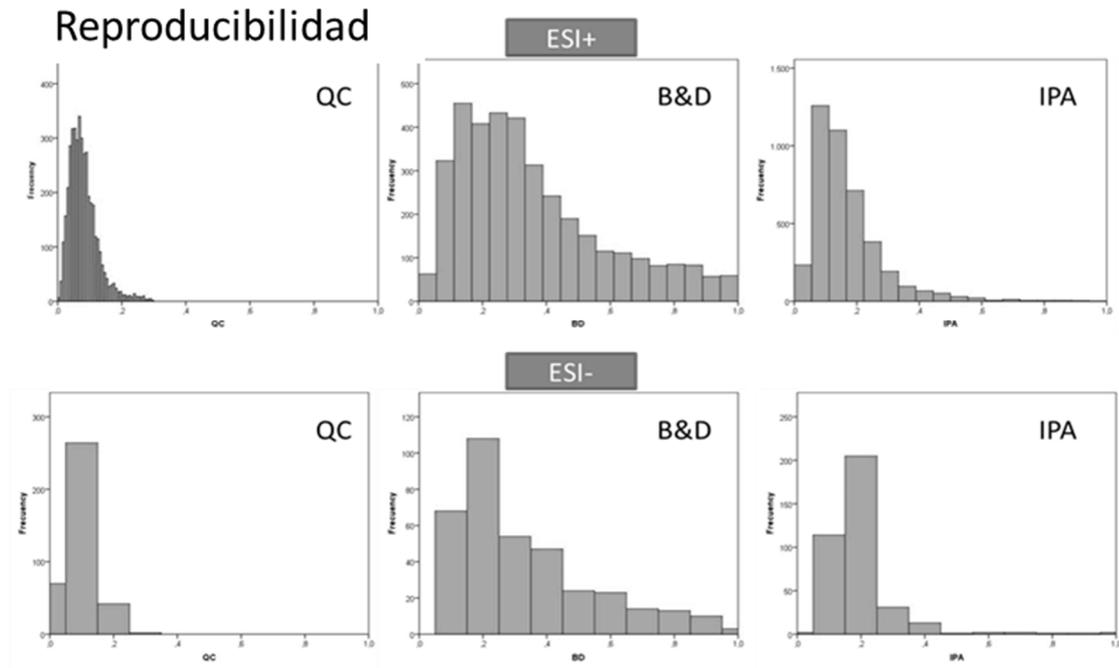


Fig. 2

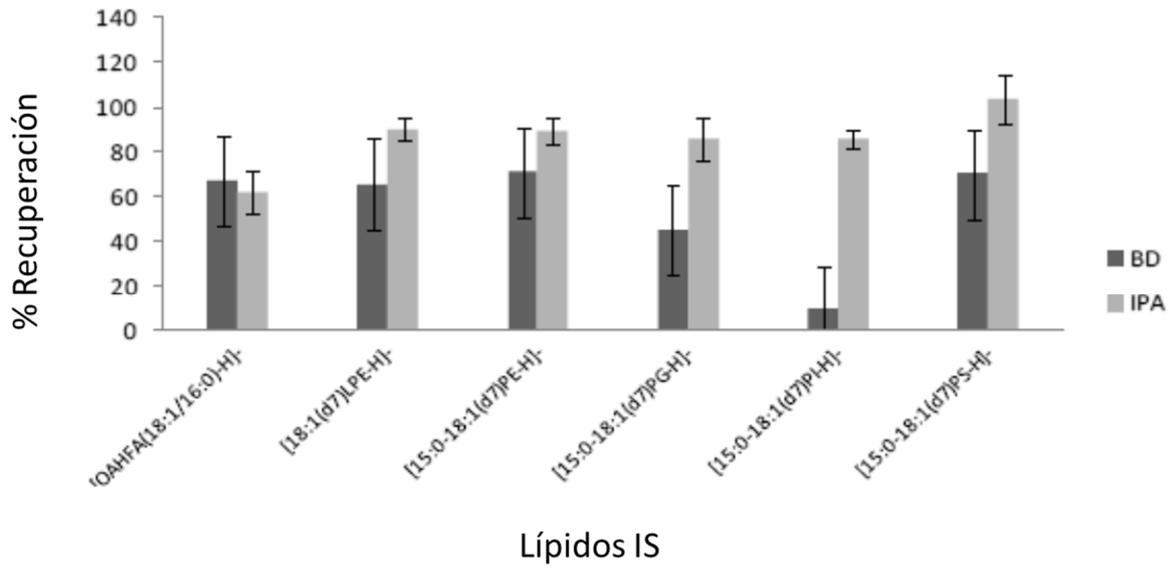


Fig. 3

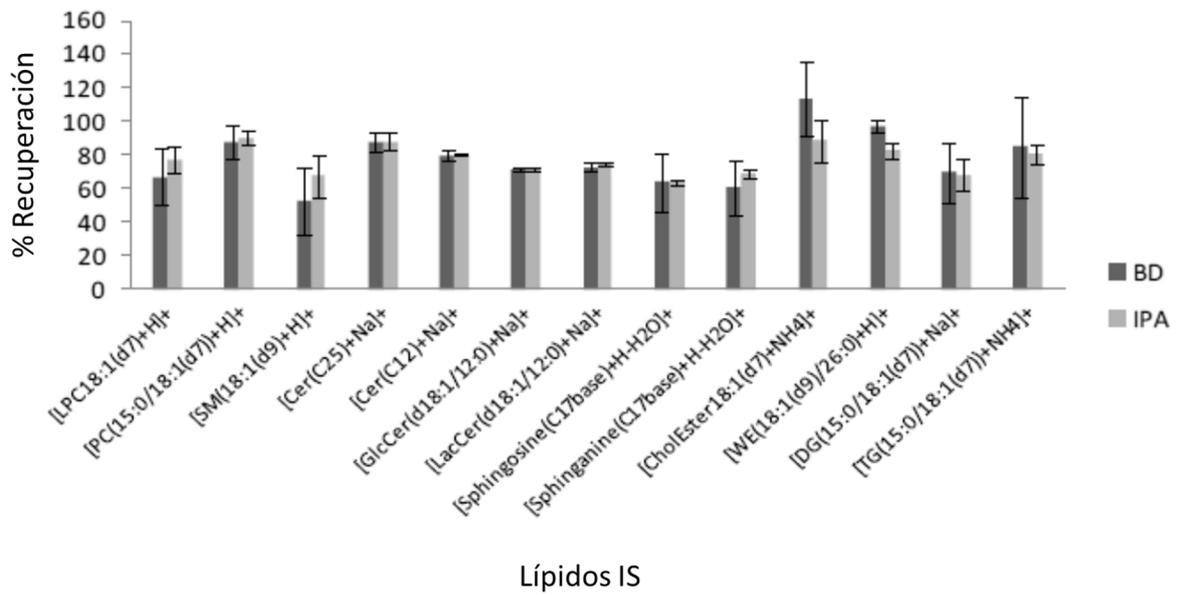


Fig. 4

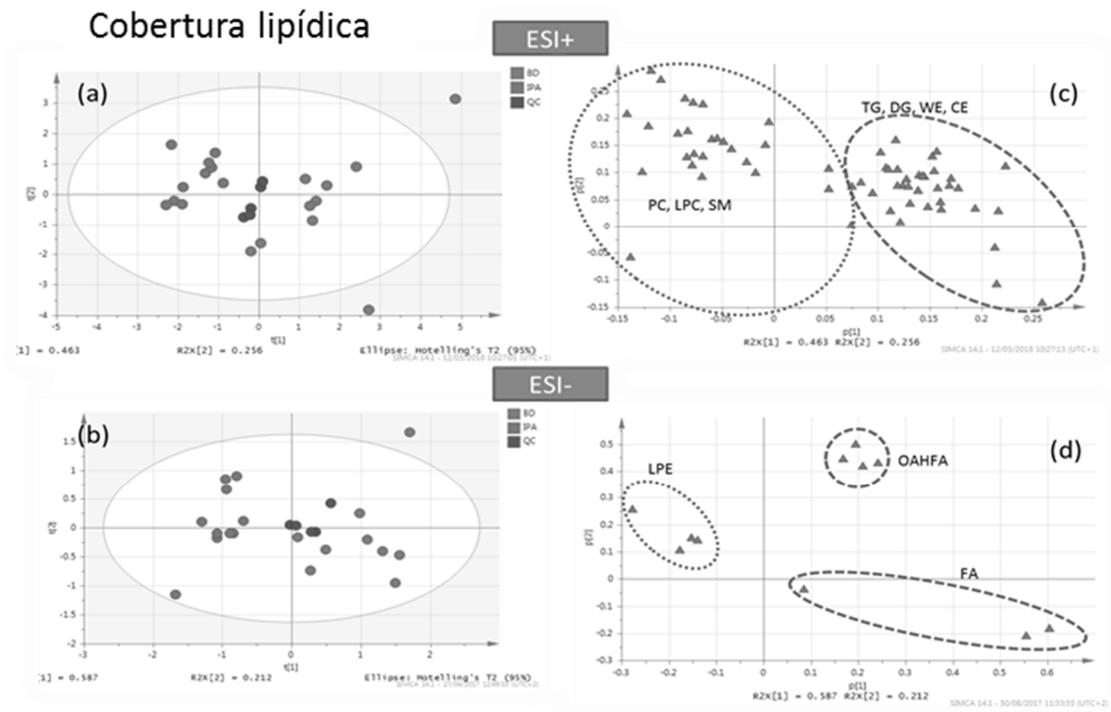
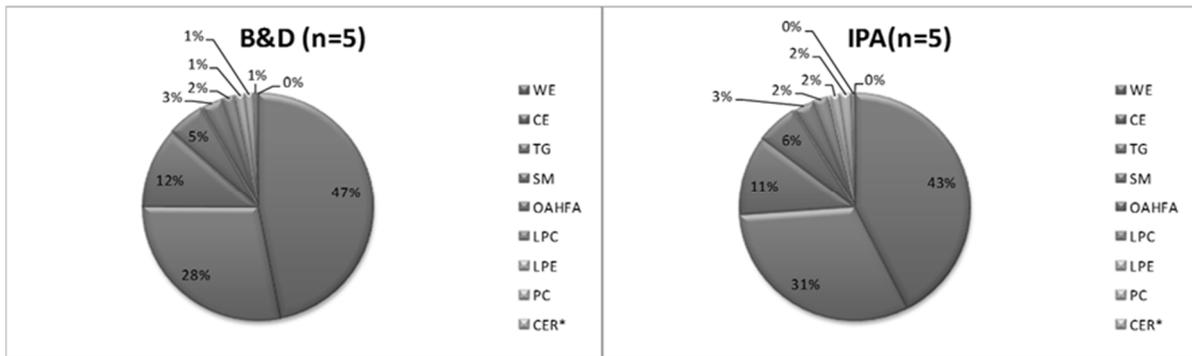


Fig. 5

Resumen esquemático de la composición de la lágrima



Lipid Class	ug/mL lágrima	
	B&D (n=5)	IPA(n=5)
WE	52.14	40.77
CE	31.33	30.12
TG	12.81	10.99
SM	5.88	5.66
OAHFA	3.39	2.80
LPC	2.01	2.12
LPE	1.50	1.43
PC	1.42	1.59
CER*	0.42	0.39
DG	0.31	0.11

Fig. 6

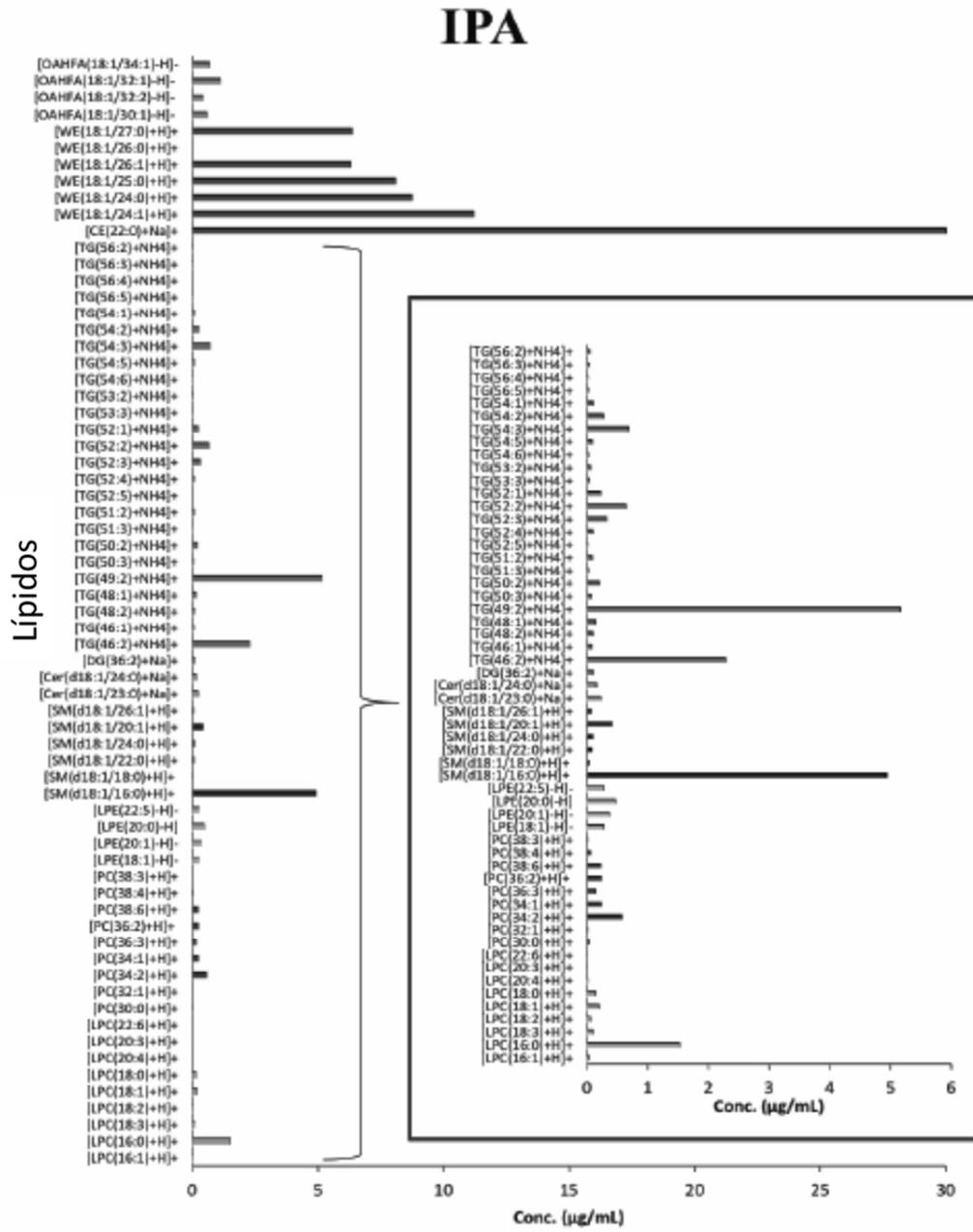


Fig. 7



- ②① N.º solicitud: 201831028
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2018
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07B63/00** (2006.01)
C11B1/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LAM SIN MAN et al. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. Journal of Lipid Research FEB 2014. , 31/01/2014, Vol. 55, Nº 2, Páginas 289-298, ISSN 0022-2275(print) ISSN 1539-7262(electronic), <DOI: doi:10.1194/jlr.M044826>. Materiales y métodos, Tabla 1.	16-28
X	BROWN SIMON H J et al. A Comparison of Patient Matched Meibum and Tear Lipidomes. Investigative Ophthalmology and Visual Science NOV 2013. , 31/10/2013, Vol. 54, Nº 12, Páginas 7417-7423, ISSN 0146-0404(print) ISSN 1552-5783(electronic), <DOI: doi:10.1167/iovs.13-12916>. Materiales y métodos, Tabla	16-28
X	CALDERON CARLOS et al. Comparison of simple monophasic versus classical biphasic extraction protocols for comprehensive UHPLC-MS/MS lipidomic analysis of Hela cells. Analytica Chimica Acta FEB 7 2019. , Epub. 19/10/2018, Vol. 1048, Páginas 66-74, ISSN 0003-2670(print) ISSN 1873-4324(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.aca.2018.10.035>. Resultados y Discusión, Figuras 1, 4 y 5	1-15
X	SARAFIAN MAGALI H et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry.. Analytical Chemistry United States 17 Jun 2014. , 17/06/2014, Vol. 86, Nº 12, Páginas 5766 - 5774, ISSN 1520-6882 (Electronic), <DOI: doi:10.1021/ac500317c pubmed:24820162>. Resultados y Discusión, Tabla 1, Figuras 1-5	1-15
A	SATOMI YOSHINORI et al. One-step lipid extraction for plasma lipidomics analysis by liquid chromatography mass spectrometry. Journal of Chromatography B SEP 15 2017. , 15/09/2017, Vol. 1063, Páginas 93-100, ISSN 1570-0232(print) ISSN 1873-376X(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.jchromb.2017.08.020>. todo el documento.	1-28
A	HAWORTH KRISTINA M et al. Examination of human meibum collection and extraction techniques.. Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry United States Apr 2011. , 31/03/2011, Vol. 88, Nº 4, Páginas 525 - 533, ISSN 1538-9235 (Electronic), <DOI: doi:10.1097/OPX.0b013e318214ac0f pubmed:21378589>. todo el documento.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.08.2019

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/3



- ① N.º solicitud: 201831028
 ② Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2018
 ③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C07B63/00** (2006.01)
C11B1/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NGO W et al. Comparison of Collection Methods for the Measure of Human Meibum and Tear Film-Derived Lipids Using Mass Spectrometry. Current Eye Research 20181003 Taylor and Francis Ltd gbr. , 03/10/2018, Vol. 43, Nº 10, Páginas 1244 - 1252, ISSN 0271-3683 (print) ISSN 1460-2202 (electronic), <DOI: doi:10.1080/02713683.2018.1501803>. todo el documento.	1-28
A	RANTAMAKI ANTTI H et al. Human Tear Fluid Lipidome: From Composition to Function. PLoS One MAY 5 2011. , 30/04/2011, Vol. 6, Nº 5, Páginas Article No.: e19553, ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic), <DOI: doi:10.1371/journal.pone.0019553>. todo el documento.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.08.2019

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/3

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07B, C11B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET