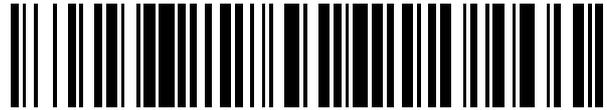


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 476**

51 Int. Cl.:

G01R 33/465 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2017 PCT/EP2017/082410**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18108898**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2017 E 17826455 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3552036**

54 Título: **Método para analizar un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína**

30 Prioridad:

12.12.2016 DE 102016224691

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

16.11.2020

73 Titular/es:

**NUMARES AG (100.0%)
Am BioPark 9
93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

BAUMSTARK, DANIELA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 793 476 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para analizar un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína

- 5 La presente invención se refiere a un método para analizar un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

10 En métodos para analizar espectros de RMN conocidos de la técnica anterior, a menudo las funciones de ajuste individuales que comprenden una sola línea o un número bajo de líneas individuales combinadas en una elevación ajustada a un espectro de RMN de la muestra se usan para asignar concentraciones de constituyentes individuales de la muestra al espectro de RMN medido. Para reducir la complejidad de estas funciones de ajuste, a menudo se ajustan únicamente regiones espectrales específicas, tales como la región de CH₂ o la de CH₃.

15 Si tienen que determinarse las concentraciones de clases de lipoproteínas o subclases de lipoproteínas, tienen que proporcionarse espectros de referencia correspondientes o modelos de referencia (valores de referencia). Un requisito previo de esto es crear clases de lipoproteínas de referencia definidas o subclases de lipoproteínas de referencia por separación física de las clases o subclases en una muestra y posterior análisis cuantitativo de las partículas de lipoproteína de estas clases de referencia o subclases de referencia. Debido a una inexactitud inherente de dichas técnicas de separación, las clases de referencia o subclases de referencia y con ellas los
20 valores de referencia son imprecisos, también.

25 Si tienen que aplicarse determinados algoritmos de ajuste a un espectro de RMN medido, es necesario desconvolucionar el espectro de RMN de la mejor manera posible para separar las señales o líneas individuales unas de otras. Además, las funciones de ajuste a aplicar tienen que definirse de modo que se reflejen las clases de lipoproteínas específicas o subclases de lipoproteínas.

30 En los métodos de análisis conocidos de la técnica anterior que se refieren a determinar la concentración de una determinada clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas, las funciones de ajuste se eligen de modo que representen un tamaño de partícula, independientemente de su composición de partículas concreta. Para dar un ejemplo, se han usado funciones de espectros de RMN que se han separado basándose en las (sub)fracciones de lipoproteínas medidas que se han obtenido previamente por ultracentrifugación de una muestra. En técnicas de la técnica anterior, se han usado curvas con forma de campana para simular dichos espectros de (sub)fracciones de lipoproteínas individuales. No obstante, en ambos casos la composición constante de las (sub)fracciones de lipoproteínas individuales es obligatoria.
35

40 Como ya se ha mencionado, se han analizado únicamente intervalos espectrales muy estrechos en técnicas de la técnica anterior para reducir la complejidad de las funciones de ajuste. A resultado que las señales de alta intensidad, tales como las señales atribuidas a los grupos CH₃ y CH₂ tienen únicamente un solapamiento muy bajo de modo que se han preferido para las operaciones de ajuste. Sin embargo, estas señales requieren una desconvolución muy compleja ya que existen en todos los lípidos y con ellos en todas las clases de lipoproteínas y subclases de lipoproteínas.

45 Roger Mallol et al.: "Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: Application to the study of diabetic dyslipidemia", Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, vol. 70, 2013, páginas 1-24 da una visión global de los métodos de análisis conocidos para determinar la concentración de determinadas clases de lipoproteínas o subclases de lipoproteínas.

50 El documento US 2008/0038829 A1 describe un proceso para la determinación de la distribución de la concentración y la distribución de tamaños de las clases de lipoproteínas en líquidos corporales, por ejemplo, sangre. Los diferentes efectos de diferentes condiciones de medición en la intensidad/forma lineal de las señales de RMN de las clases de lipoproteínas individuales se determinan y permiten la determinación de una distribución de concentración/distribución de tamaños de las clases de lipoproteínas individuales.

55 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método novedoso para analizar un espectro de RMN que sea más fiable que los métodos conocidos de la técnica anterior y que sea adecuado para determinar la concentración o la cantidad de clases de lipoproteínas individuales o subclases de lipoproteínas en la muestra medida.

60 Este objetivo se consigue mediante un método que tiene las características de la reivindicación 1. Este método para analizar un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína comprende las etapas explicadas a continuación.

65 En primer lugar, se define el intervalo espectral a analizar. El intervalo espectral se prolonga más allá de un desplazamiento químico de al menos 0,5 ppm de un espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína.

Entonces, se ajusta una primera función espectral de un primer componente lipídico individual y al menos una

función espectral adicional de un componente lipídico individual adicional en el intervalo espectral completo a analizar. En contraste con los métodos de la técnica anterior, no solamente se ajusta una señal individual (que recae, por ejemplo, en la región de CH₂ o la de CH₃), sino un intervalo espectral más amplio mediante la primera función espectral. De este modo, esta primera función espectral no representa un espectro de RMN de una partícula de lipoproteína o de partículas de lipoproteína de una clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas, sino que en su lugar representa al menos una parte de un espectro de RMN de un componente lipídico individual de una lipoproteína. De la misma manera, la función espectral adicional representa un componente lipídico individual de una lipoproteína. Esto significa que se usa una entidad química mucho más pequeña, concretamente un lípido en lugar de una lipoproteína, para realizar la operación de ajuste. La primera función espectral no solamente representa al menos una parte del espectro de RMN del primer componente lipídico individual, sino que también tiene en cuenta el comportamiento del primer componente lipídico en los alrededores (o entorno) de una partícula lipoproteínica. Lo mismo se aplica para la al menos una función espectral adicional. De este modo, esta partícula lipoproteínica pertenece a una primera clase de lipoproteínas definida o una primera subclase de lipoproteínas definida.

La expresión "al menos una parte de un espectro de RMN" no engloba, en una realización, la posibilidad de que la función se refiera únicamente a una sola línea de RMN, sino que siempre representa al menos dos líneas de RMN, en particular una pluralidad de líneas de RMN, en el intervalo espectral considerado.

Se consideran diferentes funciones espectrales de diferentes lípidos en la misma partícula lipoproteínica, ya que las lipoproteínas no están compuestas de un solo componente lipídico individual, sino de varios componentes lipídicos diferentes.

En una realización, la función respectiva representa el espectro de RMN completo del componente lipídico respectivo.

Si todas las funciones espectrales que se refieren a los componentes lipídicos individuales de la primera clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas se han ajustado en el espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína, puede asignarse una concentración de los componentes lipídicos individuales y a partir de ella una concentración de las partículas lipoproteínicas de esta primera clase de lipoproteínas definidas o subclase de lipoproteínas a la muestra medida.

Finalmente, se determina una concentración o una cantidad de la primera clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas y opcionalmente también de cada clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas diferente basándose en las operaciones de ajuste explicadas anteriormente.

Una diferencia entre este método novedoso para analizar un espectro de RMN y los métodos de análisis conocidos de la técnica anterior es que se usan las funciones de ajuste que se refieren a los componentes lipídicos individuales en lugar de las funciones de ajuste que se refieren a las clases de lipoproteínas o subclases de lipoproteínas. Además, se ajusta un intervalo espectral más amplio de una vez, potenciando significativamente, por tanto, la fiabilidad y la robustez del ajuste aplicado. Las inexactitudes basadas en una desconvolución espectral mal condicionada y la separación de líneas mal condicionada, y las operaciones de ajuste basadas en las líneas espectrales individuales, así como las inexactitudes basadas en una separación física insuficiente de las (sub)fracciones lipoproteínicas individuales para generar valores de referencia adecuados se superan completamente mediante el método actualmente reivindicado. Además, el resultado obtenido no se modela con respecto a las referencias, sino que se basa en las funciones de calibración y, por tanto, tiene que considerarse como un resultado más "directo".

En un aspecto más amplio, la invención actualmente reivindicada se basa en la idea de que todos los constituyentes de la muestra medidos por espectroscopia de RMN pueden definirse por funciones espectrales individuales de dichos espectros de RMN de los componentes individuales que componen los constituyentes. Estos componentes pueden ser, por ejemplo, proteínas, lípidos y metabolitos en diferentes concentraciones y relaciones. De este modo, la invención actualmente reivindicada se centra en el análisis de la concentración de lipoproteína en la muestra.

El autor de la invención ha descubierto que las señales de RMN de las proteínas que están localizadas dentro de lipoproteínas (las llamadas apolipoproteínas) pueden obviarse ya que las apolipoproteínas no se unen fuertemente a una partícula lipoproteínica y pueden asignarse a proteínas en solución (tales como proteínas séricas en el caso de una muestra de suero sanguíneo) o se unen muy fuertemente a partículas lipoproteínicas de modo que su movilidad y junto con ello la señal de RMN resultante es relativamente pequeña. Por consiguiente, las señales de RMN de los componentes lipídicos son completamente suficientes para determinar la concentración de una clase de lipoproteínas específica o subclase de lipoproteínas en una muestra.

En una realización, la etapa de ajuste explicada anteriormente también puede realizarse para funciones de ajuste que se refieren a componentes lipídicos individuales de otras clases de lipoproteínas definidas o subclases de lipoproteínas. Al hacerlo, el ajuste se hace con funciones espectrales de componentes lipídicos individuales, en el que cada función espectral representa un espectro de RMN o al menos una parte de un espectro de RMN de un componente lipídico individual. De este modo, el comportamiento de este componente lipídico en los alrededores de

una partícula lipoproteínica de otra clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas se tiene en cuenta. Es posible omitir determinadas señales de RMN de un espectro de RMN en la función para describir el espectro de RMN respectivo. Al hacerlo, es posible realizar el procedimiento de ajuste acorde sin tener en cuenta determinadas características espectrales que posiblemente no pueden asignarse a un componente lipídico específico, pero podrían tener un origen no exclusivo.

Aunque las operaciones de ajuste pueden realizarse de una manera escalonada en el tiempo (consecutiva), se realizan, en una realización, al mismo tiempo. De este modo, un ajuste de la primera función espectral se ve influida por un ajuste de una segunda función espectral y viceversa.

Como se explica anteriormente, una calibración de funciones da lugar a la concentración de lípidos de una clase de lipoproteínas específicas o subclase de lipoproteínas. Después de ello, se calcula una concentración o una cantidad de esta otra clase de lipoproteínas definida o subclase de lipoproteínas a partir de ello en una realización.

En una realización, el intervalo espectral a analizar se prolonga más allá de al menos 0,6 ppm, en particular al menos 0,7 ppm, en particular al menos 0,8 ppm, en particular al menos 0,9 ppm, en particular al menos 1 ppm, en particular al menos 1,5 ppm, en particular al menos 2 ppm, en particular al menos 2,5 ppm, en particular al menos 3 ppm, en particular al menos 3,5 ppm, en particular al menos 4 ppm, en particular al menos 5 ppm, en particular al menos 6 ppm, en particular al menos 7 ppm, en particular al menos 8 ppm, en particular al menos 9 ppm y muy en particular al menos 10 ppm. Además, cualquier intervalo adecuado que pueda generarse a partir de los umbrales inferiores mencionados anteriormente para el intervalo espectral también es adecuado para definir el intervalo espectral a analizar. Para dar un ejemplo, puede usarse un intervalo espectral de 3 ppm a 10 ppm, en particular de 4 ppm a 9 ppm etc., para definir el intervalo espectral a analizar.

En una realización, el intervalo espectral a analizar engloba el intervalo espectral medido completo en que se observan señales de RMN. Por tanto, si el espectro de RMN de la muestra analizada muestra señales de RMN en usarse un intervalo espectral de 0 ppm a 10 ppm, entonces el intervalo espectral a analizar también engloba el intervalo espectral de 0 ppm a 10 ppm. En dicho caso, sería de 10 ppm de amplitud. Al hacerlo, puede conseguirse un ajuste muy robusto del espectro de RMN mediante la función espectral de los componentes lipídicos individuales, lo que da lugar a resultados fiables para el posterior cálculo de la concentración o cantidad de la clase de lipoproteínas respectiva o subclase de lipoproteínas basándose en la concentración o cantidad del componente lipídico respectivo.

En una realización, la muestra que contiene lipoproteína es una muestra de líquido corporal. En una realización particularmente adecuada, la muestra que contiene lipoproteína es una muestra de suero sanguíneo (también denominada simplemente muestra de suero). En el suero sanguíneo, todas las proteínas resueltas pueden describirse bien como una combinación de diferentes funciones de albúmina y globulina. Además, un espectro de RMN de suero sin lipoproteína (LPDS) describe muy bien los componentes proteínicos del suero en el suero sanguíneo. Una muestra de plasma sanguíneo o una muestra de orina, en particular si hay sangre presente en la orina, también puede usarse como muestra que contiene lipoproteína.

En una realización, un espectro de RMN de compuestos distintos de lipoproteínas o lípidos se sustrae del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína antes de realizar las operaciones de ajuste mencionadas anteriormente. En lugar de un espectro de RMN "real", la función de dicho espectro de RMN puede usarse igual de bien para una operación de sustracción acorde. Las influencias de sustracción de compuestos distintos de las lipoproteínas o lípidos hace que las posteriores operaciones de ajuste sean más fáciles y potencian la precisión de un procedimiento de ajuste acorde. Para dar un ejemplo, las señales de RMN de proteínas y/o glúcidos pueden sustraerse del espectro de RMN de la muestra a analizar.

En una realización, el espectro de RMN a sustraer es un espectro de RMN de suero sin lipoproteínas (LPDS). Esta realización es adecuada si la muestra que se analiza por espectroscopia de RMN es una muestra de suero sanguíneo. En dicho caso, todas las influencias por proteínas resueltas se sustraen del espectro de RMN de la muestra de suero sanguíneo de modo que solamente las señales resultantes de las lipoproteínas permanecen presentes en el espectro de RMN. Las señales resultantes de los metabolitos tales como aminoácidos o glúcidos pueden sustraerse como señales de fondo o pueden suprimirse. Para dar un ejemplo, las señales de metabolitos de difusión rápida pueden suprimirse de forma eficaz en espectroscopia de RMN aplicando espectroscopia dirigida por difusión a la muestra respectiva. Como alternativa o adicionalmente, puede usarse otro espectro dependiente de proteínas para sustraerlo del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína para compensar las señales dependientes de proteínas.

Todas las lipoproteínas en general se generan a partir de los mismos componentes lipídicos. Estos componentes lipídicos que generan las lipoproteínas son colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y/o fosfatidilinositol, esfingomielinas y ácidos grasos (los últimos están presentes principalmente en forma unida). La longitud de la cadena de los ácidos grasos (independientemente de si están presentes en forma de una molécula aislada o en forma de residuos de ácido graso unidos por un enlace éster a una molécula lipídica) pueden diferir a grandes rasgos. Lo mismo es cierto para la cantidad de dobles

enlaces que están presentes en los ácidos grasos o residuos de ácidos grasos. En una realización, el primer componente lipídico y/o el componente lipídico adicional se eligen del grupo que consiste en colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos, fosfatidilcolina, esfingomielinas y ácidos grasos. De este modo, los ácidos grasos o residuos de ácidos grasos que tienen una longitud de cadena de 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22, 24, 26 átomos de carbono, así como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dobles enlaces son particularmente adecuados. Los aminoácidos particularmente adecuados son aquellos que tienen 16 átomos de carbono y cero dobles enlaces (16:0), 18 átomos de carbono y cero dobles enlaces (18:0), 18 átomos de carbono y un doble enlace (18:1) y 18 átomos de carbono y 2 dobles enlaces (18:2).

En una realización, cualquiera de las funciones espectrales usadas para las operaciones de ajuste (es decir, la primera función espectral del primer componente lipídico individual, la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional y/o las funciones espectrales de los componentes lípidos individuales) se obtiene basándose en un espectro de RMN del componente lipídico respectivo. Dicho espectro de RMN puede obtenerse mediante una medición, por ejemplo, en un disolvente orgánico o midiendo micelas lipídicas en agua o un medio acuoso. De este modo, las señales de RMN del componente lipídico medido no deben interferir con otras señales de RMN de diferentes componentes. Una interferencia con las señales de RMN de tipo similar (es decir, con señales de RMN de diferentes componentes lipídicos) sería aceptable. Por tanto, es posible medir diferentes lípidos, tales como una mezcla de diferentes fosfolípidos o una mezcla de al menos un fosfolípido y al menos un lípido al mismo tiempo y obtener todavía un espectro de RMN adecuado del componente lipídico respectivo, es decir, de los lípidos o mezcla de lípidos medida.

Como el comportamiento del componente lipídico en forma pura difiere del comportamiento del mismo componente lipídico en los alrededores (interior) de la partícula lipoproteínica, el espectro de RMN medido (o un derivado del mismo) tiene que ajustarse por desplazamiento matemático, ampliación y/o ajuste de su altura relativa de modo que la función resultante represente el comportamiento de RMN del componente lipídico respectivo en los alrededores de una partícula lipoproteínica de la clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas en cuestión. Aunque los componentes lipídicos pueden moverse libremente en su forma pura, los movimientos se restringen en los alrededores de una partícula lipoproteínica. Las alteraciones de la señal de RMN se producen principalmente debido a diferentes composiciones de partícula, diferentes tamaños de partícula y diferentes estructura de partícula. Estas alteraciones de RMN podrían englobar pérdidas de señal, ampliaciones de señal y desplazamientos de señal. En lugar de basar las funciones espectrales usadas para las operaciones de ajuste sobre espectros de RMN medidos, también es posible basarse en espectros simulados.

En la estrategia explicada anteriormente, el espectro de RMN del componente lipídico en un disolvente orgánico se transfiere a un espectro de RMN en un medio acuoso teniendo en cuenta el comportamiento de difusión del componente lipídico. Cada componente lipídico muestra el mismo comportamiento de difusión que la partícula lipoproteínica en que está ubicado. Como ya se ha mencionado anteriormente, cualquiera de las funciones espectrales (es decir, la primera función espectral del primer componente lipídico individual, la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional y/o las funciones espectrales de componentes lipídicos individuales) se prolonga más allá del intervalo espectral completo a analizar. En una realización, cualquiera de las funciones espectrales comprende al menos dos líneas de RMN, en particular al menos tres líneas de RMN, en particular al menos cuatro líneas de RMN, en particular al menos cinco líneas de RMN, en particular al menos seis líneas de RMN, en particular al menos siete líneas de RMN, en particular al menos ocho líneas de RMN, en particular al menos nueve líneas de RMN, en particular al menos diez líneas de RMN, en particular al menos 20 líneas de RMN, en particular al menos 50 líneas de RMN, en particular al menos 100 líneas de RMN, en particular al menos 200 líneas de RMN, en particular al menos 300 líneas de RMN, en particular al menos 400 líneas de RMN, en particular al menos 500 líneas de RMN, en particular al menos 600 líneas de RMN, en particular al menos 700 líneas de RMN, en particular al menos 800 líneas de RMN, en particular al menos 900 líneas de RMN, en particular al menos 1000 líneas de RMN. En una realización, la función espectral respectiva comprende de 2 a 1000 líneas o cualquier otro intervalo de líneas que pueda generarse a partir de los umbrales mencionados anteriormente de líneas de RMN de la función espectral respectiva (por ejemplo, de 4 a 700 líneas, etc.).

En una realización, cualquiera de las funciones espectrales (es decir, la primera función espectral del primer componente lipídico individual, la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional y/o las funciones espectrales de componentes lipídicos individuales) sirve no solamente para ajustar una sola línea de RMN del espectro de RMN a analizar, sino al menos 2, en particular a menos 3, en particular a menos 4, en particular a menos 5, en particular a menos 6, en particular a menos 7, en particular a menos 8, en particular al menos 9 y muy en particular al menos 10 señales del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína. La forma específica de las señales del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína depende del número de señales generadas por el componente lipídico específico. Los componentes lipídicos con una estructura química muy homogénea tienen líneas de RMN más abruptas que los componentes lipídicos formados más heterogéneamente y complejos.

En una realización, la alineación apropiada de la primera función espectral del primer componente lipídico individual, la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional y/o las funciones espectrales de los componentes lípidos individuales se consigue alineándolos basándose en un comportamiento de difusión definido de

una clase o subclase de lipoproteínas.

Los aspectos y detalles de la invención actualmente descrita se explicarán en mayor detalle con respecto a realizaciones a modo de ejemplo y las figuras adjuntas. En las figuras:

- 5 La figura 1A muestra un primer conjunto de espectros de RMN de ^1H como patrón que comprenden un espectro de RMN de suero sanguíneo que contiene lípidos;
- 10 La figura 1B muestra un primer conjunto de espectros de RMN ponderados por difusión de las mismas muestras que en la figura 1A;
- La figura 2A muestra un primer detalle de los espectros de RMN de suero sanguíneo y de componentes lipídicos individuales;
- 15 La figura 2B muestra un segundo detalle del mismo conjunto de espectros de RMN como se muestra en la figura 2A;
- La figura 3 muestra el descenso de la señal en los espectros de RMN dirigida por difusión en dependencia de la fuerza del gradiente; y
- 20 La figura 4 muestra diferentes estrategias para ajustar un espectro de RMN.

La figura 1A muestra un espectro 1 de RMN de una muestra de suero sanguíneo (línea negra). Para sustraer todas las señales de RMN que se originan en el suero sin lipoproteínas (LPDS), se ha registrado un espectro 2 de RMN de LPDS acorde (línea gris) y se ha sustraído del espectro 1 de suero sanguíneo. El espectro 3 de la diferencia resultante también se representa en la figura 1A (línea discontinua). En este espectro 3 de la diferencia resultante, pueden verse solamente las señales de RMN que no se originan a partir de los componentes que están presentes en el suero sin lipoproteínas. Estas son esencialmente lipoproteínas únicamente y metabolitos pequeños. De este modo, la figura 1A representa espectros de RMN de ^1H como patrón. En esta y en todas las siguientes figuras las barras grises se representan indicando el intervalo espectral en que pueden observarse las señales, que son el resultado del disolvente (agua o disolvente orgánico) en que las muestras individuales se han resuelto para registrar los espectros de RMN respectivos.

La figura 1B muestra los espectros de RMN ponderados por difusión de las mismas muestras que en la figura 1A. Por tanto, cualquier superposición con las señales de los metabolitos se suprime en el espectro 1 de suero sanguíneo (línea negra) y el espectro 2 de LPDS (línea gris). Como los metabolitos habitualmente difunden de forma bastante rápida, sus señales se suprimen de forma eficaz en dichos espectros de difusión. Esto provoca una mejor calidad del espectro 3 de la diferencia (línea discontinua). En todo caso, las señales de los metabolitos se producen en espectros de RMN ponderados por difusión como líneas muy estrechas y pueden asignarse fácilmente a una sustancia específica comparando el espectro 1 de suero sanguíneo con espectros de RMN de diferentes sustancias que se producen normalmente como metabolitos en el suero sanguíneo. De este modo, los metabolitos tienen que registrarse en un entorno que sea muy similar al suero sanguíneo para permitir una asignación precisa de las líneas de RMN respectivos en el espectro 1 de suero sanguíneo. También es posible añadir directamente los metabolitos al suero sanguíneo.

Con respecto al espectro 3 de la diferencia resultante compuesto principalmente de señales de RMN de lipoproteínas, debe apreciarse que lipoproteínas comprenden partículas de diferente tamaño. Además, la composición lipídica y proteínica de las diferentes lipoproteínas dentro de las partículas lipoproteínicas puede variar.

50 De acuerdo con la invención actualmente reivindicada y dentro del marco de la presente realización a modo de ejemplo, se asume que las señales de las proteínas que están localizadas dentro de las lipoproteínas pueden obviarse ya que esas proteínas no se unen fuertemente a una partícula lipoproteínica (y con ello pertenecen a las proteínas del suero sanguíneo) o de lo contrario se unen fuertemente a una partícula de lipoproteína de modo que su movilidad y, por tanto, la señal de RMN se disminuye fuertemente. Las señales acordes pueden observarse entre 6 y 8 ppm.

Por consiguiente, el espectro 3 de la diferencia puede usarse como espectro de partida para las posteriores operaciones de ajuste con espectros de RMN individuales de componentes lipídicos.

60 La figura 2A muestra el intervalo de desplazamiento químico de 0,5 ppm a 3,0 ppm de un espectro 4 de la diferencia (curva negra continua) que se ha obtenido sustrayendo las señales de RMN de suero son lípidos de un espectro 4 de RMN de ^1H ponderado por difusión de una muestra de suero sanguíneo. Por tanto, este espectro 4 de la diferencia se ha generado como el espectro 3 de la diferencia de la figura 1B. Además, las señales de RMN de diferentes lípidos que pueden encontrarse en suero sanguíneo se muestran en la figura 2A, concretamente un espectro 5 de RMN de ^1H de fosfolípidos (curva gris continua), un espectro 6 de RMN de ^1H de triglicéridos (curva negra discontinua) y un espectro 7 de RMN de ^1H de colesterol (curva gris discontinua). De este modo, la figura 2A

representa en cada caso el intervalo de desplazamiento químico de 0,5 ppm a 3,0 ppm de estos espectros.

La figura 2B muestra los mismos espectros 4, 5, 6, 7 de RMN que la figura 2A, pero en un intervalo de desplazamiento químico de 3,0 ppm a 5,5 ppm. Los espectros 5, 6, 7 de lípidos de las figuras 2A y 2B se han registrado en un disolvente orgánico.

Los espectros 5, 6, 7 de RMN sirven como base para definir las funciones que representan estos espectros o al menos una parte de ellos. Es posible, por ejemplo, que una señal de RMN individual como la señal en aprox. 1,6 ppm del espectro 5 de RMN de fosfolípidos no se considere cuando se define una función acorde. Esta señal está provocada principalmente por ácidos grasos. Estos ácidos grasos están presentes a un grado variable tanto en fosfolípidos como en triglicéridos. Para compensar este grado variable, la contribución a la RMN de los ácidos grasos se considera mediante una función de ajuste diferente, independiente de si los ácidos grasos son parte de los fosfolípidos o de los triglicéridos. El espectro de RMN acorde de los ácidos grasos no se muestra en las figuras 2A y 2B. Otras señales de RMN del espectro 5 de RMN de fosfolípidos no difieren fuertemente de fosfolípidos diferentes y, por tanto, son más adecuados para identificar estas clases de lípidos en espectros de RMN.

Para transferir los espectros de RMN de los componentes lipídicos individuales desde un sistema de referencia basado en disolvente orgánico a un sistema de referencia basado en medio acuoso, se tiene en cuenta el comportamiento de difusión de diferentes partículas lipoproteínicas. Cada componente lipídico tiene que mostrar el mismo comportamiento de difusión que una partícula lipoproteínica que esté compuesta por este componente lipídico.

La figura 3 ilustra el descenso de la señal en espectros de RMN dirigida por difusión y, por tanto, explica los diferentes comportamientos de difusión de diferentes partículas lipoproteínicas, de proteínas y de metabolitos. De este modo, la intensidad relativa de una señal de RMN particular se establece en relación con la fuerza relativa de la fuerza del gradiente aplicado. La curva de difusión resultante de VLDL (partículas lipoproteínicas con muy baja densidad) 10, la curva de difusión resultante de LDL (partículas lipoproteínicas que tienen una baja densidad) 11, la curva de difusión resultante de HDL (partículas lipoproteínicas que tienen una alta densidad) 12, la curva de difusión resultante de proteínas 13 y las curvas de difusión resultantes de metabolitos de bajo peso molecular 14 indican que la intensidad de las señales de RMN disminuye fuertemente a) con la densidad creciente de las partículas lipoproteínicas respectivas y b) con el peso molecular decreciente del componente respectivo. El autor de la invención ya podía demostrar que la intensidad de las señales de RMN estrechas disminuye más rápido con una fuerza de gradiente creciente, mientras que las amplias señales de RMN muestran una pérdida de señal menor significativa mediante una fuerza de gradiente creciente.

En general es posible realizar subdivisiones adicionales de VLDL, LDL y HDL en fracciones de VLDL grandes, de tamaño medio y pequeñas, LDL grandes, de tamaño medio y pequeñas, así como HDL grandes, de tamaño medio y pequeñas. Por tanto, las curvas de difusión de VLDL 10, LDL 11 y HDL 12 son simplemente para entenderse como un ejemplo de la influencia de la fuerza del gradiente sobre las diferentes partículas lipoproteínicas.

La figura 4 muestra las diferentes estrategias de ajustar los espectros de RMN de acuerdo con la técnica anterior y de acuerdo con la invención actualmente reivindicada. De este modo, la curva superior muestra un espectro de RMN de una muestra 16 de suero sanguíneo y la segunda curva empezando por arriba muestra un espectro de RMN que representa las señales 17 de proteínas que pueden sustraerse fácilmente del espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo.

De acuerdo con técnicas de la técnica anterior, las funciones de ajuste que representan líneas de RMN individuales de diferentes subclases de lipoproteínas 18 se han usado para ajustar líneas individuales del espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo. De este modo, las líneas de RMN individuales de una primera subclase de lipoproteínas 18 (curva de puntos y discontinua), las líneas de RMN individuales una segunda subclase de lipoproteínas 18 (curva discontinua) y las líneas de RMN individuales de una tercera subclase de lipoproteínas 18 (curva continua) se han usado para el ajuste.

De acuerdo con la realización actual descrita, la función de un espectro de RMN de un primer componente lipídico individual 19 se usa para ajustar el espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo. De este modo, la función que representa el espectro de RMN del primer componente lipídico individual 19 describe el espectro de RMN respectivo sobre el intervalo espectral completo en que se observan señales de RMN. En el presente caso, que se representa en la figura 4, este intervalo espectral se prolonga desde 0 ppm hasta 10 ppm. Al no usar funciones individuales que describan líneas individuales de espectros de RMN de una subclase de lipoproteínas 18, pero al usar en su lugar la función que describe el espectro de RMN del primer componente lipídico 19 sobre un intervalo espectral completo o sobre límites específicos, puede conseguirse un ajuste estable y bien condicionado. Como las lipoproteínas contienen más de un lípido, adicionalmente se usa una función que describe un espectro de RMN de un lípido adicional 20 (una vez más sobre el intervalo espectral completo en que se observan líneas de RMN) para realizar un ajuste del espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo.

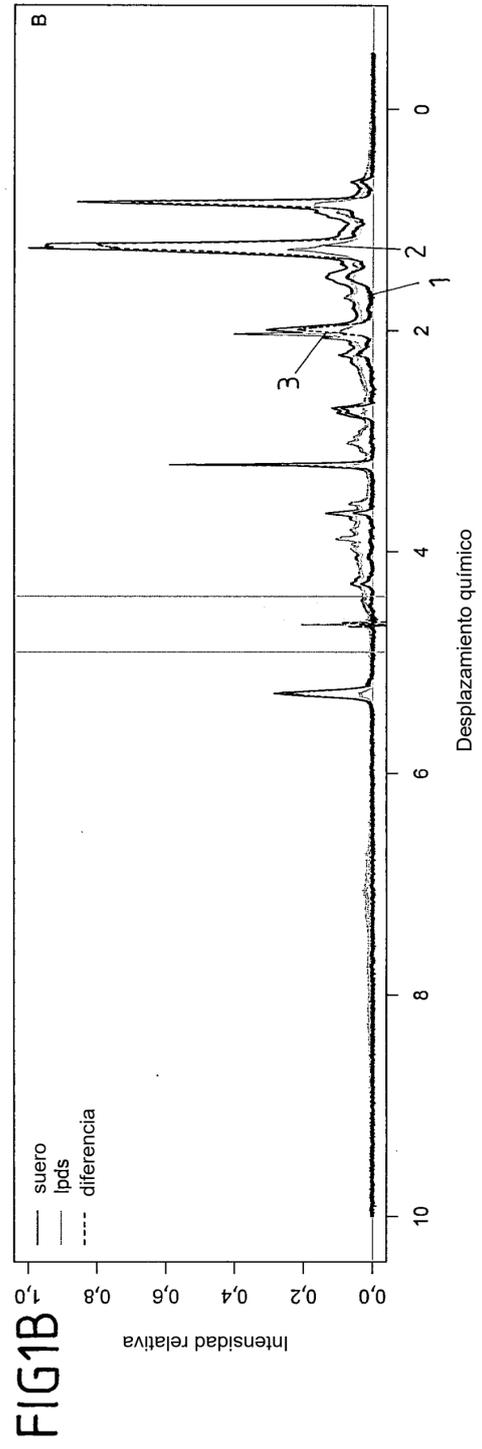
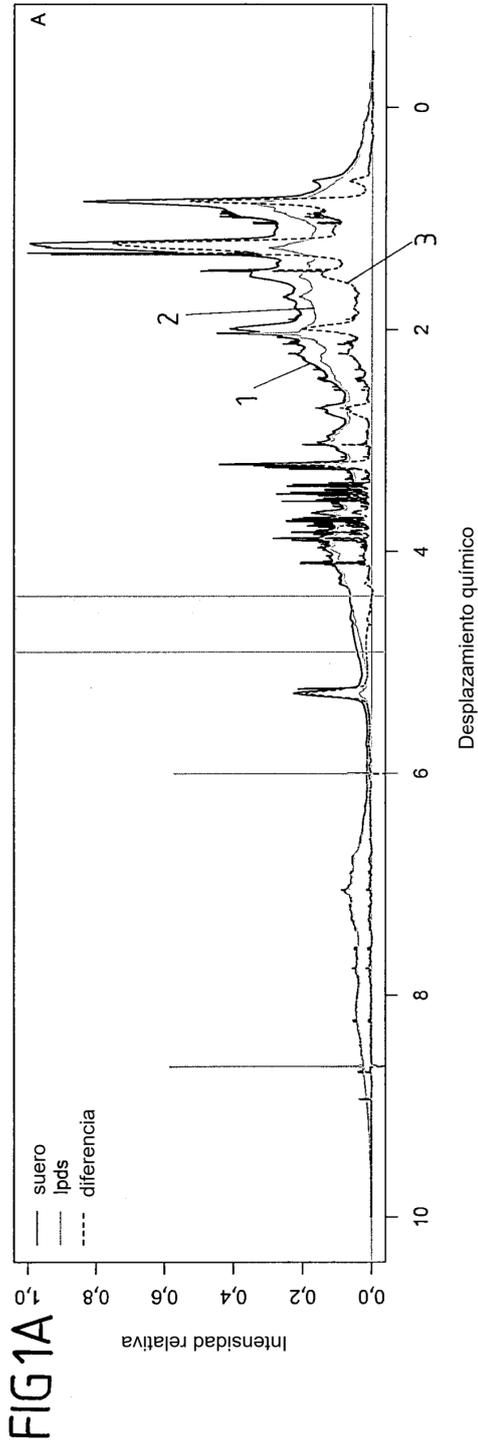
Como se explica anteriormente, el comportamiento de RMN de los lípidos individuales difiere de sus alrededores

- específicos. Esto se tiene en cuenta ajustando la función del espectro de RMN del primer lípido 19 de diferentes maneras como se indica por las primeras funciones ajustadas del primer lípido 21. una función de las primeras funciones ajustadas 21 se refiere al primer lípido en una primera subclase de lipoproteínas (curva de puntos y discontinua). La segunda función de las primeras funciones ajustadas 21 se refiere al primer lípido en una segunda subclase de lipoproteínas (curva discontinua). La tercera función de las primeras funciones ajustadas 21 se refiere al primer lípido en una tercera subclase de lipoproteínas (curva continua).
- 5
- Los mismos ajustes se hacen con la función del espectro de RMN del segundo lípido 20. Con ello, se producen las segundas funciones ajustadas 22, en las que la primera función de las segundas funciones ajustadas 22 se refiere al segundo lípido en una primera subclase de lipoproteínas (curva de puntos y discontinua), la segunda función de las segundas funciones ajustadas 22 se refiere al segundo lípido en una segunda subclase de lipoproteínas (curva discontinua) y la tercera función de las segundas funciones ajustadas 22 se refiere al segundo lípido en una tercera subclase de lipoproteínas (curva continua).
- 10
- 15 Aplicando las funciones ajustadas individuales 21,22 para una operación de ajuste del espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo (opcionalmente después de haber sustraído el espectro de RMN de los componentes proteínicos 17 de este espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo), puede conseguirse un ajuste adecuado de este espectro de RMN de la muestra 16 de suero sanguíneo.
- 20 Los factores necesarios para cambiar la escala de las funciones ajustadas individuales 21,22 para conseguir un ajuste apropiado de un espectro de la diferencia entre el espectro 16 del suero y el espectro 17 de proteínas puede entonces usarse para calcular la concentración en que los componentes lipídicos (por ejemplo, fosfolípidos, triglicéridos y colesterol) están presentes en este espectro de la diferencia.

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) definir un intervalo espectral a analizar de al menos 0,5 ppm de un espectro de RMN de una muestra que contiene lipoproteína (16),
 b) ajustar una primera función espectral de un primer componente lipídico individual (21) y al menos una función espectral adicional de un componente lipídico individual adicional (22) en el intervalo espectral completo a analizar,
- 10 ○ en donde la primera función espectral (21) representa al menos una parte de un espectro de RMN del primer componente lipídico individual teniendo en cuenta el comportamiento del primer componente lipídico en los alrededores de una partícula lipoproteínica de una primera clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas,
 15 ○ en donde la función espectral adicional (22) representa al menos una parte de un espectro de RMN del componente lipídico individual adicional teniendo en cuenta el comportamiento del componente lipídico adicional en los alrededores de una partícula lipoproteínica de la misma clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas,
- 20 c) determinar una concentración o una cantidad del primer componente lipídico individual y el componente lipídico individual adicional y a partir de ella una concentración o una cantidad de la primera clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas en la muestra que contiene lipoproteína y opcionalmente de cada otra clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas, basándose en las operaciones de ajuste de la etapa b).
- 25 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa b) se realiza adicionalmente con funciones espectrales adicionales de componentes lipídicos individuales (21, 22), en donde cada función espectral (21, 22) representa al menos una parte de un espectro de RMN de un componente lipídico individual teniendo en cuenta el comportamiento de este componente lipídico en los alrededores de una partícula lipoproteínica de otra clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas.
- 30 3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** en la etapa c) una concentración o una cantidad de los componentes lipídicos individuales se determina y se usa para determinar una concentración o una cantidad de cada otra clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas definidas .
- 35 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el intervalo espectral a analizar engloba el intervalo espectral completo medido en que se observan líneas espectrales.
- 40 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la muestra que contiene lipoproteína es una muestra de suero sanguíneo o una muestra de plasma sanguíneo.
- 45 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** un espectro de RMN de compuestos distintos de lipoproteínas o lípidos, o una función de dicho espectro de RMN, (2; 17) se sustrae del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína antes de la operación de ajuste.
- 50 7. Método de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, **caracterizado por que** el espectro de RMN a sustraer es un espectro de RMN de suero deficiente en lipoproteínas u otro espectro dependiente de proteínas o mezclas de los mismos (2).
- 55 8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** al menos uno del primer componente lipídico y el componente lipídico adicional se eligen del grupo que consiste en colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, esfingomielinas y ácidos grasos.
- 60 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** al menos una de la primera función espectral del primer componente lipídico individual (21), la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional (22) y las funciones espectrales de componentes lipídicos individuales (21, 22) se obtiene basándose en un espectro de RMN del respectivo componente lipídico individual (21, 22), en donde las líneas del espectro de RMN o un derivado del mismo opcionalmente se desplazan, amplían o ajustan en altura para que representen al menos una parte de un espectro de RMN del respectivo componente lipídico en los alrededores de una partícula lipoproteínica.
- 65 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** al menos una de la primera función espectral del primer componente lipídico individual (21), la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional (22) y las funciones espectrales de componentes lipídicos individuales (21, 22) comprende al menos dos líneas.

11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** al menos una de la primera función espectral del primer componente lipídico individual (21), la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional (22) y las funciones espectrales de componentes lipídicos individuales (21, 22) sirve para ajustar más de una señal del espectro de RMN de la muestra que contiene lipoproteína.
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** al menos una de la primera función espectral del primer componente lipídico individual (21), la función espectral adicional del componente lipídico individual adicional (22) y las funciones espectrales de los componentes lipídicos individuales (21, 22) está alineada basándose en un comportamiento de difusión definido de una clase de lipoproteínas o subclase de lipoproteínas.



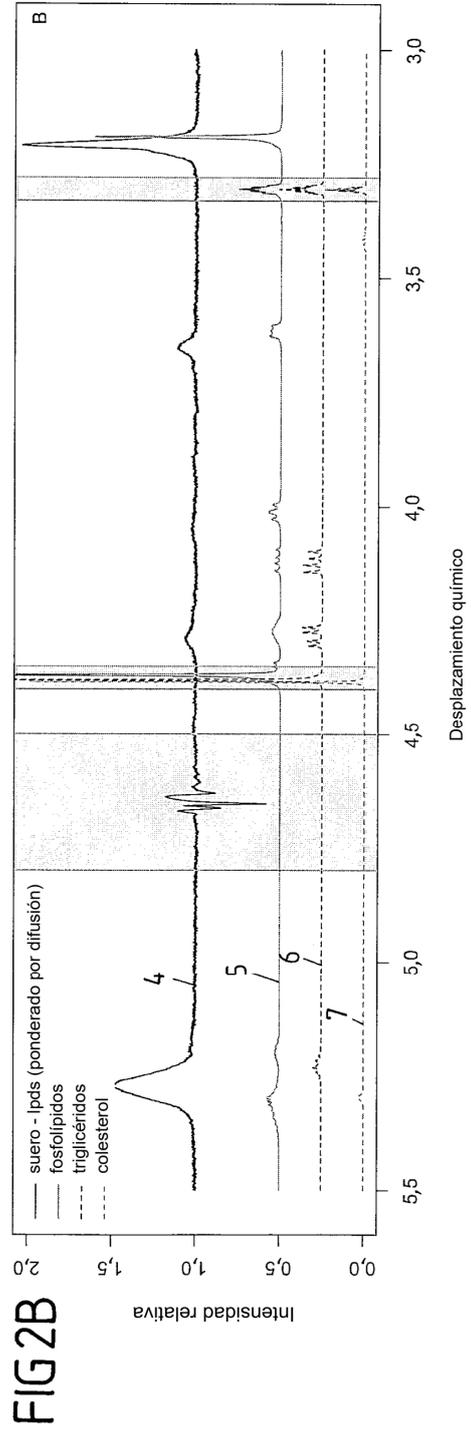
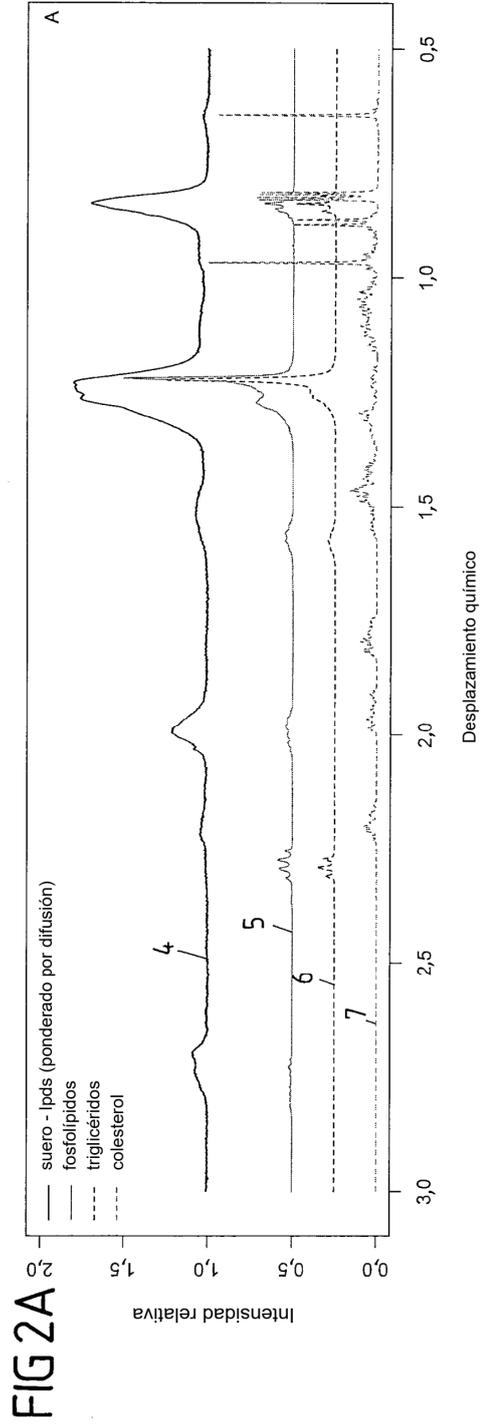


FIG3

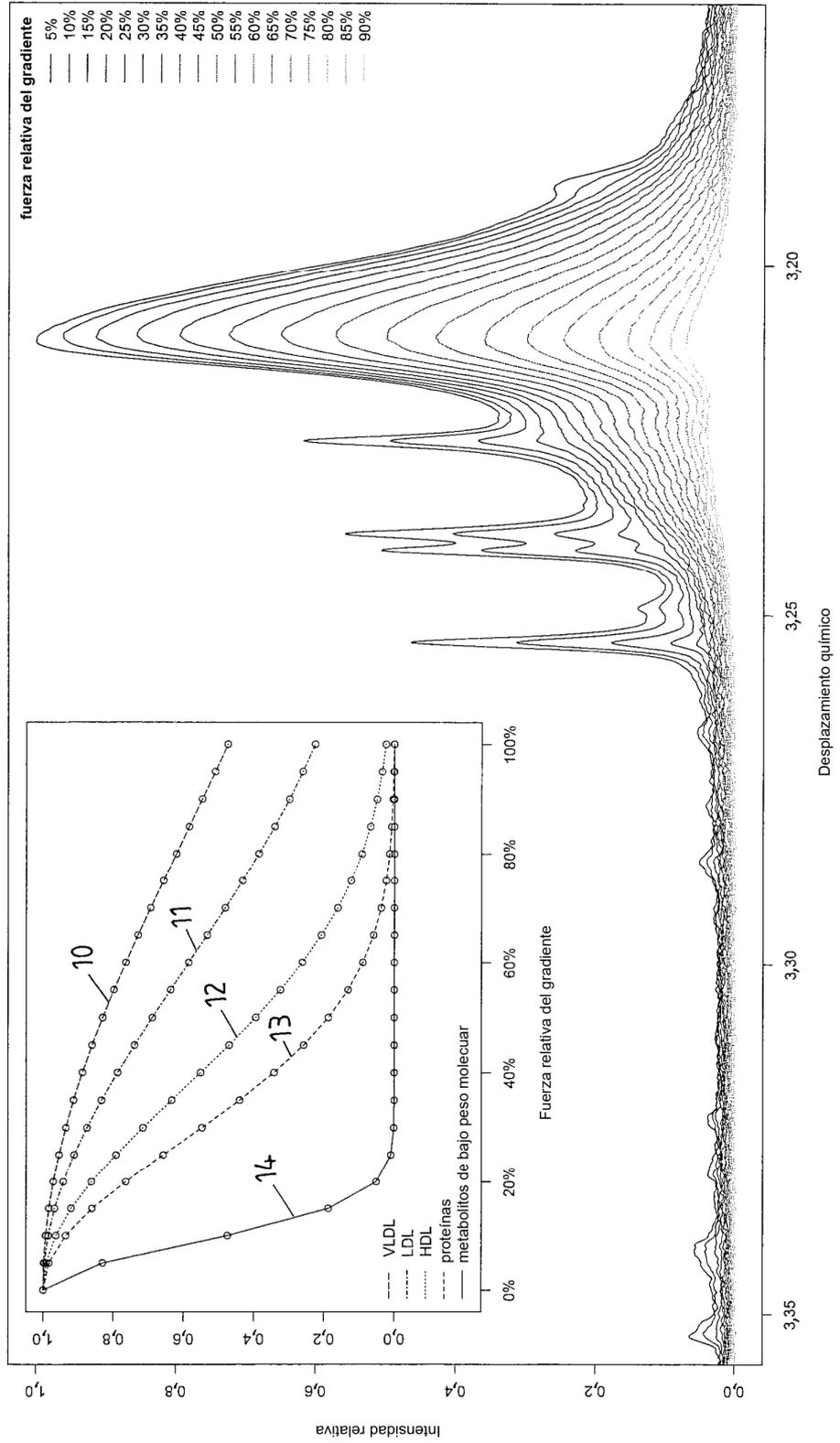


FIG 4

