



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 978 375**

⑮ Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2012.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/92** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2015** PCT/US2015/042904

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016** WO16019140

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015** E 15827995 (0)

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** EP 3174991

---

④ Título: **Métodos, composiciones y kits para el análisis de lípidos complejos estructuralmente diversos**

⑩ Prioridad:

**30.07.2014 US 201462031099 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.09.2024**

⑦ Titular/es:

**METABOLON, INC. (100.0%)**  
617 Davis Drive, Suite 100  
Morrisville, NC 27560, US

⑦ Inventor/es:

**WATKINS, STEVEN**

⑦ Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 978 375 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

Métodos, composiciones y kits para el análisis de lípidos complejos estructuralmente diversos

5 Campo técnico

La materia dada a conocer en la presente memoria se refiere a métodos y composiciones para sintetizar y utilizar mezclas de lípidos complejos como patrones internos para el análisis de muestras biológicas y otras muestras que

10 Antecedentes

La utilización de un patrón interno para calibrar la concentración de un compuesto diana en una muestra es un método bien aceptado de cuantificación. En resumen, se añade un compuesto que no está presente en la muestra que debe someterse a ensayo que satisface dos criterios: (1) que el patrón interno actúe de manera similar al compuesto diana en todas las etapas de preparación de las muestras (p. ej., extracción, cromatografía, etc.), y que (2) sea indistinguible del compuesto diana mediante el método de detección de elección. De esta manera, en el caso de que se conozca la concentración del patrón interno añadido a la muestra y la respuesta relativa del detector (p. ej., la superficie del pico), tanto al compuesto diana como al patrón interno, puede calcularse la cantidad de compuesto diana que debía contener la muestra original.

20 Los lípidos en las muestras biológicas son dianas problemáticas para la cuantificación mediante un patrón interno debido a que presentan un abanico diversos de propiedades químicas, incluso dentro de una clase lipídica dada. Los lípidos también presentan complejidad combinatorial, por ejemplo varios de muchos ácidos grasos posibles se acilan en uno de entre una docena aproximadamente de esqueletos. De esta manera, un pequeño número de patrones internos no puede satisfacer el primero de los dos criterios anteriormente indicados. Generalmente, los analistas utilizan pocos compuestos de patrón interno, y la mayoría con frecuencia selecciona únicamente un solo compuesto para representar una amplia clase de lípidos (p. ej., fosfolípidos, lípidos neutros) para utilizarlos como un patrón interno. La elección del patrón para la amplia clase históricamente ha estado más relacionada con la ausencia del compuesto en muestras biológicas y la facilidad de síntesis del compuesto sintético que con la similitud del patrón a las propiedades químicas de los analitos diana. La mayoría de patrones internos lipídicos se construyen a partir de un solo ácido graso de cadena impar o de cadena corta (p. ej., PC12:0/12:0 o TAG17:0/17:0/17:0). La mayoría de mezclas de patrones internos utilizando un único patrón interno para la clase amplia de lípidos. Sin embargo, los enfoques actuales para desarrollar patrones internos son limitados, debido a que: 1) los ácidos grasos de cadena corta o los patrones internos ácido graso completamente saturados no actúan como los compuestos diana en el ensayo, y 2) resulta difícil representar la complejidad combinatorial de los lípidos utilizando estrategias simples de patrón interno.

25 Existe una necesidad de un conjunto estructuralmente diversos de patrones con propiedades químicas apropiadas para cada clase de lípidos para el uso como patrones internos. Dicho conjunto de patrones internos proporciona una amplia diversidad química y, de esta manera, una mejor cobertura para el análisis. Moore J. et al., Methods in Enzymo 432:351-67 (2007) se refiere a la cuantificación y estandarización de los patrones internos de lípidos para espectroscopía de masas.

30 Sumario

35 Basándose en la exposición contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona una composición para el uso como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos que comprenden una o más especies moleculares lipídicas presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de: un esqueleto lipídico que presenta un único ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en el que el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos, en el que la clase de lípidos consiste en fosfatidiletanolaminas o p-fosfatidiletanolaminas, en el que la primera posición es una posición sn-1 y la posición separada es una posición sn-2, o en el que la primera posición es una posición sn-2 y la posición separada es una posición sn-1, en donde el estearato-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio está presente en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada comprende: 9Z-octadecenoilo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoilo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoilo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoilo (20:3n6), 5Z,8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraenoilo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoilo (20:5n3), 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosapentaenoilo (22:5n3) y 4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosahexaenoilo (22:6n3); en donde la mezcla de ácidos grasos está presente del modo siguiente: 20 % de 18:1n9, 20 % de 18:2n6, 5 % de 18:3n3, 5 % de 20:3n6, 20 % de 20:4n6, 5 % de 20:5n3, 5 % de 22:5n3 y 20 % de 22:6n3.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares lipídicas presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en un esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación para una clase

de lípidos que presenta por lo menos dos grupos acilo, y unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico en una posición separada mediante una reacción de acilación, en el que la clase de lípidos consiste en fosfatidiletanolaminas o p-fosfatidiletanolaminas, en donde la primera posición es una posición sn-1 y la posición separada es una posición sn-2, o en donde la primera posición es una posición sn-2 y la posición separada es una posición sn-1, en donde el estearato-d9 marcado con deuterio (18:0-d9) está presente en la primera posición y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada comprende: 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3); en donde la mezcla de ácidos grasos está presente del modo siguiente: 20 % de 18:1n9, 20 % de 18:2n6, 5 % de 18:3n3, 5 % de 20:3n6, 20 % de 20:4n6, 5 % de 20:5n3, 5 % de 22:5n3 y 20 % de 22:6n3.

La presente invención y algunas realizaciones preferentes de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

### 16 Descripción detallada

La información técnica expuesta posteriormente puede, en algunos aspectos, ir más allá que el alcance de la invención, que se define exclusivamente mediante las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la presente invención en un contexto técnico más amplio y con el fin de ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Cualesquiera referencias incidentales a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y los métodos diagnósticos puestos en práctica en el cuerpo humano o animal no deben interpretarse como reivindicativos de protección de dichos métodos como tales, sino que por el contrario deben interpretarse como referidos a productos, en particular sustancias o composiciones, para el uso en cualquiera de dichos métodos.

En la presente memoria se describen métodos, kits y composiciones relacionados con patrones internos para el uso en el análisis de espectrometría de masas. Los lípidos complejos son clases de lípidos con un diverso abanico de ácidos grasos unidos a ellos. Se proporcionan en la presente memoria los métodos de síntesis y utilización de composiciones que incluyen mezclas de moléculas de lípidos como patrones internos con una composición suficientemente diversa para representar eficazmente los ácidos grasos de la clase o clases de lípidos complejos en muestras de interés. Los patrones internos se sintetizan para contener las características descritas en la presente memoria. Los patrones internos sintetizados seguidamente pueden envasarse en un kit y utilizarse para el análisis de lípidos. Los patrones internos lipídicos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier aplicación, incluyendo, por ejemplo, la espectrometría de masas.

En la presente memoria se da a conocer un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en un esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación para una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico en una posición separada mediante una reacción de acilación, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestras de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria se da a conocer, además, un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes a un esqueleto lipídico marcado isotópicamente en una única posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestras de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

En la presente memoria se da a conocer una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueletoto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es de una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en el que la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las

especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

5 En la presente memoria se da a conocer, además, una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isótropicas, en donde el esqueleto lipídico es de una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una única posición en el esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

10 15 En la presente memoria se da a conocer, además, un kit que comprende: i) una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos es representativa de la composición de especies moleculares de lípidos presente en cada una de la clase o clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isótropicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos grupos acilo, o un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isótropicas y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos en la muestra de interés, y ii) instrucciones para utilizar la mezcla o mezclas de moléculas de lípidos como el patrón interno para uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

20 25 30 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isótropicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.

35 40 45 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isótropicas, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición única del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.

50 55 60 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno representativo de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos marcados isótropicamente a un esqueletoto lipídico en una sola posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo; unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico isótropicamente marcado en una sola posición mediante una reacción de acilación; unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes a un

esqueleto lipídico marcado isotópicamente en una sola posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; o unir un solo ácido graso marcado isotópicamente a un esqueleto lipídico en una primera posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos y unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes a una posición separada en el esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestras de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

En la presente memoria se da a conocer, además, una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de: un esqueleto lipídico que presenta por lo menos dos ácidos grasos diferentes isotópicamente marcados en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; un esqueleto lipídico marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, o un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de líquidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos, en donde la mezcla de los dos o más ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

En la presente memoria se da a conocer, además, un kit que comprende: i) una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno, en donde una o más mezclas de moléculas de lípidos es representativa de la composición de especies moleculares de lípido presente en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de: un esqueleto lipídico que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes isotópicamente marcados en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; un esqueleto lipídico marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, o un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de líquidos que presenta por lo menos dos grupos acilo, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y ii) instrucciones para utilizar la mezcla o mezclas de moléculas de lípidos como el patrón interno para uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés.

En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, en donde el método comprende: i) añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde la composición comprende uno o más de: a) un esqueleto lipídico que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes marcados isotópicamente en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, b) un esqueleto de lípidos marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, o c) un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos en la muestra de interés, y ii) uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en cada una de la clase o clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés mediante la utilización de la composición que presenta la mezcla o mezclas representativas de moléculas de lípidos como un patrón interno.

Descripción de los dibujos

La fig. 1 es un esquema de un fosfolípido que muestra una estrategia general para producir patrones internos de fosfolípidos según la presente exposición.

5 La fig. 2A-2C muestra la estructura de los patrones internos de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés) según la presente exposición. (A) Palmitato deuterado (16:0) en la posición sn-1 y el ácido graso «R» en la posición sn-2, (B) el ácido graso de ejemplo oleato (18:1n9) en la posición s-2, y (C) diez ácidos grasos de ejemplo para la acilación en la posición sn-2.

10 La fig. 3 muestra la estructura de un patrón interno lisofosfatidilcolina (LPC, por sus siglas en inglés) según la presente exposición.

15 La fig. 4A-4C muestra la estructura de los patrones internos de fosfatidiletanolamina (PE, por sus siglas en inglés) según una o más realizaciones de la presente invención. (A) Ácido octadecanoico deuterado (18:0) en la posición sn-1 y el ácido graso «R» en la posición sn-2, (B) el ácido graso de ejemplo oleato (18:1n9) en la posición s-2, y (C) ocho ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2.

20 La fig. 5 muestra la estructura de un patrón interno lisofosfatidiletanolamina según la presente exposición.

25 La fig. 6A-6C muestra la estructura de los patrones internos de esfingomielina según la presente exposición. (A) Esfingosina marcada con deuterio en la primera posición y el ácido graso «R» en la posición sn-2, (B) el ácido graso de ejemplo palmitato (16:0) en la posición sn-2, y (C) cuatro ácidos grasos de ejemplo para la acilación en la posición sn-2.

30 La fig. 7A-7C muestra la estructura de los patrones internos de triacilglicerol según la presente exposición. (A) Palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1, oleato (18:1n9) en la posición sn-2 y el ácido graso «R» en la posición sn-3, (B) el ácido graso de ejemplo palmitato (16:0) en la posición sn-3 y (C) ocho ácidos grasos de ejemplo para la acilación en la posición sn-3.

35 La fig. 8A-8C muestra la estructura de los patrones internos de diacilglicerol según la presente exposición. (A) Palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y el ácido graso «R» en la posición sn-2, (B) el ácido graso de ejemplo palmitato (16:0) en la posición sn-2, y (C) ocho ácidos grasos de ejemplo para la acilación en la posición sn-2.

40 La fig. 9A-9C muestra la estructura de los patrones internos de éster de colesterol según la presente exposición. (A) marcas de deuterio en la posición n6, y el ácido graso «R» acilado en el grupo hidroxilo, (B) el ácido graso de ejemplo linoleato (18:2n6) acilado en el grupo hidroxilo, y (C) ocho ácidos grasos de ejemplo para la utilización en la acilación en el grupo hidroxilo.

45 La fig. 10A-10B muestra las estructuras de ácidos grasos libres de ejemplo según la presente exposición. (A) Palmitato deuterado y (B) 17:1n7 para la mezcla de patrones internos.

50 La fig. 11 es un gráfico que muestra las concentraciones reales de las especies de fosfatidilcolina indicadas en una muestra mixta de patrones internos no marcados en comparación con las concentraciones calculadas utilizando un patrón interno (PI) tradicional PC17:0/17:0 y una mezcla de PI de ejemplo según la presente exposición. Las concentraciones se expresan en % molar de la composición.

55 La fig. 12 es un gráfico que muestra la concentración calculada utilizando la mezcla de patrones internos y la precisión de los cálculos (en % de CV) para 15 muestras de suero humano según la presente exposición.

60 La fig. 13 muestra los diagramas de caja de la concentración total de la clase de lípidos de éster de colesterol (CE, por sus siglas en inglés), calculada utilizando la mezcla de patrones internos, para 15 muestras de suero humano analizadas por triplicado según la presente exposición.

65 La fig. 14 muestra los diagramas de caja de la concentración total de la clase de lípidos de triacilglicerol (TAG, por sus siglas en inglés), calculada utilizando la mezcla de patrones internos, para 15 muestras de suero humano analizadas por triplicado según la presente exposición.

70 La fig. 15A-15C son gráficos que muestran las concentraciones totales de las clases de lípidos de (A) éster de colesterol (CE) y (B) fosfatidilcolina (PC) calculadas utilizando un único patrón interno y múltiples patrones internos según la presente exposición, y la concentración total de (C) la clase de lípidos de fosfatidiletanolamina (PE) calculada utilizando un único patrón interno y múltiples patrones internos según una o más realizaciones de la presente invención.

La fig. 16 es un gráfico que muestra la cantidad relativa de los 22 ácidos grasos medidos en la clase de lípidos de éster de colesterol (CE) calculada utilizando un único patrón interno y múltiples patrones internos según la presente exposición.

5 La fig. 17A-17D muestra las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados de ejemplo en las clases de lípidos de fosfatidilcolina (PC) o éster de colesterol (CE) calculadas utilizando un solo patrón interno y múltiples patrones internos según la presente exposición. (A) PC20:5; (B) PC22:6 (C) CE40:4 y (D) CE20:5.

10 Descripción detallada adicional

Para los fines de mejorar nuestra comprensión de los principios de la presente exposición, a continuación se hace referencia a realizaciones preferentes y se utiliza lenguaje específico para la descripción de las mismas. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

15 Los lípidos son dianas problemáticas para la cuantificación mediante patrones internos debido a que presentan un abanico diverso de propiedades químicas, incluso dentro de una clase lipídica dada. Los lípidos también presentan complejidad combinatorial, por ejemplo varios de muchos ácidos grasos posibles se acilan en uno de entre una docena aproximadamente de esqueletos. De esta manera, un pequeño número de patrones internos no puede satisfacer el primero de los dos criterios anteriormente indicados. Lo que se necesita es una manera de preparar un juego de 20 patrones internos que (1) representa la diversidad química de los lípidos complejos y (2) crea una mezcla de dichos patrones en una abundancia relativa, que representa la composición esperada de lípidos en una muestra, que hace que los compuestos resulten útiles como patrones internos. La materia actualmente dada a conocer proporciona métodos y composiciones para patrones internos que son representativos de la diversidad química de lípidos complejos.

25 En la presente memoria se describen reactivos y kits para un conjunto estructuralmente diverso de patrones lipídicos con propiedades químicas y/o propiedades analíticas apropiadas para cada clase de lípidos. Con respecto a la nomenclatura para los «metabolitos lipídicos» de ácidos grasos (o que alternativamente se denominan en la presente memoria «moléculas lipídicas») utilizados en la presente memoria, los ácidos grasos etiquetados con el prefijo "CE", "DG", "FA", "PC", "PE", "LPC", "LPE", "O-PC", "P-PE", "SM", "TG" o "CER" se refieren a los ácidos grasos indicados presentes dentro de los ésteres de colesterol, diacilgliceroles (diglicéridos), ácidos grasos libres, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas unidas mediante 1-éter, fosfatidiletanoamilinas unidas mediante éter 1-vinílico (plasmalógenos), esfingomielinas, triacilgliceroles (triglicéridos) y ceramidas, respectivamente, en una muestra. Los componentes ácido graso indicados pueden cuantificarse como la proporción de los ácidos grasos totales dentro de la clase de lípidos indicada con el prefijo. Las referencias a ácidos grasos sin un prefijo u otra indicación de una clase particular de lípido generalmente indican ácidos grasos presentes dentro de los lípidos totales en una muestra. El término "LC" después de un prefijo "CE", "DG", "FA", "PC", "PE", "LPC", "LPE", "O-PC", "P-PE", "SM", "TG", o "CER" se refiere a la cantidad de la clase de lípidos totales indicada por el prefijo en la muestra (p. ej., la concentración de lípidos de esa clase expresada como nmoles por gramo de suero o plasma). 30 Por ejemplo, con respecto a una medida tomada en plasma o suero, la abreviatura «PC 18:2n6» indica el porcentaje de fosfatidilcolina en plasma o suero que comprende ácido linoleico (18:2n6) y el término «TGLC» indica la cantidad absoluta (p. ej., en nmoles por gramo) de triglicérido presente en plasma o suero. "MUFA", "PUFA" y "SFA" se refieren a ácido graso monoinsaturado, ácido graso poliinsaturado y ácido graso saturado, respectivamente.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, «esqueleto lipídico» es refiere a la parte de la molécula de lípido que excluye los grupos ácido graso o grupos acilo. Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones «ácidos grasos» y «grupos acilo» se utilizan intercambiablemente. Tal como se utiliza en la presente memoria, «especies moleculares de lípidos» o «especies moleculares» se refiere a una molécula de lípido que comprende un grupo ácido graso o acilo específico unido a un esqueleto lipídico específico (p. ej., PC 18:2n6, CE 16:1n6, etc.).

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, «marcado isotópicamente» se refiere a un patrón interno o cualquier parte de un patrón interno marcado para la determinación utilizando cualquier fracción adecuada (p. ej., deuterio (2H, 13C, 15N)). Cualquier átomo o cualquier número de átomos del patrón interno puede marcarse con el isótopo. Por ejemplo, el isótopo puede ser deuterio, y el patrón interno puede contener 9 átomos de deuterio. En otro ejemplo, el isótopo puede ser deuterio y el patrón interno puede contener 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 o 31 átomos de deuterio.

45 Un uso de los métodos descritos en la presente memoria es para calibrar o ayudar a calibrar instrumentos de espectrometría de masas o múltiples instrumentos de espectrometría de masas que operan en tandem (es decir, una «plataforma»). En un ejemplo, se requieren dos tipos de calibración: uno para las concentraciones de clase de lípido y uno para la composición de ácidos grasos de la clase. Los resultados de la calibración de una plataforma pueden calibrarse computacionalmente utilizando las muestras de control o en comparación con una base de datos cuantitativa de los resultados.

50 Los métodos descritos en la presente memoria para generar una mezcla de patrones internos pueden aplicarse a cualquier lípido o clase de lípidos. La expresión «clase de lípidos» tal como se utiliza en la presente memoria pretende referirse a una clase de lípidos que incluye, por ejemplo, triacilgliceroles, diacilgliceroles, ésteres de colesterol, ácidos

- grasos libres, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilsérina, lisofosfatidilsérina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, lisofosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, CDP-diacilglicerol, liso CDP-diacilglicerol, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera, diésteres de cera y 1-monoacilglicerol. Los triacilgliceroles, diacilgliceroles, ésteres de colesterol, ácidos grasos libres se utilizan ampliamente como lípidos neutros. La fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilsérina, lisofosfatidilsérina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, lisofosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, CDP-diacilglicerol, liso CDP-diacilglicerol se utilizan ampliamente como fosfolípidos.
- La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las referencias a clases de lípidos diferentes de fosfatidiletanolaminas o p-fosfatidiletanolaminas se proporcionan para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados únicamente.
- La mezcla de patrón interno puede incluir un fosfolípido, en el que cada grupo de cabeza del fosfolípido (es decir, PE) contiene a) un ácido graso marcado isotópicamente en el que el ácido graso marcado isotópicamente se encuentra en la posición sn-1 o sn-2, y b) una mezcla acilada de ácidos grasos, en la que la mezcla acilada de ácidos grasos se encuentra en una posición separada (es decir, la posición no ocupada por el ácido graso marcado isotópicamente) y en la que la mezcla acilada de ácidos grasos aproxima la concentración de ácidos grasos en el lípido complejo diana.
- En un ejemplo, el ácido graso marcado isotópicamente es un ácido graso saturado, y la mezcla acilada de ácidos grasos es una mezcla predefinida de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados. En un ejemplo, el ácido graso saturado isotópicamente marcada es palmitato (16:0) en la posición sn-1, y la mezcla acilada de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados es una mezcla predefinida en la posición sn-2. En un ejemplo, la mezcla acilada comprende ácidos grasos insaturados. En un ejemplo, el fosfolípido es lisofosfatidilcolina y el grupo de cabeza de fosfolípido contiene palmitato marcado isotópicamente (16:0) en la posición sn-1. En otro ejemplo, el fosfolípido es lisofosfatidiletanolamina y el grupo de cabeza de fosfolípido contiene estearato marcado isotópicamente (18:0) en la posición sn-1. El método para producir la mezcla de ácidos grasos es el siguiente: 1) determinar la concentración de ácidos grasos en el tipo de muestra dado, la concentración puede ya ser conocida o puede determinarse a partir del análisis de la composición de ácidos grasos, 2) seleccionar un ácido graso de uno o más grados de insaturación representativos (p. ej., monoeno, dieno, trieno, tetraeno, pentano y hexeno), en el que se selecciona el ácido graso más abundante en la clase de lípidos; 3) basado en la concentración del ácido graso en el tipo de muestra, asignar cada ácido graso en la mezcla a abundancia «alta» o «baja», 4) asignar un valor de porcentaje de la mezcla correspondiente a la abundancia alta y baja (p. ej., un ácido graso con abundancia «alta» comprendería 20 % de la mezcla y un ácido graso con abundancia «baja» comprendería 5 %), y 5) para el porcentaje restante de la mezcla, determinar los ácidos grasos más abundante entre los ácidos grasos insaturados y asignar una abundancia alta o baja tal como se ha indicado anteriormente para completar la mezcla.
- La mezcla de patrones internos puede incluir un fosfolípido en el que el grupo de cabeza de cada clase de fosfolípido (p. ej., PC, PE, SM) contiene: a) un ácido graso no marcado, en el que el ácido graso no marcado se encuentra en la posición sn-1 o sn-2, y b) un MUFA o PUFA, en el que el MUFA o PUFA se encuentra en la posición no ocupada por el ácido graso no marcado. En un ejemplo, el grupo de cabeza contiene: a) un ácido graso saturado de cadena impar no marcado, en el que el ácido graso saturado de cadena impar no marcado se encuentra en la posición sn-1, y b) un MUFA o PUFA de cadena impar, en el que el MUFA o PUFA de cadena impar se encuentra en la posición sn-2.
- La mezcla de patrones internos puede incluir lípidos neutros, en donde los lípidos neutros incluyen mezclas de MUFA o MUFA de cadena impar marcados isotópicamente (p.ej., 17:1, 19:1, etc.).
- Un análisis cuantitativo de ácidos grasos puede determinar la composición exacta de la mezcla de patrones internos. En un ejemplo para los fosfolípidos, la posición sn-1 de cada grupo de cabeza de fosfolípido está completamente marcado con un ácido graso saturado con una sola deuteración (p. ej., d16:0); por lo tanto, el resto de los ácidos grasos están presentes en la posición sn-2. La ecuación es la siguiente:  $1 = A/X + B/X + C/X, \text{ etc.}$ , en donde X es el porcentaje de ácidos grasos saturados con una sola deuteración en la mezcla; donde A, B, C, etc. son ácidos grasos en la mezcla, y donde el porcentaje de los ácidos grasos A, B, C, etc. en la mezcla de patrones internos es conocido en relación con X. Además,  $A/X = \text{cantidad de la mezcla que comprende A}$ . Por ejemplo, en el caso de que la composición de la mezcla de patrones internos para PC según se determina mediante análisis de FAME es: d16:0 - 50 %, 18:1n9 - 10 %, 18:2n6 - 20 % y 20:4n6 - 20 %, entonces  $1 = (0,1/0,5) + (0,2/0,5) + (0,2/0,5) + 0,1/0,5 = 0,2$ ;  $0,2/0,5 = 0,4$  y  $0,2/0,5 = 0,4$ , entonces la mezcla comprende 20 % de PCd16:0/18:1n9, 40 % de PCd16:0/18:2n6 y 40 % de PCd16:0/20:4n6.
- Un ácido graso libre es un tipo de lípido neutro que puede formar parte de la mezcla de patrones internos. El ácido graso libre puede ser cualquier ácido graso libre, incluyendo, por ejemplo, un solo ácido graso de cadena impar (p. ej., 17:1, 17:2, 17:0) y/o un ácido graso marcado isotópicamente (p. ej., 16:0, 16:1, 17:0). El ácido graso libre puede ser un MUFA o el ácido graso puede ser un PUFA.
- Un éster de colesterol es un tipo de lípido neutro que puede formar parte de la mezcla de patrones internos. El éster de colesterol puede ser cualquier éster de colesterol, incluyendo, por ejemplo, un éster de colesterol que comprende

una molécula de colesterol marcado, esterificado con una mezcla de ácidos grasos que representa la composición esperada de ésteres de colesterilo en la muestra (ver la Tabla 1).

Los diacilgliceroles son un tipo de lípido neutro que puede formar parte de la mezcla de patrones internos. El diacilglicerol puede ser cualquier diacilglicerol, incluyendo, por ejemplo, un solo ácido graso de cadena impar o un ácido graso marcado isotópicamente. Los cadenas de ácido graso del diacilglicerol pueden contener: a) un ácido graso marcado isotópicamente en el que el ácido graso marcado isotópicamente se encuentra en la posición sn-1 o sn-2 (una primera posición, y b) una mezcla acilada de ácidos grasos, en la que la mezcla acilada de ácidos grasos se encuentra en una posición separada (es decir, la posición no ocupada por el ácido graso marcado isotópicamente). En un ejemplo, el ácido graso marcado isotópicamente es un ácido graso saturado. En un ejemplo, el ácido graso marcado isotópicamente es palmitato (16:0) en la primera posición y la mezcla acilada de ácidos grasos se encuentra en una posición separada y puede comprender 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3. En un ejemplo, el ácido graso marcado isotópicamente es palmitato (16:0) en la primera posición y la mezcla acilada de ácidos grasos en la posición separada es una mezcla de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados. En otro ejemplo, las cadenas de ácidos grasos del diacilglicerol en la mezcla de patrones internos puede contener: a) un ácido graso saturado de cadena impar no marcado, en el que el ácido graso saturado de cadena impar no marcado se encuentra en la primera posición, y b) un MUFA o PUFA de cadena impar en el que el MUFA o PUFA de cadena impar se encuentra en la posición separada. El diacilglicerol en la mezcla de patrones internos puede utilizar múltiples patrones internos homogéneos (p. ej., DG17:0/17:0 y DG17:1/17:1).

Un triacilglicerol es un tipo de lípido neutro que puede formar parte de la mezcla de patrones internos. El triacilglicerol puede ser cualquier triacilglicerol incluyendo, por ejemplo, una mezcla de ácido graso de cadena impar y/o un ácido graso marcado isotópicamente para producir un patrón mixto. Las cadenas de ácido graso del triacilglicerol pueden contener: a) un ácido graso marcado en una posición, b) un ácido graso no marcado en una posición separada, y c) una mezcla acilada de ácidos grasos en otra posición separada. En un ejemplo, el ácido graso marcado puede ser un ácido graso saturado, y el ácido graso no marcado puede ser un ácido graso insaturado. En un ejemplo, el marcaje puede ser un marcaje de deuterio. En un ejemplo, las cadenas de ácido graso del triacilglicerol en la mezcla de patrones internos contienen: a) palmitato (16:0) marcado isotópicamente en una posición (p. ej., la posición sn-1), b) oleato (18:1n9) en una posición separada, o segunda (p. ej., la posición sn-2) y c) una mezcla acilada de ácidos grasos en otra posición separada, o tercera (p. ej., la posición sn-3). La mezcla acilada de ácidos grasos en la tercera posición (p. ej., sn-3) puede comprender, por ejemplo, 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6 y 22:6n3.

La mezcla de patrones internos puede comprender: a) clase de lípidos de fosfatidilcolina con palmitato (16:0) marcado isotópicamente en la posición sn-1 y una mezcla de MUFA y PUFA en la posición sn-2, b) clase de lípidos de fosfatidiletanolamina con palmitato (16:0) o estearato (18:0) marcado isotópicamente en la posición sn-1, y una mezcla de MUFA y PUFA en la posición sn-2, c) clase de lípidos de lisofosfatidilcolina con palmitato (16:0) marcado isotópicamente en la posición sn-1, d) clase de lípidos de lisofosfatidiletanolamina con palmitato (16:0) o estearato (18:0) marcado isotópicamente en la posición sn-1, e) clase de lípidos de esfingomielina con un esqueleto esfingoide marcado isotópicamente y una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-2, f) clase de lípidos de triacilglicerol con palmitato marcado isotópicamente en la posición sn-1, oleato no marcado (u otro ácido graso) en la posición sn-2, y una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-3, g) clase de lípidos de éster de colesterilo con grupo de cabeza de colesterol marcado isotópicamente acilado en una mezcla de ácidos grasos, h) clase de lípidos de diacilglicerol con palmitato (16:0) marcado isotópicamente en la posición sn-1 y una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-2, i) clase de lípidos de ácido graso libre con ácidos grasos marcados isotópicamente o 15:1 o 17:1, y/o j) clases de lípidos de ceramida con un esqueleto esfingolípido marcado isotópicamente y una mezcla de ácidos grasos apropiada a la clase de ceramida.

En un ejemplo, la clase de lípidos de ceramida puede comprender los esqueletos esfingolípido siguientes: esfingosina, dihidroesfingosina, fitoestesfingosina o 6-hidroxiesfingosina.

Los reactivos indicados en la presente memoria pueden combinarse como un artículo fabricado, por ejemplo, como un kit.

Los lípidos complejos se categorizan en clases; cada clase está definida por la fracción de grupo de cabeza en el lípido (p. ej., PC presenta un grupo de cabeza fosfocolina; CE presenta un grupo de cabeza colesterol). En una clase de lípidos, existen muchas especies moleculares que están definidas por los ácidos grasos que están unidos al grupo de cabeza. Debido a que los ácidos grasos presentan diversas estructuras químicas, cada clase de lípidos comprende un gran número de diversos componentes que resultan en diferentes especies moleculares de lípidos. Para cuantificar una clase de lípidos,

se necesita cuantificada cada una de dichas especies moleculares y sumarlas con precisión.

en contraste con las estrategias lipidómicas tradicionales que utilizan habitualmente únicamente un solo patrón interno por cada clase amplia de lípidos (p. ej., fosfolípidos), en la presente memoria se proporcionan métodos para sintetizar patrones internos que contienen una mezcla de ácidos grasos (hasta 10 ácidos grasos por clase de lípidos). En los métodos, los ácidos grasos en la mezcla de patrones internos (mezcla PI) se seleccionan para que representen la diversidad de estructuras químicas (especies moleculares de lípidos) presentes en las clases de lípidos presentes en

el tipo de muestra que va a analizarse. La Tabla 1 muestra la concentración de cada ácido graso medido para cada clase de lípidos correspondiente según los métodos de la presente exposición, y los ácidos grasos restantes en cada clase de lípidos se asignaron al análogo de patrón interno más próximo y se asignaron a ese valor medido; la concentración total de cada clase de lípidos se calculó mediante la adición de los valores (medidos y asignados) de todas las especies moleculares para esa clase de lípidos.

En la presente memoria se dan a conocer patrones internos para cada una de las 10 clases de lípidos según la composición de ácidos grasos mostrada en la Tabla 1. Las clases de lípidos para los patrones internos se muestran en la primera fila de la Tabla 1 y los grupos «R» de ácido graso se enumeran en la columna 1 de la Tabla 1. En la Tabla 1, «d» se refiere a la adición de un marcaje de deuterio. Por ejemplo, 16:0-d9 se refiere a palmitato con 9 átomos de deuterio añadidos.

La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

15 Tabla 1. Composición de mezcla de ácidos grasos para sintetizar patrones internos de lípidos

	PC	O-PC	LPC	PE	P-PE	LPE	TG	DG	CE	SM
R	16:0-d9/R	O-16:0-d9/R	16:0-d9	18:0-d9/R	P-18:0-d9/R	18:0-d9	16:0-d9/18:1n9/R	16:0-d9/R	CE-d6/R	18:1n9-d9/R
d	-	-	100 %	-	-	100 %	-	-	-	-
FA14:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FA16:0	-	-	-	-	-	-	20 %	20 %	5 %	25 %
FA18:0	-	-	-	-	-	-	20 %	20 %	-	-
FA24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 %
FA16:1n7	5 %	5 %	-	-	-	-	-	-	5 %	-
FA18:1n9	20 %	20 %	-	20 %	20 %	-	20 %	20 %	20 %	25 %
FA24:1n9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25 %
FA18:2n6	20 %	20 %	-	20 %	20 %	-	20 %	20 %	50 %	-
FA18:3n3	5 %	5 %	-	5 %	5 %	-	5 %	5 %	-	-
FA20:3n6	5 %	5 %	-	5 %	5 %	-	5 %	-	5 %	-
FA20:4n6	20 %	20 %	-	20 %	20 %	-	5 %	5 %	5 %	-
FA20:5n3	5 %	5 %	-	5 %	5 %	-	-	5 %	5 %	-
FA22:4n6	5 %	5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
FA22:5n3	5 %	5 %	-	5 %	5 %	-	-	-	-	-
FA22:6n3	10 %	10 %	-	20 %	20 %	-	5 %	5 %	5 %	-
FA17:1n7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suma	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Recuento	10	10	1	8	8	1	8	8	8	4

En la presente memoria se dan a conocer componentes de patrón interno de ejemplo para fosfatidilcolina y o-fosfatidilcolina, y la composición de ácidos grasos en la posición sn-2 (ácidos grasos sn-2) para dichos patrones internos se muestran en la Tabla 2. Las estructuras de fosfatidilcolina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 2. La estructura de fosfatidilcolina con palmitato deuterado (16:0) en la posición sn-1 y un ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 2A. La estructura de la fosfatidilcolina con palmitato deuterado (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-1 se muestra en la fig. 2B. Las estructuras de diez ácidos grasos (16:1n7, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3, 22:4n6, 22:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina se muestran en la fig. 2C.

25 Tabla 2. Composición de ácidos grasos sn-2 para los patrones internos de fosfatidilcolina y o-fosfatidilcolina.

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
16:1n7	5 %	PC (16:0-d9/16:1n7)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-hexadecenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
18:1n9	20 %	PC (16:0-d9/18:1n9)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
18:2n6	20 %	PC (16:0-d9/18:2n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z,12Z-octadecadienoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
18:3n3	5 %	PC (16:0-d9/18:3n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
20:3n6	5 %	PC (16:0-d9/20:3n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina

(continuación)

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
20:4n6	20 %	PC (16:0-d9/20:4n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
20:5n3	5 %	PC (16:0-d9/20:5n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
22:4n6	5 %	PC (16:0-d9/22:4n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
22:5n3	5 %	PC (16:0-d9/22:5n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina
22:6n3	10 %	PC (16:0-d9/22:6n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoíl)-sn-glicero-3-fosfocolina

Se dan a conocer patrones internos de ejemplo para los patrones internos de lisofosfatidilcolina y la estructura se muestran en la fig. 3.

Para los patrones internos de fosfatidiletanolamina y p-fosfatidiletanolamina de la invención, se enumera la composición de ácidos grasos sn-2 en la Tabla 3. Las estructuras de fosfatidiletanolamina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 4. La estructura de fosfatidiletanolamina con estearato deuterado (18:0) en la posición sn-1 y un ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 4A. La estructura de la fosfatidiletanolamina con estearato deuterado (18:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 4B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la fosfatidiletanolamina se muestran en la fig. 4C.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos sn-2 para los patrones internos de fosfatidiletanolamina y p-fosfatidiletanolamina

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
18:1n9	20 %	PE (18:0-d9/18:1n9)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
18:2n6	20 %	PE (18:0-d9/18:2n6)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(9Z,12Z-octadecadienoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
18:3n3	5 %	PE (18:0-d9/18:3n3)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(9Z, 12Z, 15Z-octadecatrienoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
20:3n6	5 %	PE (18:0-d9/20:3n6)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
20:4n6	20 %	PE (18:0-d9/20:4n6)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
20:5n3	5 %	PE (18:0-d9/20:5n3)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
22:5n3	5 %	PE (18:0-d9/22:5n3)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
22:6n3	20 %	PE (18:0-d9/22:6n3)	1-(octadecanoíl-d9)-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoíl)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

En una realización, se proporcionan patrones internos de ejemplo para la lisofosfatidiletanolamina y la estructura en la fig. 5.

En la presente memoria se dan a conocer patrones internos de ejemplo para la esfingomielina y la composición de ácidos grasos se muestra en la Tabla 4. Las estructuras de esfingomielina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 6. La estructura de esfingomielina con esfingosina marcada con deuterio en la primera posición y el ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 6A. La estructura de la esfingomielina con esfingosina marcada con deuterio en la primera posición y palmitato (16:0), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 6B. Las estructuras de cuatro ácidos grasos (16:0, 18:1n9, 24:0, 24:1n9) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la esfingomielina se muestran en la fig. 6C.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos para el patrón interno de esfingomielina

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
16:0	25 %	SM (18:1n9-d9/16:0)	N-(hexadecanoíl)-(esfing-d9)-4-enín-1-fosfocolina
18:1n9	25 %	SM (18:1n9-d9/18:1n9)	N-(9Z-octadecenoíl)-(esfing-d9)-4-enín-1-fosfocolina

(continuación)

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
24:0	25 %	SM (18:1n9-d9/24:0)	N-(tetracosanoíl)-(esfing-d9)-4-enín-1-fosfocolina
24:1n9	25 %	SM (18:1n9-d9/24:1n9)	N-(15Z-tetracosanoíl)-(esfing-d9)-4-enín-1-fosfocolina

En la presente memoria se dan a conocer patrones internos de ejemplo para triacilglicerol y la composición de ácidos grasos sn-3 se enumera en la Tabla 5. Las estructuras de triacilglicerol y los ácidos grasos sn-3 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 7. La estructura de triacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9) en la posición sn-2, y el ácido graso «R» en la posición sn-3 se muestra en la fig. 7A. La estructura de triacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9) en la posición sn-2, y el ácido graso «R» como ácido graso de ejemplo en la posición sn-3 se muestra en la fig. 7B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para el marcaje de la posición sn-3 de triacilglicerol se muestran en la fig. 7C.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos sn-3 para el patrón interno de triacilglicerol

AG-sn3	%	ID	Nombre sistemático
16:0	20 %	TG (16:0-d9/18:1n9/16:0)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-hexadecanoíl-sn-glicerol
18:0	20 %	TG (16:0-d9/18:1n9/18:0)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-octadecanoíl-sn-glicerol
18:1n9	20 %	TG (16:0-d9/18:1n9/18:1n9)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(9Z-octadecenoíl)-sn-glicerol
18:2n6	20 %	TG (16:0-d9/18:1n9/18:2n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(9Z,12Z-octadecadienoíl)-sn-glicerol
18:3n3	5 %	TG (16:0-d9/18:1n9/18:3n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoíl)-sn-glicerol
20:3n6	5 %	TG (16:0-d9/18:1n9/20:3n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoíl)-sn-glicerol
20:4n6	5 %	TG (16:0-d9/18:1n9/20:4n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoíl)-sn-glicerol
22:6n3	5 %	TG (16:0-d9/18:1n9/22:6n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoíl)-sn-glicerol

En la presente memoria se dan a conocer patrones internos de ejemplo para diacilglicerol y la composición de ácidos grasos sn-2 se enumera en la Tabla 6. Las estructuras de diacilglicerol y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 8. La estructura de diacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y un ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 8A. La estructura de diacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1, y palmitato (16:0), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 8B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:4n6, 20:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para el marcaje de la posición sn-2 de diacilglicerol se muestran en la fig. 8C.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos sn-2 para el patrón interno de diacilglicerol

AG-sn2	%	ID	Nombre sistemático
16:0	20 %	DG (16:0-d9/16:0)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-hexadecanoíl-sn-glicerol
18:0	20 %	DG (16:0-d9/18:0)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-octadecanoíl-sn-glicerol
18:1n9	20 %	DG (16:0-d9/18:1n9)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z-octadecenoíl)-sn-glicerol
18:2n6	20 %	DG (16:0-d9/18:2n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z,12Z-octadecadienoíl)-sn-glicerol
18:3n3	5 %	DG (16:0-d9/18:3n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoíl)-sn-glicerol
20:4n6	5 %	DG (16:0-d9/20:4n6)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoíl)-sn-glicerol
20:5n3	5 %	DG (16:0-d9/20:5n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoíl)-sn-glicerol
22:6n3	5 %	DG (16:0-d9/22:6n3)	1-(hexadecanoíl-d9)-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoíl)-sn-glicerol

En la presente memoria se dan a conocer patrones internos de ejemplo para éster de colesterol y la composición de ácidos grasos se muestra en la Tabla 7. Las estructuras de éster de colesterol y los ácidos grasos comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 9. La estructura de éster de colesterol con marcaje de deuterio en la posición n6 y el ácido graso «R» acilado en el grupo hidroxilo se muestra en la fig. 9A. La estructura de éster de colesterol con marcas de deuterio en la posición n6 y linoleato (18:2n6), como el ácido graso de ejemplo, acilado en el grupo hidroxilo se muestra en la fig. 9B. La estructura de ocho ácidos grasos (16:0, 16:1n7, 18:1n9, 18:2n6, 20:3n6, 20:4n6,

20:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la utilización en la acilación del grupo hidroxilo del éster de colesterol se muestra en la fig. 9C.

5 Tabla 7. Composición de ácidos grasos para el patrón interno de éster de colesterol

Ácido graso	%	ID	Nombre sistemático
16:0	5 %	CE-d6/16:0	hexadecanoato de colest-5-en-3B-il-d6
16:1n7	5 %	CE-d6/16:1n7	(9Z-hexadecenoato) de colest-5-en-3B-il-d6
18:1n9	20 %	CE-d6/18:1n9	(9Z-octadecenoato) de colest-5-en-3B-il-d6
18:2n6	50 %	CE-d6/18:2n6	(9Z,12Z-octadecadienoato) de colest-5-en-3B-il-d6
20:3n6	5 %	CE-d6/20:3n6	(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoato) de colest-5-en-3B-il-d6
20:4n6	5 %	CE-d6/20:4n6	(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoato) de colest-5-en-3B-il-d6
20:5n3	5 %	CE-d6/20:5n3	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoato) de colest-5-en-3B-il-d6
22:6n3	5 %	CE-d6/22:6n3	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoato) de colest-5-en-3B-il-d6

10 En la presente memoria se dan a conocer patrones internos de ejemplo para ácidos grasos libres y la composición de ácidos grasos se enumeran en la Tabla 8. Las estructuras de los ácidos grasos libres comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 10. La estructura del ácido graso libre palmitato (16:0) con marcas de deuterio se muestra en la fig. 10A. La estructura del ácido graso libre 17:1n7 se muestra en la fig. 10B.

15 Tabla 8. Composición de patrón interno de ácido graso libre

%	ID	Nombre sistemático
50 %	AG 16:0-d9	Ácido hexadónico-d9
50 %	AG 17:1n7	Ácido 10Z-heptadecenoico

## 18 Métodos para generar patrones internos de lípidos

20 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno representativo de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende uno o más de: unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos marcados isotópicamente a un esqueleto lipídico en una sola posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo; unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico isotópicamente marcado en una sola posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; o unir un solo ácido graso marcado isotópicamente a un esqueleto lipídico en una primera posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos y unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes a una posición separada en el esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La clase de lípidos correspondiente puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, 1-monoacilglicerol, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, CDP-diacilglicerol, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

25 En la presente memoria se da a conocer un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en un esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación para una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico en una posición separada mediante una reacción de acilación, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestras de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las moléculas de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. En el método, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo pueden incluir triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-

fosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, CDP-diacilglicerol, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria se da a conocer, además, un método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde el método comprende: unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes a un esqueleto lipídico marcado isotópicamente en una única posición mediante una reacción de acilación para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestras de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las moléculas de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. En el método, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos un grupo acilo puede comprender triacilgliceroles, diacilgliceroles, 1-monoacilglicerol, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, ésteres de colesterilo, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, CDP-diacilglicerol, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En los métodos proporcionados anteriormente, la muestra de interés puede ser una mezcla compleja que comprende moléculas de lípidos, una muestra biológica, tal como una muestra vegetal o una muestra animal. La muestra animal puede ser de un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un primate no humano, un conejo u otro mamífero, o una muestra de no mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra de pez cebra. La muestra biológica de interés puede incluir sangre, plasma, suero, fracción lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo, una muestra de tejido, una muestra celular o una muestra de piel.

En los métodos proporcionados anteriormente, los métodos pueden incluir, además, la realización de un análisis cuantitativo de ácidos grasos para cuantificar la cantidad de cada uno de los ácidos grasos en la mezcla.

En los métodos proporcionados anteriormente, el ácido graso puede ser un ácido graso saturado.

En los métodos proporcionados anteriormente, el marcaje isotópico puede incluir cualquier marcaje isotópico, incluyendo  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ . En la invención, el marcaje isotópico es un marcaje de deuterio d9.

La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-1. La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-1 y la posición separada en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-2 o una posición sn-3. Alternativamente, la primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-2. La primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o una posición sn-3. La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-3. La primera posición puede ser una posición sn-3 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-2.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo puede consistir en fosfatidilcolinas u o-fosfatidilcolinas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un hexadecanoílo-d9 (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender 9Z-hexadecenoílo (16:1n7), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoílo (22:4n6), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición sn-2 puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 2.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo puede consistir en fosfatidiletanolaminas y p-fosfatidiletanolaminas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un octadecanoílo-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-

octadecatrienoilo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoilo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoilo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoilo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoilo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoilo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 3.

La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo pueden consistir en esfingomielinas, en las que la esfingosina marcada con deuterio puede estar presente en la primera posición, y en la que la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender hexadecanoilo (16:0), 9Z-octadecenoilo (18:1n9), tetracosanoilo (24:0) y 15Z-tetracosenoilo (24:1n9). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 4.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo puede consistir en diacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede encontrarse presente palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender hexadecanoilo (16:0), octadecanoilo (18:0), 9Z-octadecenoilo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoilo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoilo (18:3n3), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoilo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoilo (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoilo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 6.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos dos grupos acilo pueden consistir en triacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-3 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-2, en donde puede encontrarse presente palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, en donde puede encontrarse presente oleato (18:1n9) en una posición separada, en donde la mezcla de ácidos grasos en otra posición separada puede comprender hexadecanoilo (16:0), octadecanoilo (18:0), 9Z-octadecenoilo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoilo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoilo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoilo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoilo (20:4n6) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoilo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 5.

En los métodos proporcionados anteriormente, la clase o clases de lípidos que presentan por lo menos un grupo acilo puede consistir en ésteres de colesterol, en donde la posición única puede ser un grupo hidroxilo, y en donde la mezcla de ácidos grasos unidos al grupo hidroxilo puede comprender hexadecanoato (16:0), 9Z-hexadecenoato (16:1n7), 9Z-octadecenoato (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoato (18:2n6), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoato (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoato (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoato (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoato (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en el grupo hidroxilo puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 7.

#### Composiciones para la utilización como patrones internos de lípidos

En la presente memoria se da a conocer, además, una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de: un esqueleto lipídico que presenta por lo menos dos ácidos grasos diferentes isotópicamente marcados en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; un esqueleto lipídico marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, o un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de líquidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos, en donde la mezcla de los dos o más ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La clase de lípidos correspondiente puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, 1-monoacilglicerol, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, CDP-diacilglicerol, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos

enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

- 5 En la presente memoria se da a conocer una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípido comprende: un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es de una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en el que la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. En la composición, la clase de lípidos puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, CDP-diacilglicerol, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.
- 10 25 En la presente memoria se da a conocer, además, una composición para la utilización como un patrón interno que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos representativos de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípido comprende: un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isotópicos, en donde el esqueleto lipídico es de una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una única posición en el esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. En la composición, la clase de lípido puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, 1-monoacilglicerol, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, CDP-diacilglicerol, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera o diésteres de cera. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.
- 15 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 En los métodos proporcionados anteriormente, la muestra de interés puede ser una mezcla compleja que comprende moléculas de lípidos, una muestra biológica, tal como una muestra vegetal o una muestra animal. La muestra animal puede ser de un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un primate no humano, un conejo u otro mamífero, o una muestra de no mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra de pez cebra. La muestra biológica de interés puede incluir sangre, plasma, suero, fracción lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo, una muestra de tejido, una muestra celular o una muestra de piel.
- 85 En las composiciones proporcionadas anteriormente, el marcaje isotópico puede incluir cualquier marcaje isotópico, incluyendo  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ . En la invención, el marcaje isotópico es un marcaje de deuterio d9.
- 90 En las composiciones proporcionadas anteriormente, el ácido graso puede ser un ácido graso saturado.
- 95 En las composiciones proporcionadas anteriormente, la primera posición en el esqueletoto lipídico puede ser una posición sn-1. La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-1 y la posición separada en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-2 o una posición sn-3. Alternativamente, la primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-2. La primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o una posición sn-3. La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-3. La primera posición puede ser una posición sn-3 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-2.
- 100 En los métodos proporcionados anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en fosfatidilcolinas u o-fosfatidilcolinas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una

posición sn-1, en donde puede estar presente un hexadecanoílo-d9 (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender 9Z-hexadecenoílo (16:1n7), 9Z-hexadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoílo (22:4n6), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 2.

En las composiciones proporcionadas anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en fosfatidiletanolaminas y p-fosfatidiletanolaminas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un octadecanoílo-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 3. La presente invención se define tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En las composiciones proporcionadas anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en esfingomielinas, en las que la esfingosina marcada con deuterio puede estar presente en la primera posición, y en la que la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), tetracosanoílo (24:0) y 15Z-tetracosenoílo (24:1n9). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 4.

En las composiciones proporcionadas anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en diacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede encontrarse presente palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), octadecanoílo (18:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 6.

En las composiciones proporcionadas anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en triacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-3 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-2, en donde puede encontrarse presente palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, en donde puede encontrarse presente oleato (18:1n9) en una posición sn-2, y en donde la mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), octadecanoílo (18:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 5.

En las composiciones proporcionadas anteriormente, una de las clases de lípidos puede consistir en ésteres de colesterol, en donde la posición única puede ser un grupo hidroxilo, y en donde la mezcla de ácidos grasos unidos al grupo hidroxilo puede comprender hexadecanoato (16:0), 9Z-hexadecenoato (16:1n7), 9Z-octadecenoato (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoato (18:2n6), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoato (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoato (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoato (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoato (22:6n3). La mezcla de ácidos grasos en el grupo hidroxilo puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 7.

#### Métodos para la detección y cuantificación de moléculas de lípidos en muestras de interés

En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, en donde el método comprende: i) añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde la composición comprende uno o más de: a) un esqueleto lipídico que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes marcados isotópicamente en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, b) un esqueleto de lípidos marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, o c) un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes

en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos ácidos grasos, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y ii) uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en cada una de la clase o clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés mediante la utilización de la composición que presenta la mezcla o mezclas representativas de moléculas de lípidos como un patrón interno.

- 10 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia del ácido graso en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.
- 15 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isotópicos, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una sola posición del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.
- 20 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isotópicas, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una sola posición del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.
- 25 En la presente memoria se da a conocer, además, un método para uno de detectar y cuantificar las moléculas de lípidos presentes en una muestra de interés, que comprende: añadir a una muestra de interés una cantidad conocida de una composición que presenta una o más mezclas de moléculas lipídicas representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: i) un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isotópicas, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, y ii) una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una sola posición del esqueleto lipídico, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que ocurren en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés mediante la utilización de la mezcla representativa de moléculas de lípidos como un patrón interno.

30 El método de detección y/o cuantificación de las especies moleculares de lípidos presentes en la muestra de interés puede incluir uno o una combinación de espectrometría de masas (EM), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), HPLC isocrática, HPLC de gradiente, cromatografía de fase normal, HPLC de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, microfluidos, cromatografía, cromatografía de gases (CG), cromatografía de capa fina (CCF) y combinaciones de los mismos. El método para la detección y/o la cuantificación de las especies moleculares de lípido presentes en la muestra biológica pueden incluir la utilización de espectrometría de masas (EM).

35 En el método de detección y/o cuantificación de las especies moleculares de lípido presentes en la muestra de interés, la muestra de interés puede ser una mezcla compleja que comprende moléculas de lípidos, una muestra biológico, tal como una muestra vegetal o una muestra animal. La muestra animal puede ser de un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un primate no humano, un conejo u otro mamífero, o una muestra de no mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra de pez cebra. La muestra biológica de interés puede incluir sangre, plasma, suero, fracción lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo, una muestra de tejido, una muestra celular o una muestra de piel.

40 En el método de detección y/o cuantificación de las especies moleculares de lípidos presentes en la muestra de interés, la mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípidos puede incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. La mezcla o mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípido pueden incluir una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

45 Kit

50 Generalmente, los kits de la presente exposición incluyen uno o más patrones internos e instrucciones de utilización de los patrones internos para detectar y/o cuantificar lípidos en la muestra de interés. El kit puede incluir, además, una o más muestras de control y receptáculos de recolección de muestras. Las composiciones de patrones internos dentro de un kit pueden envasarse juntas en diversas combinaciones de una o más clases de lípidos pueden envasarse en

viales o recipientes separados. Un kit puede incluir etiquetas y/o impresos en el envase que expongan instrucciones para la preparación y uso, receptáculos de recolección de especímenes, un recipiente de transporte y/o un embalaje para el envío. Entre los componentes de kit adicionales en envases separados pueden incluirse tampones y otros reactivos para la detección y/o cuantificación de lípidos en la muestra de interés.

El kit puede comprender una o más mezclas de patrones internos. El kit puede contener una mezcla de patrones internos que comprende ácidos grasos marcados isotópicamente, en donde hay por lo menos un ácido graso marcado isotópicamente de cada clase de lípidos en la muestra de interés. El kit puede contener un juego de patrones internos que comprende las clases de lípidos y los ácidos grasos marcados isotópicamente presentados en la Tabla 1. Los ácidos grasos marcados isotópicamente en el juego de patrones internos están presentes en las proporciones indicadas en la Tabla 1.

El kit puede comprender, además, un recipiente volumétrico. El recipiente volumétrico puede ser cualquier recipiente (es decir, una taza, vial, tubo de microcentrifugación, placa de microtitulación, etc.) adecuado para contener una muestra líquida. El recipiente volumétrico puede contener opcionalmente marcas volumétricas que pueden resultar útiles para medir una cantidad deseada de la muestra u otros reactivos. El recipiente volumétrico puede estar realizado en cualquier material (p. ej., plástico, aluminio, acero inoxidable). El volumen interno del recipiente volumétrico depende del tipo de muestra que vaya a recogerse. El recipiente volumétrico puede incluir un cuerpo y un tapón. El material del patrón interno puede etiquetarse en el tapón. El material del patrón interno puede utilizarse para recubrir el volumen interno del cuerpo del recipiente volumétrico.

El recipiente volumétrico puede configurarse adicionalmente para el tipo de recolección de muestra contemplado y utilizado para la recolección del espécimen. En otros aspectos, se proporciona por separado en el kit un receptáculo de recolección de especímenes, y puede presentar la forma de una taza, vial o tubo de microcentrifugación.

El kit puede comprender opcionalmente un recipiente para el transporte. El recipiente para el transporte puede ser cualquier estructura adecuada para el transporte de muestras. El recipiente está configurado de manera que el material de muestra pueda empaquetarse en el recipiente y el recipiente pueda sellarse.

El kit puede incluir opcionalmente una solución de extracción.

En la presente memoria se da a conocer un kit que comprende: i) una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno, en donde una o más mezclas de moléculas de lípidos son representativas de la composición de especies moleculares de lípido presente en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de: un esqueleto lipídico que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes isotópicamente marcados en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo; un esqueleto lipídico marcado isotópicamente que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos un grupo acilo, o un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos grupos acilo, en donde la mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y ii) instrucciones para utilizar la mezcla o mezclas de moléculas de lípidos como el patrón interno para uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La clase de lípidos correspondiente puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, 1-monoacilglicerol, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilsérrina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, CDP-diacilglicerol, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, ceramida, lactosilceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, ésteres de cera o diésteres de cera.

En la presente memoria se da a conocer un kit que comprende: i) una o más mezclas de moléculas de lípidos para la utilización como un patrón interno, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos es representativa de la composición de especies moleculares de lípidos presente en cada una de la clase o clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende: un esqueleto lipídico que presenta un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una posición separada en el esqueletoto lipídico, en donde el esqueletoto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos dos grupos acilo, o un esqueleto lipídico que presenta uno o más marcas isotópicas y una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes presentes en una sola posición en el esqueleto lipídico, en donde el esqueleto lipídico es para una clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo, en donde la mezcla de ácidos grasos es representativa de los ácidos grasos que se encuentran en la

clase de lípidos en la muestra de interés, y en donde cada uno de los ácidos grasos en la mezcla está presente en una proporción representativa de la proporción de ocurrencia de los ácidos grasos en las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés, y ii) instrucciones para utilizar la mezcla o mezclas de moléculas de lípidos como el patrón interno para uno de detectar y cuantificar las especies moleculares de lípidos presentes en la clase de lípidos correspondiente en la muestra de interés. La clase de lípidos que presenta por lo menos dos grupos acilo puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, CDP-diacilglicerol, ceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido o diésteres de cera. La clase de lípidos que presenta por lo menos un grupo acilo puede incluir uno o más de triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos, fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, p-fosfatidiletanolamina, esfingomielina, cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, CDP-diacilglicerol, ceramida, glucosilceramida, fitoceramida, 6-hidroxiceramida, cerebrósido, gangliósido, diésteres de cera, ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, ésteres de cera y 1-monoacilglicerol.

Los kits pueden incluir dos o más de las mezclas de las moléculas de lípidos representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en dos o más de las clases de lípidos correspondientes en la muestra de interés. Las dos o más mezclas de las moléculas de lípidos pueden envasarse como un único componente. Las dos o más mezclas de las moléculas de lípidos pueden envasarse como componentes separados.

Los kits pueden incluir, además, reactivos para la detección y cuantificación.

Los kits pueden incluir, además, una muestra de control que presenta una concentración conocida de la composición de las especies moleculares de lípidos.

Los kits pueden incluir, además, una mezcla de ácidos grasos libres para la utilización como un patrón interno que es representativo de la composición de ácidos grasos libres en la muestra de interés. Los ácidos grasos libres para la utilización en el kit pueden comprender los ácidos grasos libres mostrados en la Tabla 8.

En los kits, la muestra de interés puede ser una mezcla compleja que comprende moléculas de lípidos, una muestra biológica, tal como una muestra vegetal o una muestra animal. La muestra animal puede ser de un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un primate no humano, un conejo u otro mamífero, o una muestra de no mamífero, tal como, por ejemplo, una muestra de pez cebra. La muestra biológica de interés puede incluir sangre, plasma, suero, fracción lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo, una muestra de tejido, una muestra celular o una muestra de piel.

En los kits, el ácido graso puede ser un ácido graso saturado.

En los kits, el marcaje isotópico puede incluir <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C o <sup>15</sup>N.

En los kits, las mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípidos pueden incluir las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en una o más de las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En los kits, las mezclas de ácidos grasos en cada mezcla o mezclas de moléculas de lípidos pueden consistir en una o más de las mezclas de especies moleculares de lípidos enumeradas en una o más de las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

En el kit, la primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-1. La primera posición en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-1 y la posición separada en el esqueleto lipídico puede ser una posición sn-2 o una posición sn-3.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en fosfatidilcolinas u o-fosfatidilcolinas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un hexadecanoilo-d9 (16:0-d9) en la primera posición, y en donde la mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede comprender 9Z-hexadecenoilo (16:1n7), 9Z-octadecenoilo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoilo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoilo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoilo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoilo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoilo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoilo (22:4n6), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoilo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoilo (22:6n3). La mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 2.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en fosfatidiletanolaminas y p-fosfatidiletanolaminas, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un octadecanoilo-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede comprender 9Z-octadecenoilo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoilo

(18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3), 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 3.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en esfingomielinas, en las que la esfingosina marcada con deuterio puede estar presente en la primera posición, y en donde la mezcla de ácidos grados en la posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), tetracosanoílo (24:0) y 15Z-tetracosenoílo (24:1n9). La mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 4.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en diacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1, en donde puede estar presente un palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, y en donde la mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), octadecanoílo (18:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 6.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en triacilgliceroles, en donde la primera posición puede ser una posición sn-1 y la posición separada puede ser una posición sn-2 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-2 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-3, o en donde la primera posición puede ser una posición sn-3 y la posición separada puede ser una posición sn-1 o sn-2, en donde puede encontrarse presente palmitato (16:0-d9) marcado con deuterio en la primera posición, en donde puede encontrarse presente oleato (18:1n9) en una posición separada, en donde la mezcla de ácidos grados en otra posición separada puede comprender hexadecanoílo (16:0), octadecanoílo (18:0), 9Z-octadecenoílo (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6), 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3). La mezcla de grupos ácido graso en la posición separada puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 5.

En el kit, una de las clases de lípidos puede comprender ésteres de colesterol, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, liso CDP-diacilglicerol, ésteres de cera o 1-monoacilglicerol.

En el kit, una de las clases de lípidos puede consistir en ésteres de colesterol, en donde la posición única es un grupo hidroxilo, y en donde la mezcla de grupos acilo unidos al grupo hidroxilo puede comprender hexadecanoato (16:0), 9Z-hexadecenoato (16:1n7), 9Z-octadecenoato (18:1n9), 9Z,12Z-octadecadienoato (18:2n6), 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoato (20:3n6), 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoato (20:4n6), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoato (20:5n3) y 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoato (22:6n3). La mezcla de grupos acilo en el grupo hidroxilo puede estar presente en las proporciones mostradas en la Tabla 7.

#### Métodos de medición de moléculas de lípidos

Pueden llevarse a cabo ensayos para el contenido de metabolitos de lípidos o moléculas de lípidos en cualquier tipo de muestra, incluyendo, por ejemplo, una muestra de líquido corporal (p. ej., sangre, plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR)), una muestra de tejido, una muestra celular, una muestra de piel, una solución, una mezcla compleja, células en cultivo *in vitro* y medios de cultivo celular. En algunas realizaciones, las cantidades de las moléculas de lípidos se determinaron en una o más muestras seleccionadas del grupo que consiste en mezclas complejas de lípidos, sangre, plasma, suero, fracción aislada de lipoproteínas, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo. En algunas realizaciones, los ensayos pueden llevarse a cabo en sangre completa, plasma, suero o fracciones de lipoproteína aisladas. En algunas realizaciones, la muestra o muestras son de plasma o suero.

En algunas realizaciones, se miden múltiples moléculas de lípidos diferentes en la misma muestra. En otras realizaciones, se mide cada una de las múltiples moléculas de lípidos a partir de una muestra diferente. En el caso de que se utilicen múltiples muestras, las muestras pueden ser de los mismos líquidos corporales o de diferentes líquidos corporales del sujeto.

Las moléculas de lípidos y otros biomarcadores pueden aislarse y/o cuantificarse fácilmente mediante métodos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, métodos que utilizan: espectrometría de masas (EM), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC isocrática, HPLC de gradiente, cromatografía de fase normal, HPLC de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, microfluidos, cromatografía, cromatografía de gases (CG), cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de afinidad iónica con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), cromatografía de afinidad, inmunoensayos y/o ensayos colorimétricos. En algunas realizaciones, los métodos de la invención utilizan la EM para determinar el contenido de moléculas de lípidos.

Para el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés), los lípidos se extrajeron mediante el método de Folch et al. (J. Biol. Chem. 226:497-509) utilizando cloroformo:metanol (2:1 v/v). Se separaron los lípidos neutros de los lípidos polares mediante cromatografía en fase sólida. La fracción de lípidos polares se separó en clases individuales de lípidos utilizando un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 110 Series y las fracciones de clase de lípidos se recogieron para el análisis de ácidos grasos. Se separaron los lípidos neutros en clases individuales de lípidos mediante cromatografía de capa fina utilizando un sistema de solventes que consistía en éter de petróleo/éter dietílico/ácido acético (80:20:1) y las fracciones de clase de lípidos se recogieron para el análisis de ácidos grasos. Se transesterificó cada clase de lípidos en ácido sulfúrico al 1 % en metanol en un vial sellado bajo una atmósfera de nitrógeno a 100 °C durante 45 minutos. Los ésteres metílicos de ácido graso resultantes se extrajeron de la mezcla con hexano que contenía hidroxitolueno butilado al 0,05 % y se prepararon para el análisis de CG mediante sellado de los extractos en hexano bajo nitrógeno. Se separaron los ésteres metílicos de ácido graso y se cuantificaron mediante CG capilar (CG Agilent Technologies 6890 Series) dotado de una columna capilar DB 88 de 30 m (Agilent Technologies) y un detector de ionización de llama.

Los diversos métodos analíticos son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en mayor detalle en los documentos siguientes:

EM: Cyr D, et al. A GCIMS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma: an analytical tool for tyrosinemia type I. *J. Chromatogr. B Analyt. Techno.* Biomed. Life Sci., 2006 Feb 17;832(1):24- 9; Vogeser M. Abstract Liquid chromatography-tandem mass spectrometry--application in the clinical laboratory. *Clin. Chern. Lab. Med.*, 2003 Feb;41(2):117-26. HPLC: Khalil PN, et al., Validation and application of a high-performance liquid chromatographic-based assay for determination of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in erythrocytes. *J. Chromatogr. B Analyt. Techno.* Biomed. Life Sci., 2006 May 23; Fouassier M., et al. Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [C]-serotonin release assay; *J. Thromb. Haemost.*, 2006 May;4(5): 1136-9; Badiou S., et al. Determination of plasma amino acids by fluorescent derivatization and reversed-phase liquid chromatographic separation. *Clin. Lab.* 2004;50(3-4): 153-8; Brunelli T, et al., Comparison of three methods for total homocysteine plasma determination. *Clin. Lab.* 2001;47(7-8):393-7. CE: Zinelli A., et al., Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV -detection. *J. Sep. Sci.*, 2006 Mar;29(5):704-8; Jabeen R., et al. Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. *Electrophoresis*, 2006 May 23; Gao P., et al., Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by a combination of monoclonal antibody-coated latex and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006 May;27(9):1784-9. Microfluidics: Johannessen EA, et al., A suspended membrane nanocalorimeter for ultralow volume bioanalysis. *IEEE Trans. Nanobioscience*, 2002 Mar;1(1):29-36; Herrmann M., et al., Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA; *Lab Chip*. 2006 April; 6(4):555-60. Publicación electrónica: 3 de marzo de 2006; Yang S., et al., Blood plasma separation in microfluidic channels using flow rate control. *ASAIO J.*, 2005 Sep-Oct;51 (5):585-90; Dupuy AM, et al., Protein biochip systems for the clinical laboratory; *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005;43{12):1291-302. Cromatografía: Paterson S., et al. Validation of techniques to detect illicit heroin use in patients prescribed pharmaceutical heroin for the management of opioid dependence. *Addiction*. 2005 Dec; 100(12): 1832-9; Bottcher M., et al., Evaluation of buprenorphine CEDIA assay versus GC-MS and ELISA using urine samples from patients in substitution treatment. *J. Anal. Toxicol.*, 2005 Nov-Dic;29(8):769-76; Julak J., Chromatographic analysis in bacteriologic diagnostics of blood cultures, exudates, and bronchoalveolar lavages. *Prague Med. Rep.* 2005; 106(2): 175-94; Boettcher M, et al., Precision and comparability of Abuscreen OnLine assays for drugs of abuse screening in urine on Hitachi 917 with other immunochemical tests and with GC/MS. *Clin. Lab.* 2000;46(1-2):49-52. Inmunoensayos: Boettcher M, et al., Precision and comparability of Abuscreen OnLine assays for drugs of abuse screening in urine on Hitachi 917 with other immunochemical tests and with GC/MS. *Clin. Lab.* 2000;46(1-2):49-52; Westermann J., et al., Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. *Clin. Lab.* 2002;48(1-2):61-71; Aoyagi K, et al., Performance of a conventional enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen in the early phases of hepatitis C infection. *Clin. Lab.* 2001;47(3-4): 119-27; Hub I W, et al., A multi-center quality control study of different CA 15-3 immunoassays. *Clin. Lab.* 2005;51 (11-12):641-5; Haller CA, et al., Comparison of an automated and point-of-care immunoassay to GC-MS for urine oxycodone testing in the clinical laboratory. *J. Anal. Toxicol.* 2006 Mar;30(2): 106-11; Bayer M, et al., Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of neopterin. *Clin. Lab.* 2005 ;51 (9-10):495-504; Groche D, et al., Standardization of two immunological HbA 1 c routine assays according to the new IFCC reference method. *Clin. Lab.* 2003;49(11-12):657-6 1; Ivan O, et al.; German KIMS Board. Applicability of recently established reference values for serum insulin-like growth factor I: A comparison of two assays: an (automated) chemiluminescence immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Lab.* 2005;51(7-8):381-7. Ensayos colorimétricos: Kramer KA, et al., Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. *Clin. Chem.*, 2005 Nov;51(11):2110-6; Groche D, et al. Standardization of two immunological HbA 1 c routine assays according to the new IFCC reference method. *Clin. Lab.* 2003;49(11-12):657-61; WolfPL. History of diagnostic enzymology: A review of significant investigations. *Clin. Chim. Acta.* 2006 Mar 24.

La plataforma analítica TRUEMASS también puede utilizarse para los métodos de la invención. TRUEMASS es una plataforma analítica que puede utilizarse para obtener datos cuantitativos a partir de una muestra en aproximadamente 400 metabolitos individuales implicados en el metabolismo lipídico estructural y energético, tal como el metabolismo

de triglicéridos, ésteres de colesterol y de fosfolípidos. Dicha plataforma resulta útil para el perfilado de enfermedades, ya que los lípidos estructurales y energéticos son componentes centrales del metabolismo y están integrados en prácticamente todos los procesos biológicos en el organismo. Un conjunto de datos para una muestra, por ejemplo una muestra de plasma, suero u otra muestra biológica, comprende la medición cuantitativa del colesterol libre y los ácidos grasos siguientes: fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, liso-fosfatidilcolinas, triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol. 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 14:1n5, 16:1n7, t16:1n7, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, t18:2n6, 18:3n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:1n9, 20:2n6, 20:3n9, 20:3n6, 20:4n6, 20:3n3, 20:4n3, 20:5n3, 22:1n9, 22:2n6, 22:4n6, 22:5n3, 22:6n3, 24:1n9, 24:6n3 y derivados de plasmalógeno de 16:0, 18:0, 18:1n9 y 18:1n7. Los métodos de utilización de TRUEMASS son conocidos por el experto en la materia y también se describen en los documentos siguientes: solicitud de patente US n.º 11/296.829 (presentada el 12/6/05); Mutch DM et al., An integrative metabolism approach identifies stearoyl-CoA desaturase as a target for an arachidonate-enriched diet. FASEB J., abril de 2005; 19(6):599-601. Publicación electrónica: 24 de enero de 2005; Stone SJ, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. J. Biol. Chem., 2004 Mar 19;279(12):11767-76; Watkins SM, et al., Phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase activity and dietary choline regulate liver-plasma lipid flux and essential fatty acid metabolism in mice. J Nutr., 2003 Nov; 133(11):3386-91; Watkins SM, et al., Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone. 37:73-117, 1998; 2002 Nov; 43(11):1809-17.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no a título limitativo.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1. Composición sintética de mezclas de patrones internos.

25 En contraste con las estrategias lipidómicas tradicionales que utilizan habitualmente únicamente un solo patrón interno por cada clase amplia de lípidos (p. ej., fosfolípidos), en la presente memoria se proporcionan patrones internos que contienen una mezcla de ácidos grasos (hasta 10 ácidos grasos por clase de lípidos). Los ácidos grasos en la mezcla de patrones internos (mezcla de PI) se seleccionan para que representen la diversidad de estructuras químicas (especies moleculares de lípidos) presentes en las clases de lípidos presentes en el tipo de muestra que va a analizarse. La concentración de cada ácido graso presentada en la Tabla 1 se midió para cada clase de lípidos y todos los ácidos grasos restantes en cada clase de lípido se asignaron al análogo de patrón interno más próximo y se asignaron a ese valor medido; la concentración total de cada clase de lípidos se calculó mediante la adición de los valores (medidos y asignados) de todas las especies moleculares para esa clase de lípidos.

35 Los patrones internos para cada una de las 10 clases de lípidos se sintetizaron según la composición de ácidos grasos mostrada en la Tabla 1. Las clases de lípidos para los patrones internos se muestran en la primera fila de la Tabla 1 y los grupos «R» de ácido graso se enumeran en la columna 1 de la Tabla 1. En la Tabla 1, «d» se refiere a la adición de un marcaje de deuterio. Por ejemplo, 16:0-d9 se refiere a palmitato con 9 átomos de deuterio añadidos.

### 40 Ejemplo 2. Síntesis y descripción de patrones internos y mezclas de los mismos

45 Se sintetizaron patrones internos de fosfolípido de ejemplo para fosfatidilcolina, o-fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y p-fosfatidiletanolamina partiendo de un grupo de cabeza fosfato de glicerol y acilando palmitato (16:0) marcado con deuterio en la posición sn-1, y acilando una mezcla de ácidos grasos insaturados en la posición sn-2. La estrategia de marcaje para los fosfolípidos fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina se representa en la fig. 1.

50 Para los componentes de patrón interno de ejemplo fosfatidilcolina y o-fosfatidilcolina, se muestra la composición de ácidos grasos en la posición sn-2 (ácidos grasos sn-2) en la Tabla 2. Las estructuras de fosfatidilcolina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 2. La estructura de fosfatidilcolina con palmitato deuterado (16:0) en la posición sn-1 y un ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 2A. La estructura de la fosfatidilcolina con palmitato deuterado (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-1 se muestra en la fig. 2B. Las estructuras de diez ácidos grasos (16:1n7, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3, 22:4n6, 22:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina se muestran en la fig. 2C.

55 Se sintetizaron patrones internos de lisofosfatidilcolina de ejemplo partiendo del grupo de cabeza de fosfolípido y acilando palmitato (16:0) marcado con deuterio. Se muestra la estructura en la fig. 1. 3.

60 Para los patrones internos de fosfatidiletanolamina y p-fosfatidiletanolamina de la invención, se enumera la composición de ácidos grasos sn-2 en la Tabla 3. Las estructuras de fosfatidiletanolamina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 4. La estructura de fosfatidiletanolamina con estearato deuterado (18:0) en la posición sn-1 y el ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 4A. La estructura de la fosfatidiletanolamina con estearato deuterado (18:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 4B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la fosfatidiletanolamina se muestran en la fig. 4C.

Se sintetizaron patrones internos de lisofosfatidiletanolamina de ejemplo partiendo del grupo de cabeza de fosfolípido y acilando estearato (18:0) marcado con deuterio. Se muestra la estructura en la fig. 1. 5.

Se sintetizaron patrones internos de esfingomielina partiendo de un grupo de cabeza de fosfocolina, acilando una esfingosina marcada con deuterio en la posición sn-1 y acilando una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-2. La mezcla acilada de ácidos grasos en la posición sn-2 puede comprender, por ejemplo, 16:0, 18:1n9, 24:0 y 24:1n9.

Para el componente patrón interno de ejemplo, la esfingomielina, se muestra la composición de ácidos grasos en la Tabla 4. Las estructuras de esfingomielina y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 6. La estructura de esfingomielina con esfingosina marcada con deuterio en la primera posición y el ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 6A. La estructura de la esfingomielina con esfingosina marcada con deuterio en la primera posición y palmitato (16:0), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 6B. Las estructuras de cuatro ácidos grasos (16:0, 18:1n9, 24:0, 24:1n9) en la mezcla de ácidos grasos para la acilación en la posición sn-2 de la esfingomielina se muestran en la fig. 6C.

Se sintetizaron patrones internos de triacilglicerol partiendo de un esqueleto diacilglicerol, acilando palmitato (16:0) marcado con deuterio en la posición sn-1, acilando oleato (18:1n9) en la posición sn-2 y acilando una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-3. La mezcla acilada de ácidos grasos en la posición sn-3 puede comprender, por ejemplo, 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6 y 22:6n3.

Para el componente patrón interno de ejemplo, el triacilglicerol, la composición de ácidos grasos sn-3 se enumera en la Tabla 5. Las estructuras de triacilglicerol y los ácidos grasos sn-3 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 7. La estructura de triacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9) en la posición sn-2, y el ácido graso «R» en la posición sn-3 se muestra en la fig. 7A. La estructura de triacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y oleato (18:1n9) en la posición sn-2, y el ácido graso «R» como ácido graso de ejemplo en la posición sn-3 se muestra en la fig. 7B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:3n6, 20:4n6, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para el marcaje de la posición sn-3 de triacilglicerol se muestran en la fig. 7C.

Se sintetizaron los patrones internos de diacilglicerol partiendo de un esqueleto glicerol, acilando palmitato (16:0) marcado con deuterio en la posición sn-1, y acilando una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-2. La mezcla acilada de ácidos grasos en la posición sn-2 puede comprender, por ejemplo, 16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3.

Por ejemplo, para el diacilglicerol, la composición de ácidos grasos sn-2 se muestra en la Tabla 6. Las estructuras de diacilglicerol y los ácidos grasos sn-2 comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 8. La estructura de diacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1 y un ácido graso, denotado por «R», en la posición sn-2 se muestra en la fig. 8A. La estructura de diacilglicerol con palmitato marcado con deuterio (16:0) en la posición sn-1, y palmitato (16:0), como ácido graso de ejemplo, en la posición sn-2 se muestra en la fig. 8B. Las estructuras de ocho ácidos grasos (16:0, 18:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:3n3, 20:4n6, 20:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para el marcaje de la posición sn-2 de diacilglicerol se muestran en la fig. 8C.

Se sintetizaron los patrones internos de éster de colesterilo de ejemplo partiendo de un esqueleto colesterol, acilando marcas de deuterio en la posición n6, y acilando una mezcla de ácidos grasos en el grupo hidroxilo. La mezcla acilada de ácidos grasos en el grupo hidroxilo puede comprender, por ejemplo, 16:0, 16:1n7, 18:1n9, 18:2n6, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3.

Por ejemplo, para el éster de colesterilo, la composición de ácidos grasos se muestra en la Tabla 7. Las estructuras de éster de colesterilo y los ácidos grasos comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 9. La estructura de éster de colesterilo con marcaje de deuterio en la posición n6 y el ácido graso «R» acilado en el grupo hidroxilo se muestra en la fig. 9A. La estructura de éster de colesterilo con marcas de deuterio en la posición n6 y linoleato (18:2n6), como el ácido graso de ejemplo, acilado en el grupo hidroxilo se muestra en la fig. 9B. La estructura de ocho ácidos grasos (16:0, 16:1n7, 18:1n9, 18:2n6, 20:3n6, 20:4n6, 20:5n3, 22:6n3) en la mezcla de ácidos grasos para la utilización en la acilación del grupo hidroxilo del éster de colesterilo se muestra en la fig. 9C.

Los patrones internos de ácido graso libre se produjeron mediante síntesis de una mezcla 50:50 que consiste en 50 % de ácido graso marcado con deuterio y 50 % de ácido graso de una sola cadena impar. El ácido graso marcado con deuterio puede ser, por ejemplo, palmitato (16:0) y el ácido graso de cadena impar puede ser, por ejemplo, 17:1n7.

Por ejemplo, para los ácidos grasos libres, la composición de ácidos grasos se enumeran en la Tabla 8. Las estructuras de los ácidos grasos libres comprendidos en la mezcla se muestran en la fig. 10. La estructura del ácido graso libre palmitato (16:0) con marcas de deuterio se muestra en la fig. 10A. La estructura del ácido graso libre 17:1n7 se muestra en la fig. 10B.

Ejemplo 3. Validación y evaluación del rendimiento de mezclas de patrones internos de lípidos.

Se extrajeron los lípidos de muestras utilizando un procedimiento de extracción con metanol:diclorometano. Se añadieron patrones estándares en diclorometano:metanol (50:50) a la solución de extracto, seguido de una serie de etapas de centrifugación y recuperación de la capa del fondo. Las alícuotas agrupadas de la capa del fondo se concentraron bajo nitrógeno y se reconstituyeron en 0,25 ml de acetato amónico 10 mM diclorometano:metanol (50:50). Los extractos se transfirieron a insertos y se introdujeron en viales para el análisis mediante EM por infusión. Se llevó a cabo el análisis de EM por infusión en un aparato de CL Shimadzu con nanotubos de PEEK combinados con Sciex Selexon y 5500 QTRAP. Las muestras se analizaron mediante electropulverización en modo positivo y negativo. El escaneo de 5500 QTRAP se llevó a cabo en modo MRM (monitorización de reacciones múltiples) con el total de +1100 MRM, incluyendo los patrones internos

Se sintetizó una mezcla de ejemplo de patrones internos que contenía los componentes indicados en la Tabla 9, y la mezcla sintética de patrones internos se evaluó para determinar las concentraciones y pureza de la mezcla. Se informó que las mezclas de patrones marcados y no marcados eran 10,3 mg/ml. Se determinaron las concentraciones reales de los patrones internos en la mezcla basándose en resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis cuantitativo de ácidos grasos; los resultados de dichos dos análisis estaban a menos de 2 % unos de otros. La columna 2 de la Tabla 9 indica la concentración diana para cada componente patrón interno de la mezcla, y las columnas 3 y 4 de la Tabla 9 muestran la concentración real para cada componente indicado. La columna 3 muestra la concentración obtenida para los patrones marcados y la columna 4 muestra la concentración obtenida para los patrones no marcados. Un análisis completo de los ácidos grasos en las muestras determinó que la mezcla de patrones internos presentaba una pureza >99 %.

Tabla 9. Composición de una mezcla de ejemplo de patrones internos.

Componente	Concentración diana	Concentración real (marcados)	Concentración real (no marcados)
PCd16:0/16:1	5 %	5,7 %	5,7 %
PCd16:0/18:1	20 %	17,9 %	18,1 %
PCd16:0/18:2	20 %	20,9 %	20,0 %
PCd16:0/18:3	5 %	5,7 %	6,0 %
PCd16:0/20:3	5 %	4,6 %	4,5 %
PCd16:0/20:4	20 %	19,7 %	19,2 %
PCd16:0/20:5	5 %	5,2 %	4,3 %
PCd16:0/22:4	5 %	4,1 %	4,9 %
PCd16:0/22:5	5 %	5,3 %	5,6 %
PCd16:0/22:6	10 %	11,0 %	11,7 %

El rendimiento de las mezclas de ejemplo de patrones internos marcados y no marcados se evaluó para determinar si la presencia del marcaje causaba un desplazamiento en el tiempo de retención cromatográfico. Los patrones marcados no desplazaron sustancialmente el tiempo de retención en comparación con los análogos no marcados.

El rendimiento de cuantificación de las mezclas de patrones internos marcados y no marcados se evaluó experimentalmente en una solución de patrones no marcados y en suero. Se extrajeron los lípidos a partir de una muestra de mezcla de patrones internos no marcados y una muestra de suero, cada uno en la presencia de una mezcla de patrones internos marcados y PC17:0/17:0 (un patrón interno lipodómico tradicional). Las muestras se extrajeron cinco veces para producir un total de diez muestras (5 de suero y 5 de mezcla de patrones no marcados). Los lípidos extraídos de las muestras se analizaron utilizando los métodos descritos. La concentración de cada especie de fosfatidilcolina se calculó en nmoles por ml de material de partida. Se calcularon las concentraciones utilizando tanto la mezcla de patrones internos como el patrón interno tradicional PC17:0/17:0. En suero, la precisión determinada mediante el cálculo de la CV analítica era de 20 % y 11 % para el PI tradicional PC17:0/17:0 y la mezcla de PI, respectivamente. En muestras de la mezcla de patrones internos no marcados, la precisión global determinada mediante el cálculo de la CV analítica era de 11 % y 3 % para el PI tradicional PC17:0/17:0 y la mezcla de PI, respectivamente.

La composición en % molar para los ácidos grasos se calculó utilizando la mezcla de PI y el PI tradicional, y se comparó con la concentración real de los ácidos grasos en la muestra. Los valores calculados que se obtuvieron con la mezcla de PI eran más próximos a los valores reales que aquellos valores calculados utilizando el PI tradicional. Los resultados se presentan gráficamente en la fig. 11.

#### Ejemplo 4. Evaluación de la mezcla de patrones internos en muestras humanas.

Con el fin de evaluar el rendimiento de cuantificación de la mezcla de patrones internos, las especies moleculares de lípidos en 15 muestras de suero humano, por triplicado, se midieron utilizando la mezcla de patrones internos descrita en la Tabla 1. Se extrajeron los lípidos de las muestras de suero en la presencia de la mezcla de patrones internos marcados y se analizaron los extractos de lípidos utilizando los métodos descritos. La concentración media de cada una de las 1.100 especies moleculares de lípidos en las muestras por triplicado se calculó utilizando la mezcla de

5 patrones internos y se determinó la precisión mediante el cálculo de la CV analítica. La concentración media y los valores de CV para las 15 muestras por triplicado se representaron gráficamente para la totalidad de las 1.100 especies moleculares de lípidos medidas. El gráfico de dispersión que muestra la relación entre el % de CV y la concentración de especies moleculares de lípidos se representa gráficamente en la fig. 12. La CV era inferior para las especies moleculares de lípidos a las concentraciones más altas; sin embargo, se obtuvieron CV de tan solo 10 % para determinadas especies moleculares a concentraciones muy bajas (p. ej., 0,001  $\mu$ M).

10 La concentración media de la clase de lípido CE de todas las muestras de suero era de 3676,72 y la CV media era de 1,22 %. Estos resultados se presentan en formato de gráfico de cajas en la fig. 13. La señal, que es la proporción entre la concentración de la clase de lípido CE en las muestras de suero y en los blancos, era de 1729,02. La concentración media de la clase de lípido TAG era de 4105,8 y la CV media era de 2,79 %. Estos resultados se presentan en formato de gráfico de cajas en la fig. 14. La señal para la clase de lípido TAG era de 1348,33.

15 En otro ejemplo, el rendimiento de la mezcla de patrones internos en comparación con el patrón interno tradicional se evaluó en 25 muestras de plasma humano. Utilizando los métodos descritos en la presente memoria y la composición de patrones internos descrita en la Tabla 1, se calculó la composición de ácidos grasos de tres clases de lípido de ejemplo (CE, PC y PE). Estos resultados se compararon con los cálculos realizados utilizando el método tradicional de un solo patrón interno por clase de lípidos y también se compararon con valores cuantitativos.

20 20 Para la cuantificación utilizando un solo patrón interno para cada clase de lípidos (método tradicional), se utilizó el patrón interno dCE(16:0) para éster de colesterol, el patrón interno dPC(16:0/18:1) se utilizó para la fosfatidilcolina, y se utilizó el patrón interno dPE(18:0/18:1) para la fosfatidiletanolamina. Para la cuantificación de patrones internos individuales, los ácidos grasos dentro de las clases de lípido CE, PC o PE se asignaron a los patrones internos individuales de CE, PC o PE, respectivamente.

25 25 Para la cuantificación utilizando una mezcla de ejemplo de patrones internos, se utilizó el complemento completo de patrones internos para cada clase de lípido (Tabla 1). En todos los casos, se asignaron las especies moleculares de lípidos que debían cuantificarse a un patrón interno con el mismo número de dobles enlaces en la composición de ácidos grasos. Por ejemplo, las especies moleculares PC(16:0/22:5), PC(18:0/22:5) y PC(14:0/22:5) se asignaron todos al patrón interno dPC(16:0/22:5).

30 30 Las concentraciones totales de las clases de lípido éster de colesterol (CELC), fosfatidilcolina (PCLC) y fosfatidiletanolamina (PELC) se determinaron a partir de las 25 muestras de plasma humano en las que se realizaron los cálculos utilizando tanto un patrón interno individual como una mezcla de patrones internos (PI múltiples) por clase de lípido (fig. 15). Se compararon los resultados con los valores obtenidos mediante análisis cuantitativo de CG-DIL (TrueMass, descrito en otro sitio). Se calculó el sesgo como:

$$((\text{Valor calculado} - \text{valor de TrueMass}) / \text{Valor de TrueMass}) * 100$$

35 40 Se calculó el sesgo para el método de patrón interno individual y el método de múltiples patrones internos. Se proporcionan los resultados en la Tabla 10.

Tabla 10. Sesgo para la concentración total calculada para tres clases de lípido de ejemplo.

	PI individual	Múltiples PI
Éster de colesterol (CELC)	280,2 %	15 %
Fosfatidilcolina (PCLC)	-18,1 %	-4,5 %
Fosfatidiletanolamina (PELC)	-29,8 %	-6,1 %

45 45 A continuación, se determinó la composición de ácidos grasos de las clases de lípidos CE, PC y PE. Todos los valores se expresaron en % molar, una forma de datos que proporciona la cantidad relativa de un ácido graso presente en cada clase respecto a la totalidad de ácidos grasos. A modo de un ejemplo, la comparación entre la composición de ácidos grasos de éster de colesterol (CE) para los métodos de PI individual (dCE(16:0)) y múltiples PI respecto a los valores cuantitativos (TrueMass) se muestra en la fig. 16. La línea  $y=x$  indica un valor con un sesgo igual a cero. La totalidad de los 25 sujetos están representados para cada uno de los 22 ácidos grasos medidos en la clase de lípido CE. Aunque algunos ácidos grasos se miden eficazmente utilizando un solo patrón interno, otros muestran un sesgo significativo; sin embargo, el sesgo era menor al utilizar los PI múltiples.

50 55 60 En particular, los ácidos grasos poliinsaturados aparentemente estaban sustancialmente sesgados al utilizar el método de PI individual. Se muestran posteriormente ejemplos específicos del sesgo contra los ácidos grasos poliinsaturados de las clases de lípido CE y PC. Se calculó el sesgo tal como se ha indicado anteriormente y se presenta en la Tabla 11. El valor verdadero (cuantitativo) ( $\mu$ M) y el valor estimado (calculado utilizando un patrón interno) ( $\mu$ M) para los ácidos grasos de ejemplo de las clases de lípido PC y CE se representan gráficamente para cada una de las 25 muestras de plasma. Se muestran los resultados en la fig. 17.

Tabla 11. Sesgo para la cantidad relativa de ácidos grasos de ejemplo en la clase de lípido dada.

	PI individual	Múltiples PI
PC20:5	-49,8 %	-5,3 %
PC22:6	-80,9 %	-7,3 %
CE20:4	67,7 %	-2,9 %
CE20:5	124,1 %	6,8 %

- § En la presente memoria los presentes inventores han mostrado que un patrón interno individual por clase puede causar sesgos cuantitativos y composicionales en los resultados, debido a que el patrón interno individual no era capaz de cuantificar con exactitud todas las especies moleculares dentro de una clase. Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se redujo significativa y sustancialmente el sesgo cuantitativo y composicional en los ensayos lipidómicos.
- ¶ Los presentes ejemplos junto con los métodos descritos en la presente memoria son actualmente representativos de realizaciones preferentes, son ejemplificadores y no pretenden ser limitativos del alcance de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Composición para la utilización como un patrón interno, que comprende una o más mezclas de moléculas de lípidos que comprenden una o más especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípido correspondientes en una muestra de interés, en donde cada mezcla de moléculas de lípidos comprende uno o más de:

un esqueleto lipídico que presenta un solo ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en el esqueleto lipídico y que presenta una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes en una posición separada en el esqueleto lipídico, en la que el esqueleto lipídico es para una clase de lípido que presenta por lo menos dos ácidos grasos,  
 en la que la clase de lípido consiste en fosfatidiletanolaminas o p-fosfatidiletanolaminas,  
 en la que la primera posición es una posición sn-1 y la posición separada es una posición sn-2, o en la que la primera posición es una posición sn-2 y la posición separada es una posición sn-1,  
 en la que estearato-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio está presente en la primera posición, y  
 en la que la mezcla de ácidos grasos en la posición separada comprende:

20 9Z-octadecenoílo (18:1n9),  
 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6),  
 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3),  
 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6),  
 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6),  
 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3),  
 25 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3), y  
 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3);

en la que la mezcla de ácidos grasos está presente del modo siguiente: 20 % de 18:1n9, 20 % de 18:2n6, 5 % de 18:3n3, 5 % de 20:3n6, 20 % de 20:4n6, 5 % de 20:5n3, 5 % de 22:5n3 y 20 % de 22:6n3.

- 30 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la muestra de interés es una muestra biológica, en la que opcionalmente dicha muestra biológica comprende sangre, plasma, suero, fracción lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo, una muestra de tejido, una muestra celular o una muestra de piel.

- 35 3. Método para sintetizar una o más mezclas de moléculas de lípidos representativas de la composición de especies moleculares de lípidos presentes en una o más clases de lípidos correspondientes en una muestra de interés, comprendiendo el método:

40 unir un ácido graso marcado isotópicamente en una primera posición en un esqueleto lipídico mediante una reacción de acilación para una clase de lípido que presenta por lo menos dos grupos acilo, y  
 unir una mezcla de por lo menos dos ácidos grasos diferentes al esqueleto lipídico en una posición separada mediante una reacción de acilación,  
 en la que la clase de lípido consiste en fosfatidiletanolaminas o p-fosfatidiletanolaminas,  
 en la que la primera posición es una posición sn-1 y la posición separada es una posición sn-2, o en la que la primera posición es una posición sn-2 y la posición separada es una posición sn-1,  
 en la que estearato-d9 (18:0-d9) marcado con deuterio está presente en la primera posición, y  
 en la que la mezcla de ácidos grasos en la posición separada comprende:

45 9Z-octadecenoílo (18:1n9),  
 9Z,12Z-octadecadienoílo (18:2n6),  
 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoílo (18:3n3),  
 8Z,11Z,14Z-eicosatrienoílo (20:3n6),  
 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoílo (20:4n6),  
 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoílo (20:5n3),  
 55 7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoílo (22:5n3), y  
 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoílo (22:6n3);

en la que la mezcla de ácidos grasos está presente del modo siguiente: 20 % de 18:1n9, 20 % de 18:2n6, 5 % de 18:3n3, 5 % de 20:3n6, 20 % de 20:4n6, 5 % de 20:5n3, 5 % de 22:5n3 y 20 % de 22:6n3.

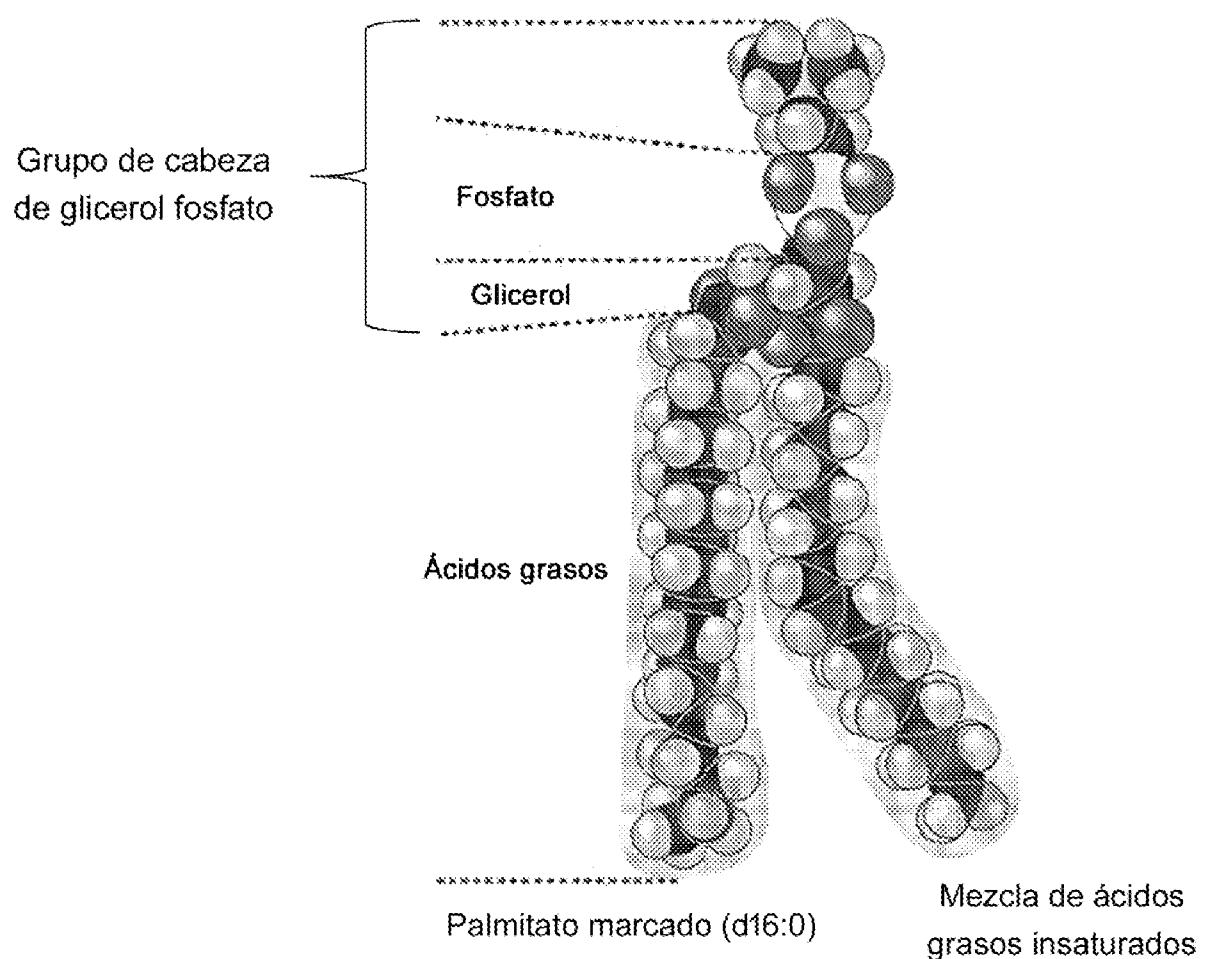


FIG. 1

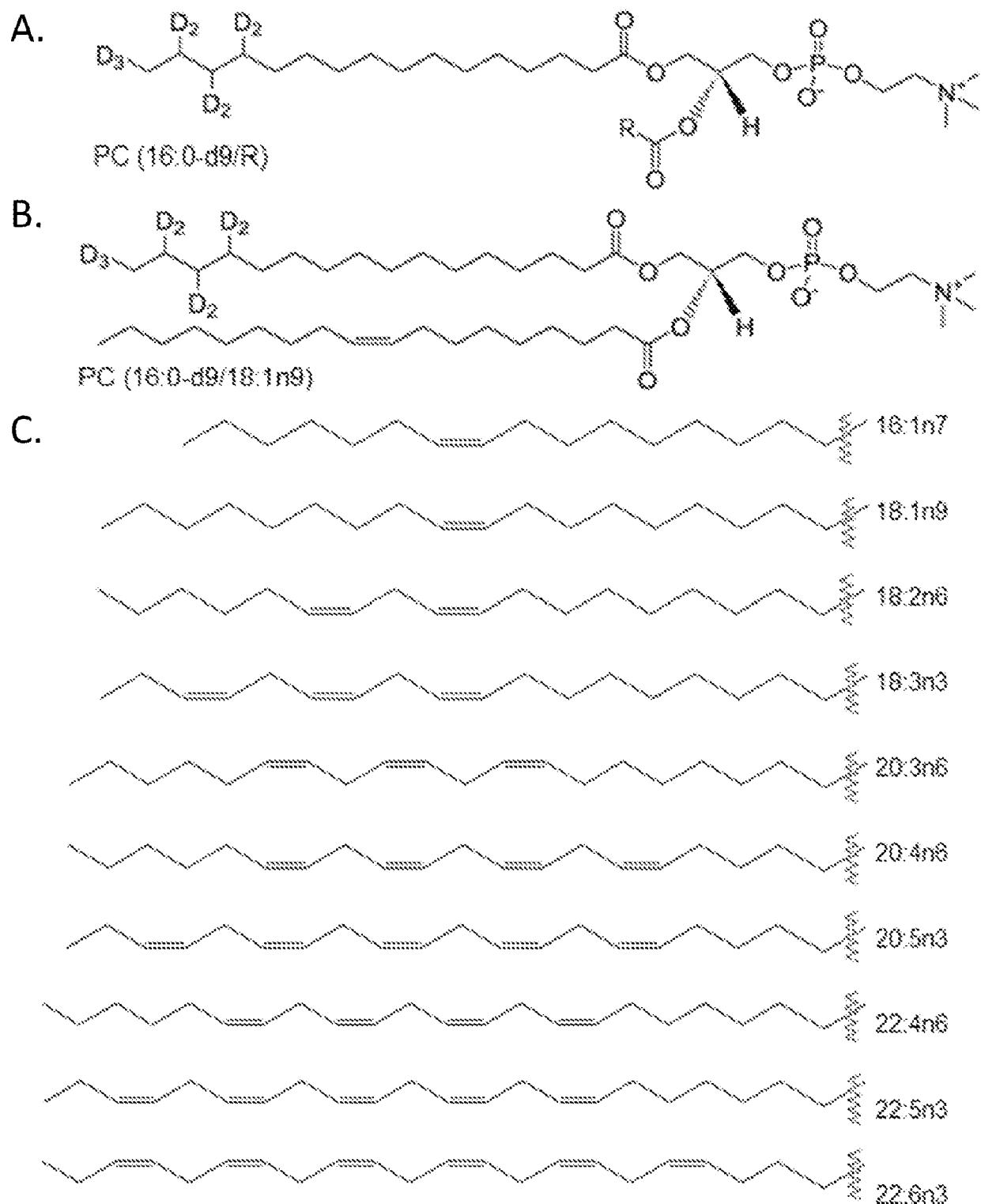


FIG. 2

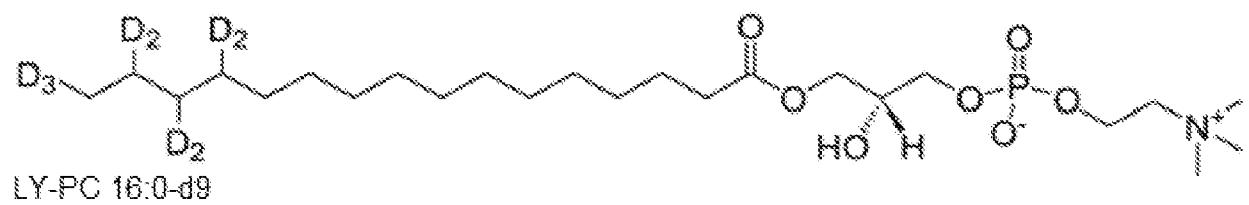


FIG. 3

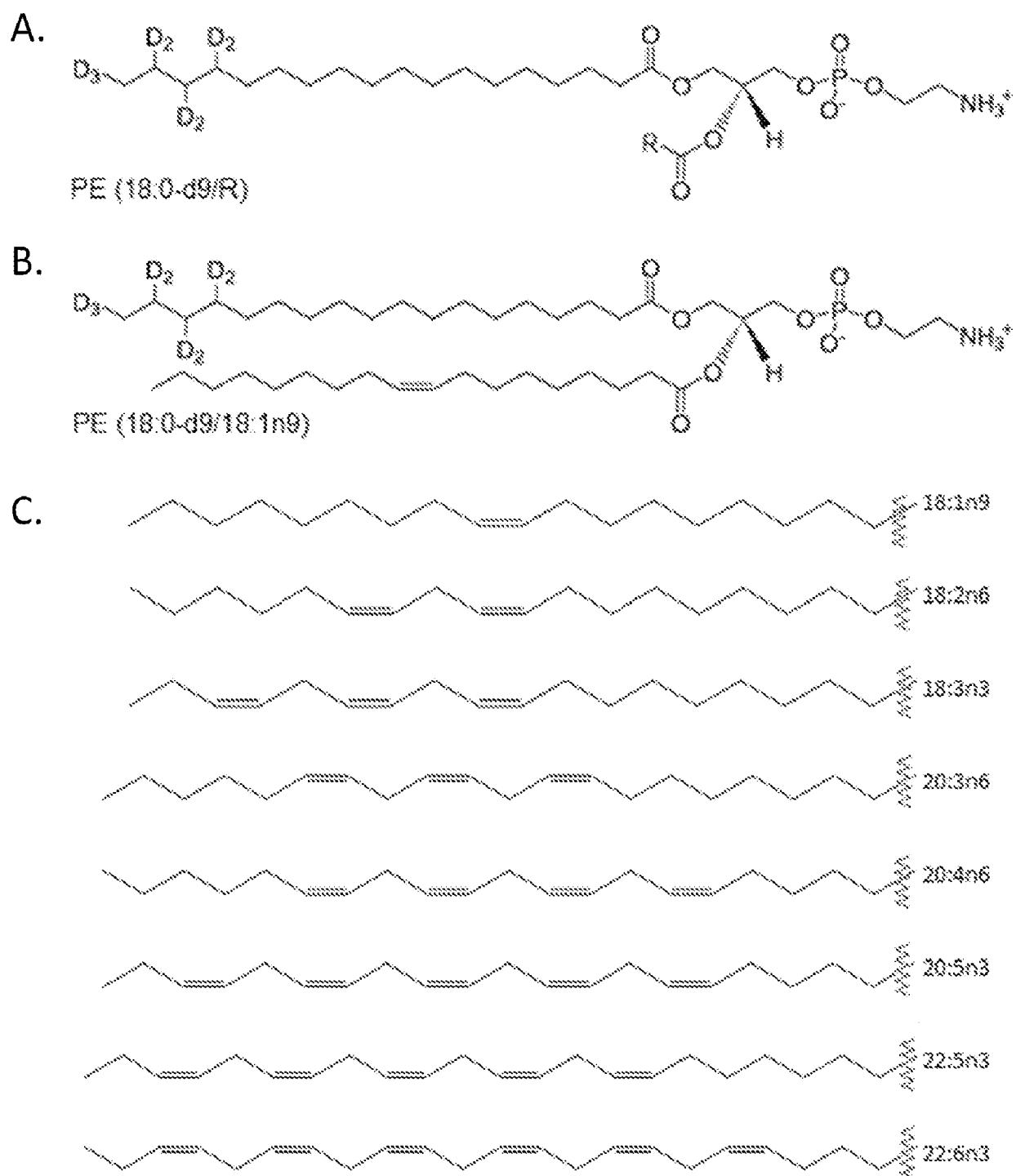


FIG. 4

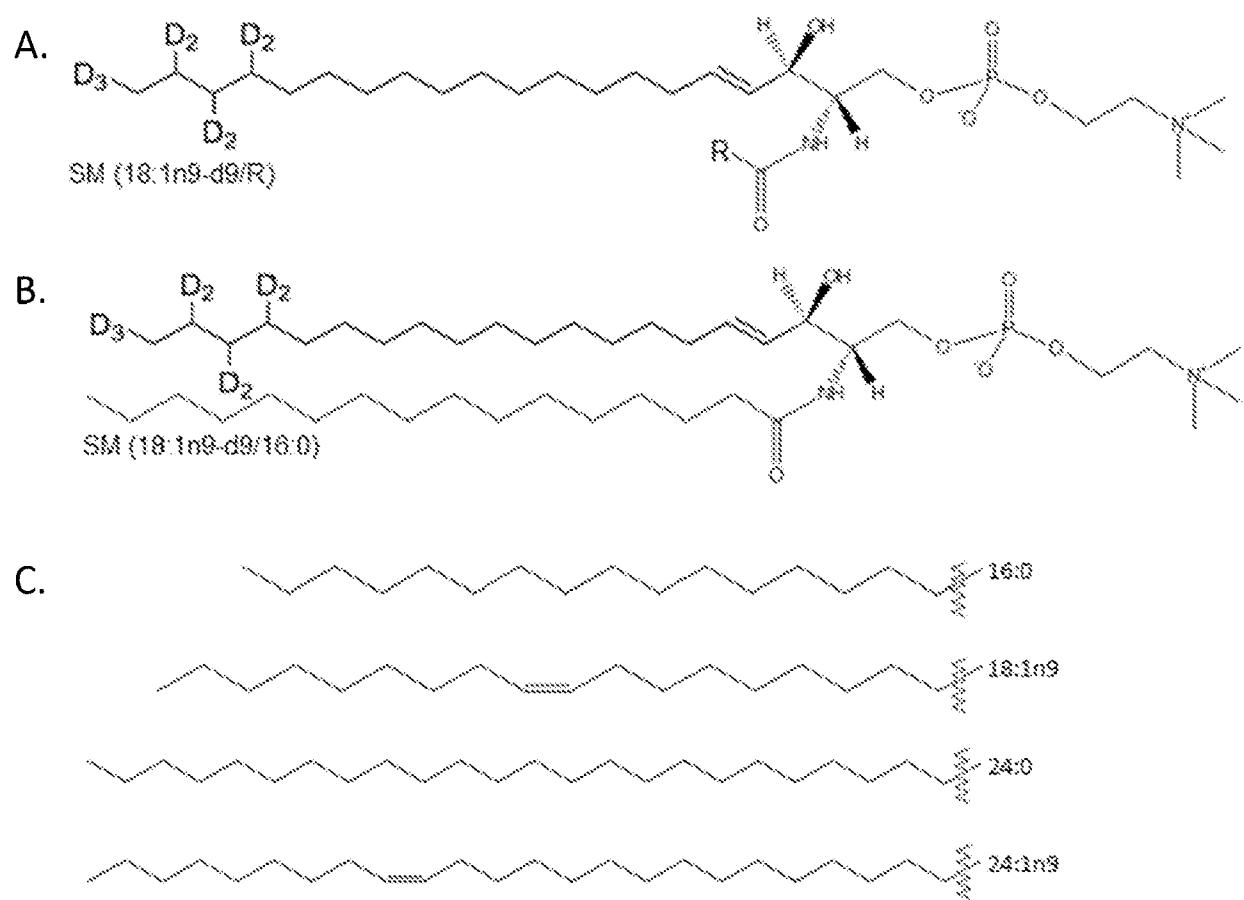


FIG. 6

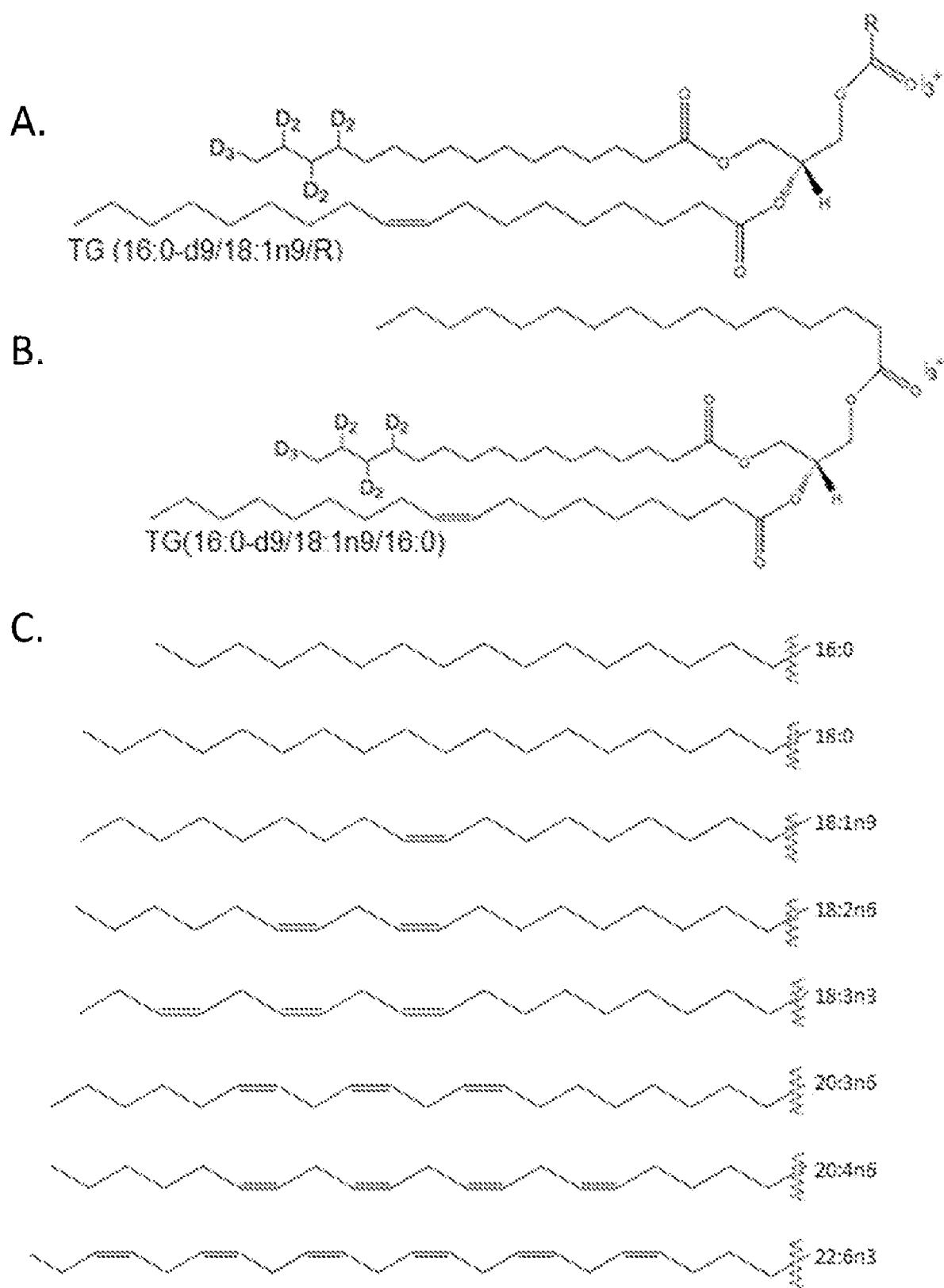
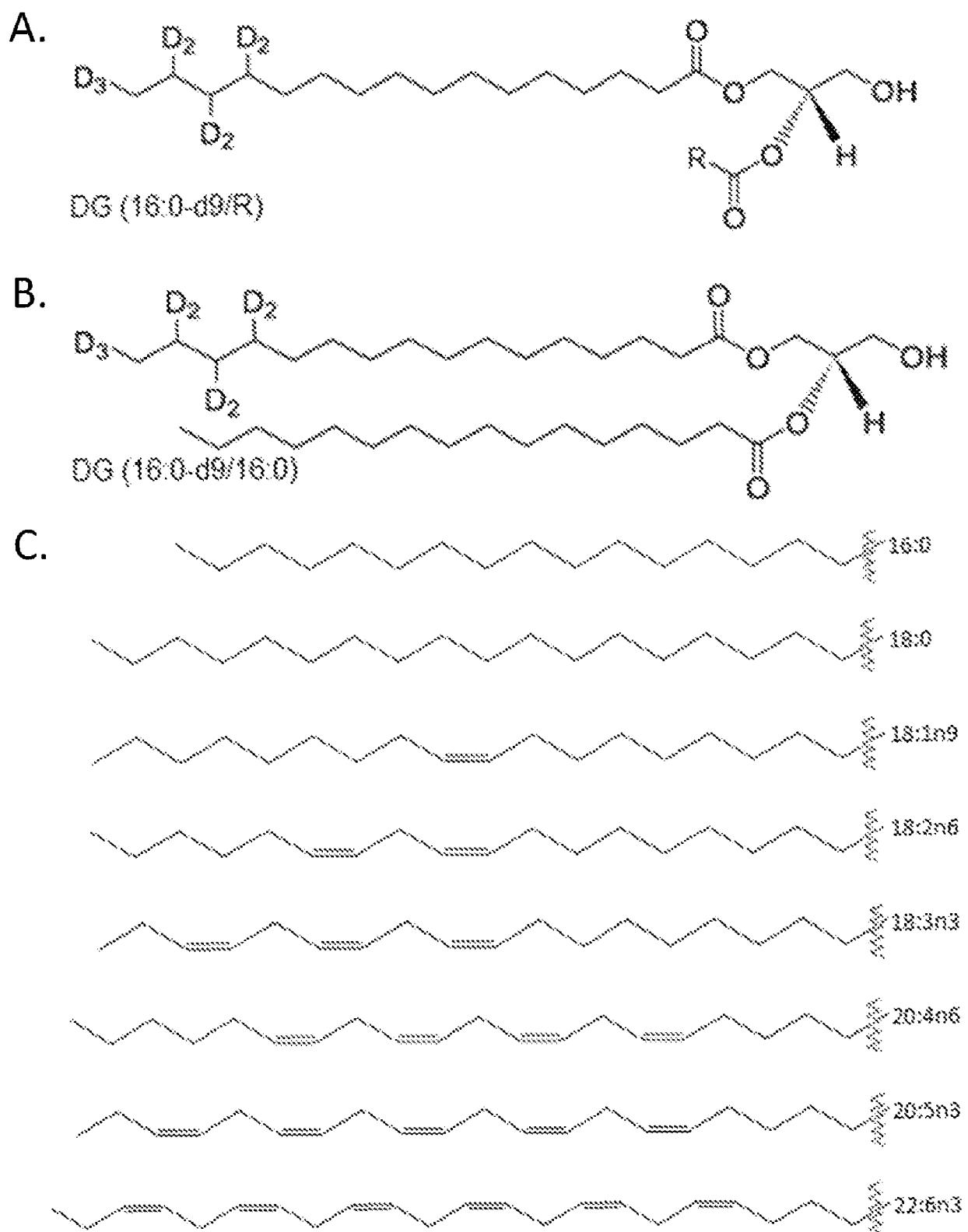
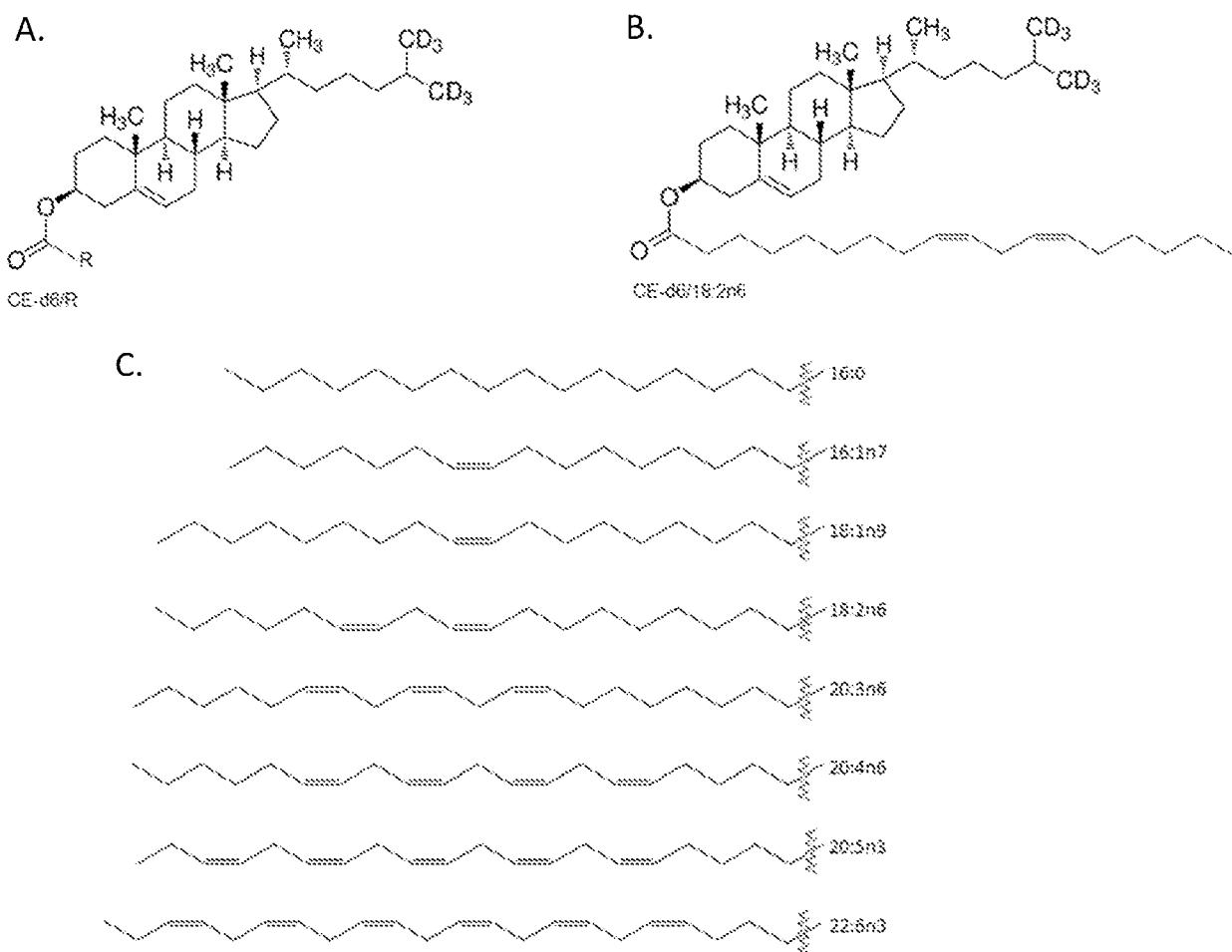
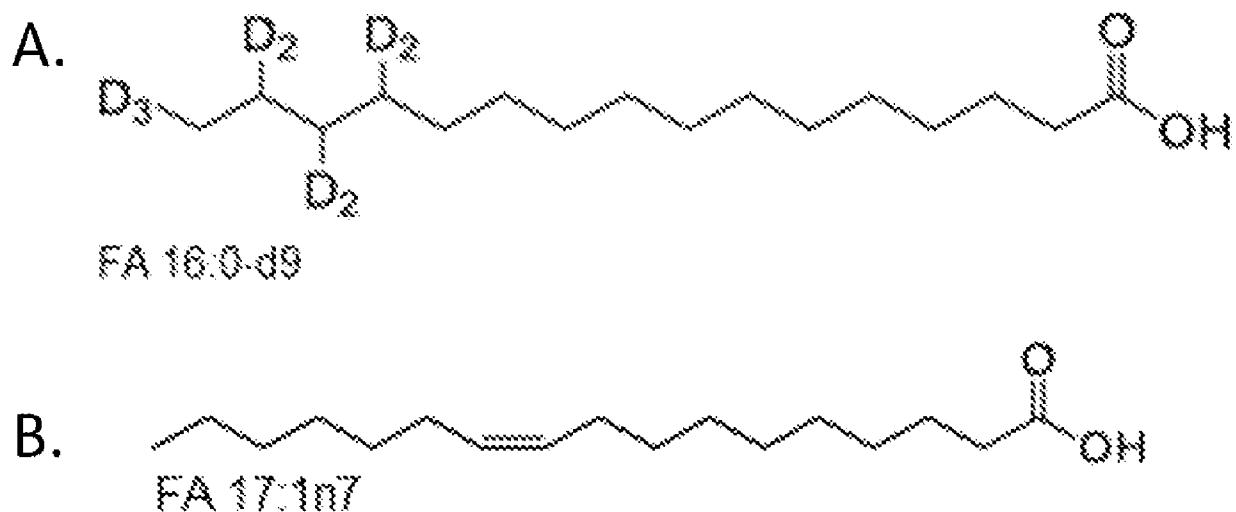


FIG. 7

**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**

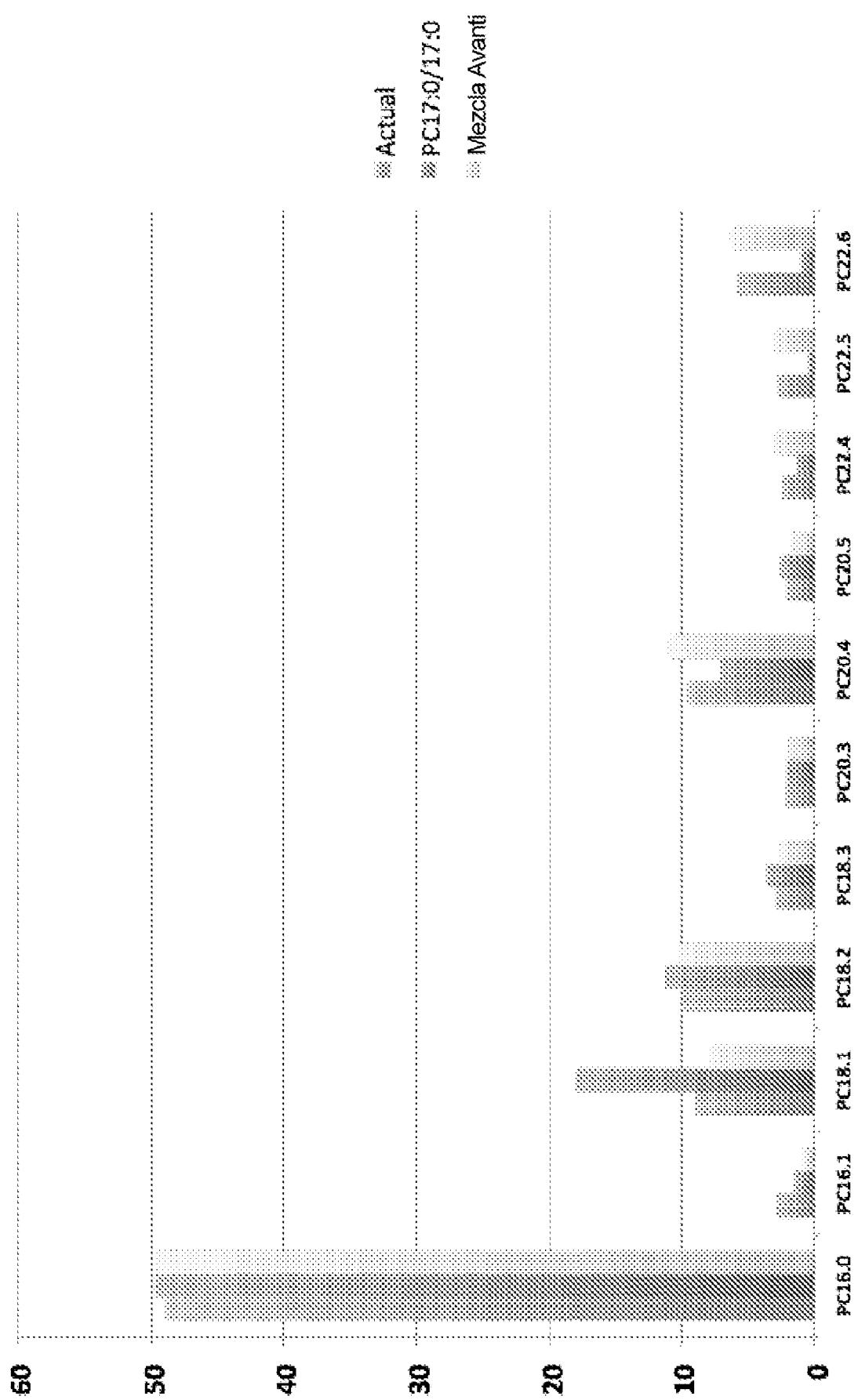
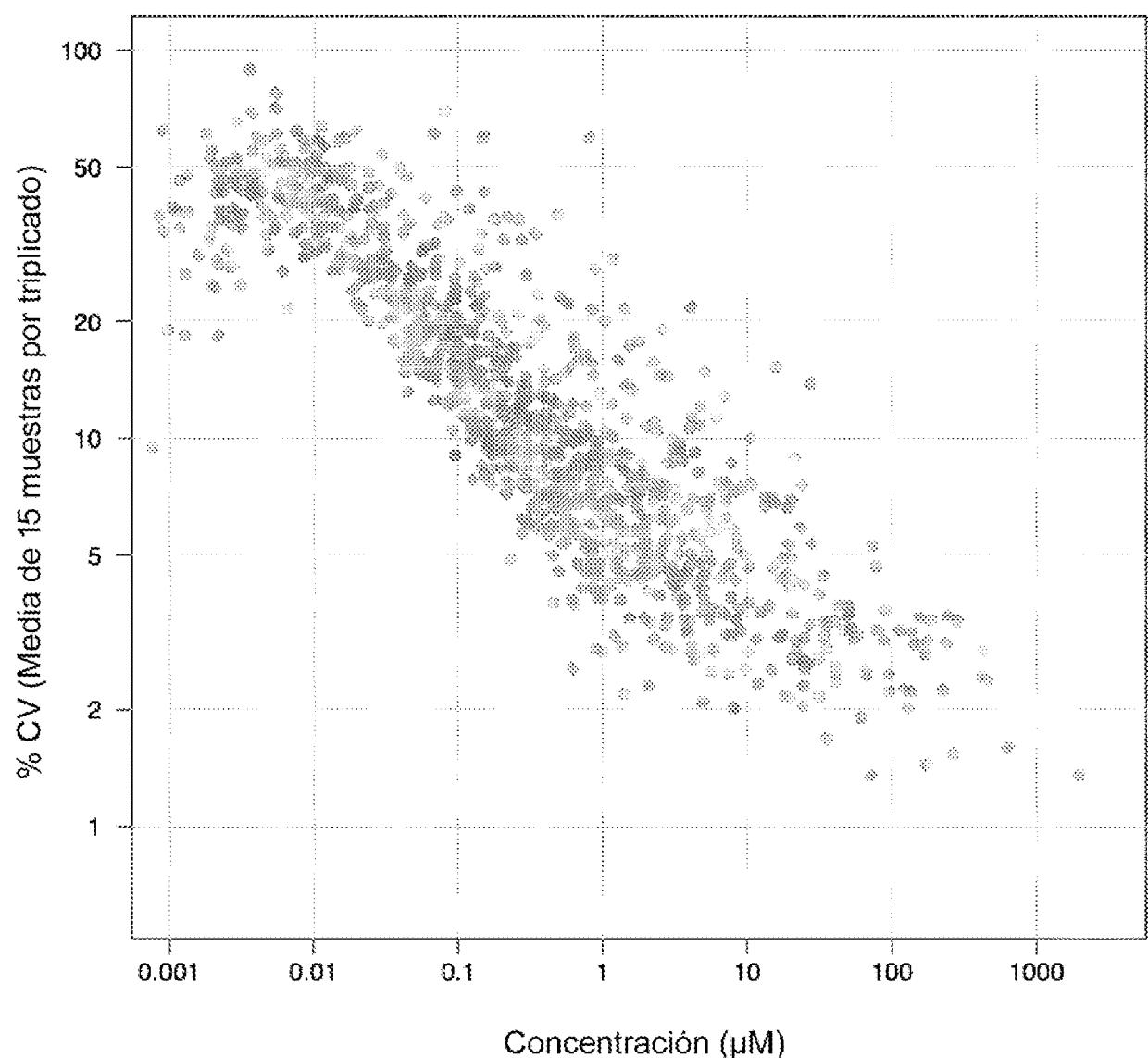


FIG. 11



**FIG. 12**

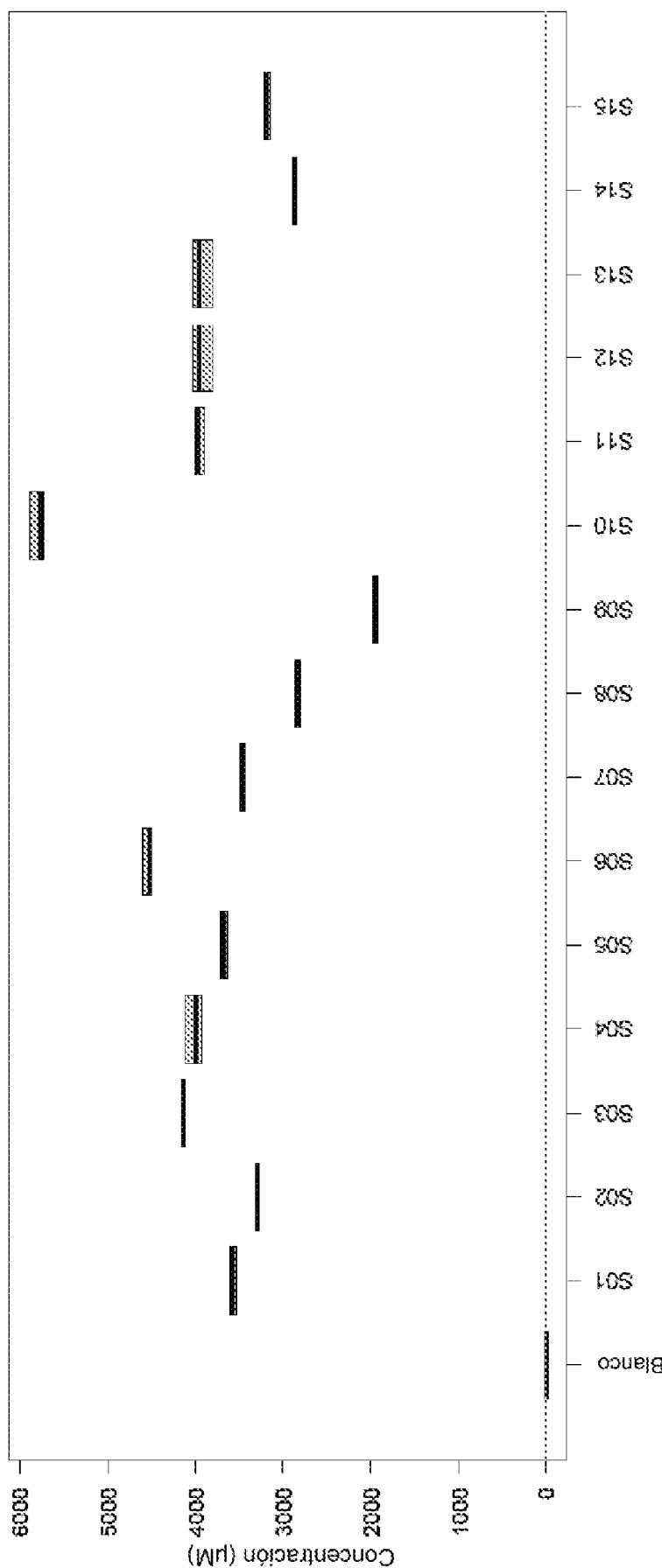


FIG. 13

ES 2 978 375 T3

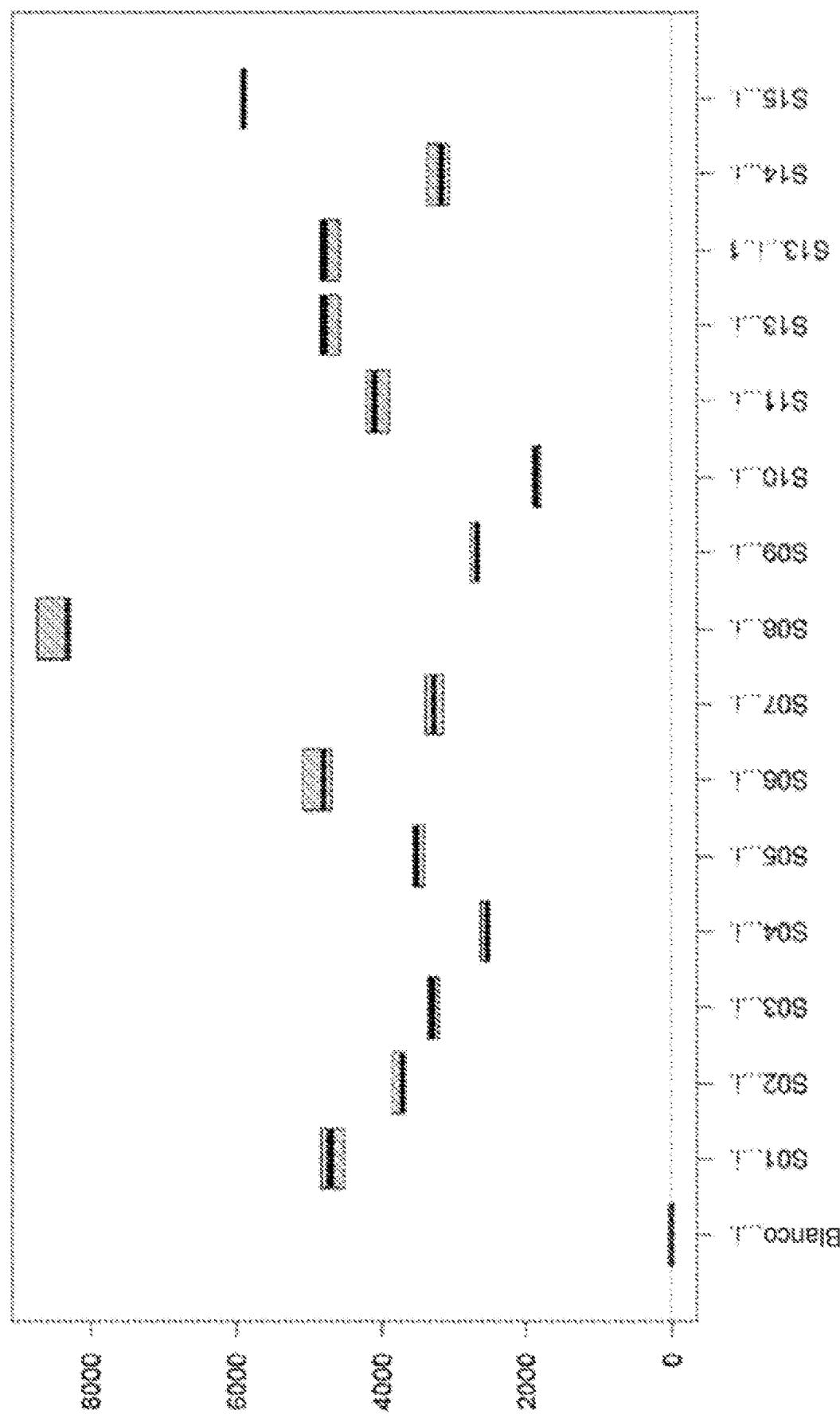


FIG. 14

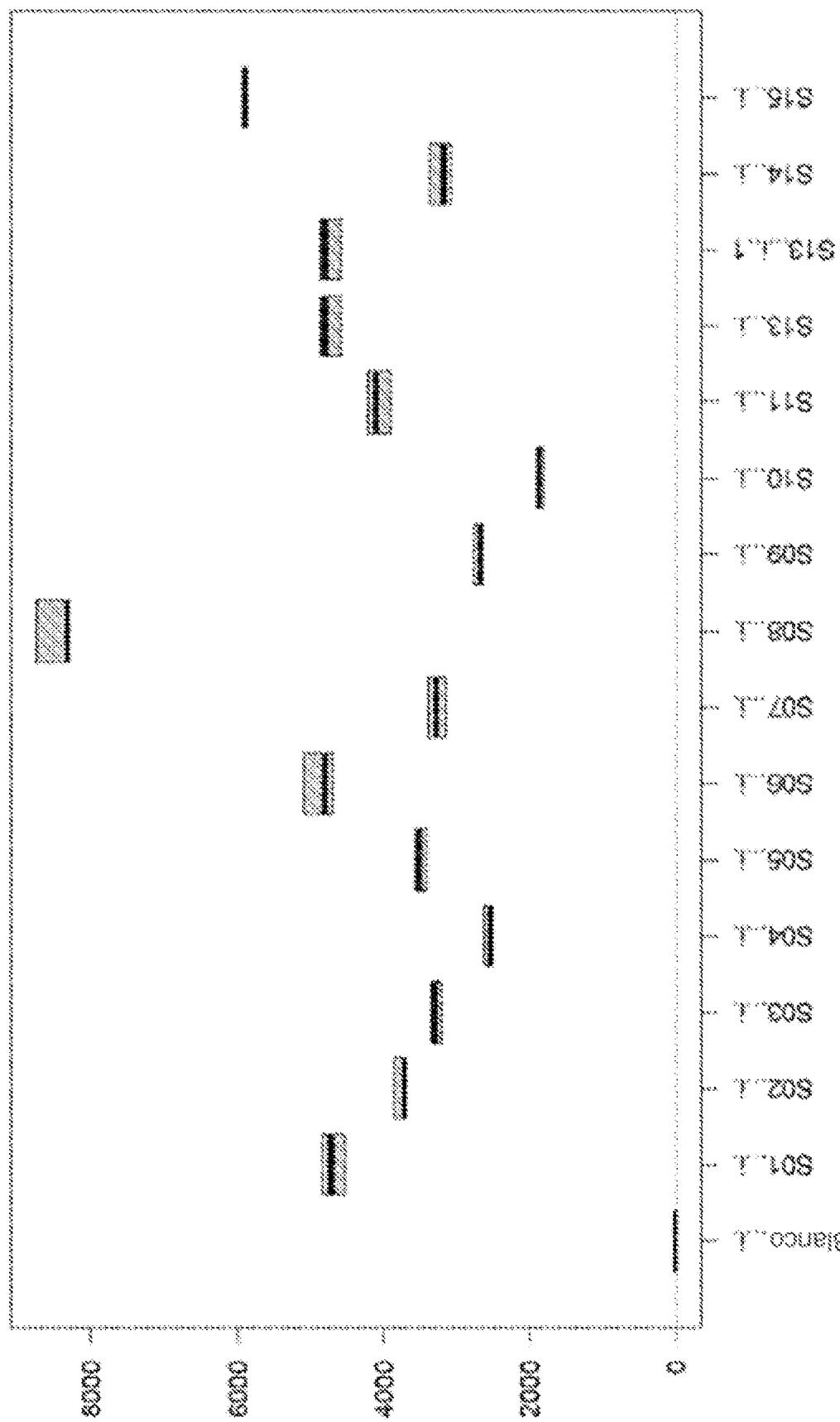


FIG. 15A

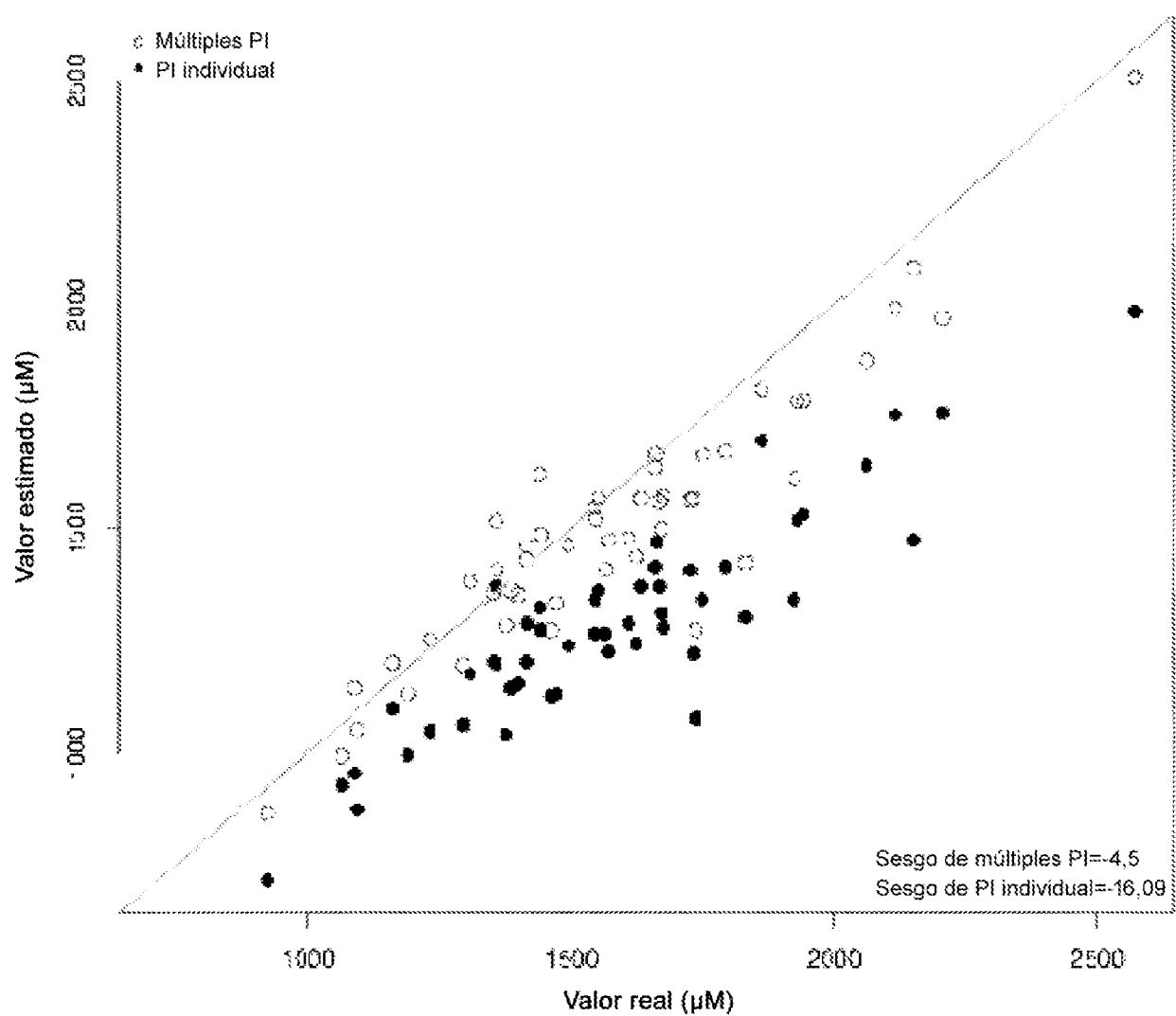


FIG. 15B

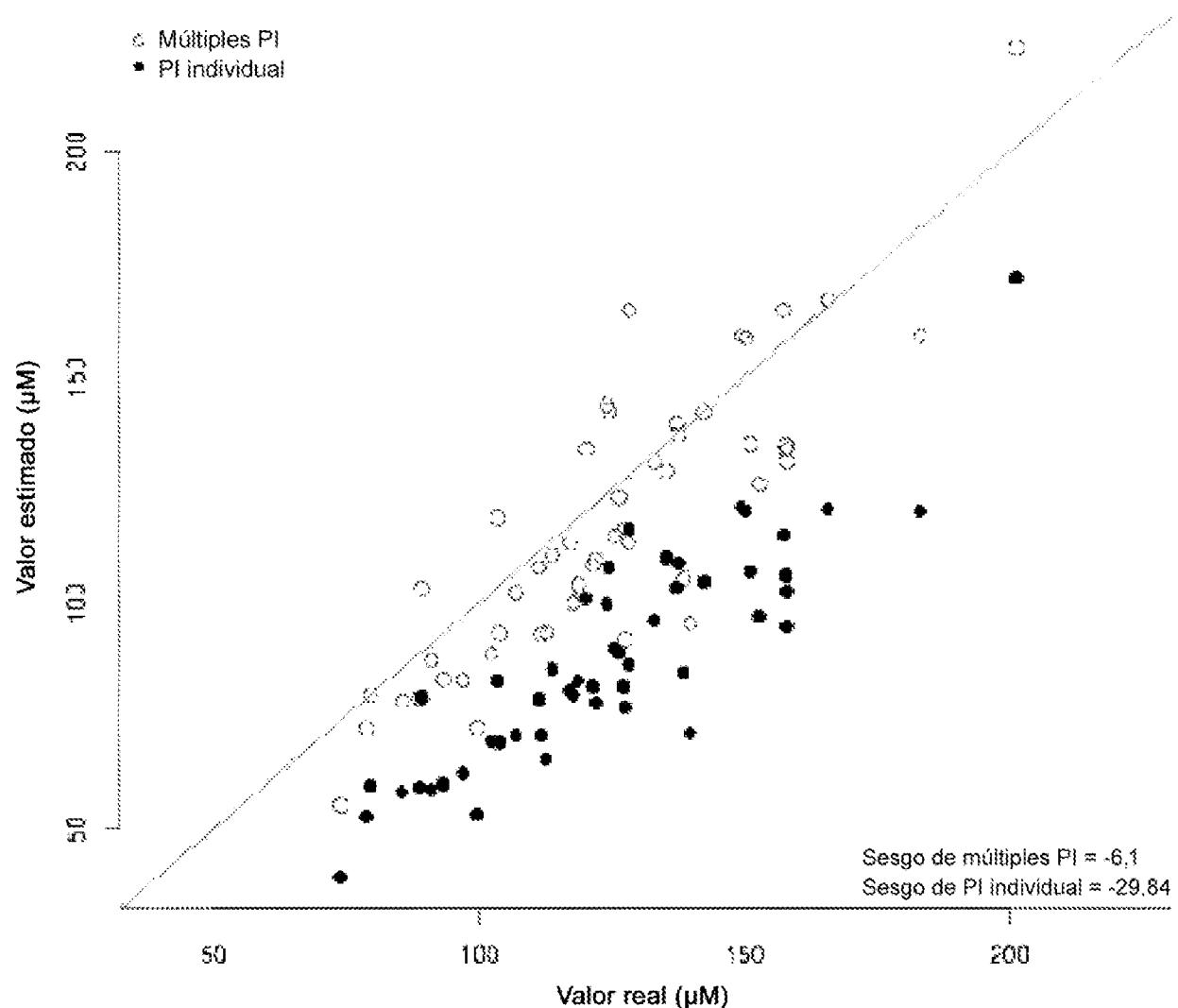


FIG. 15C

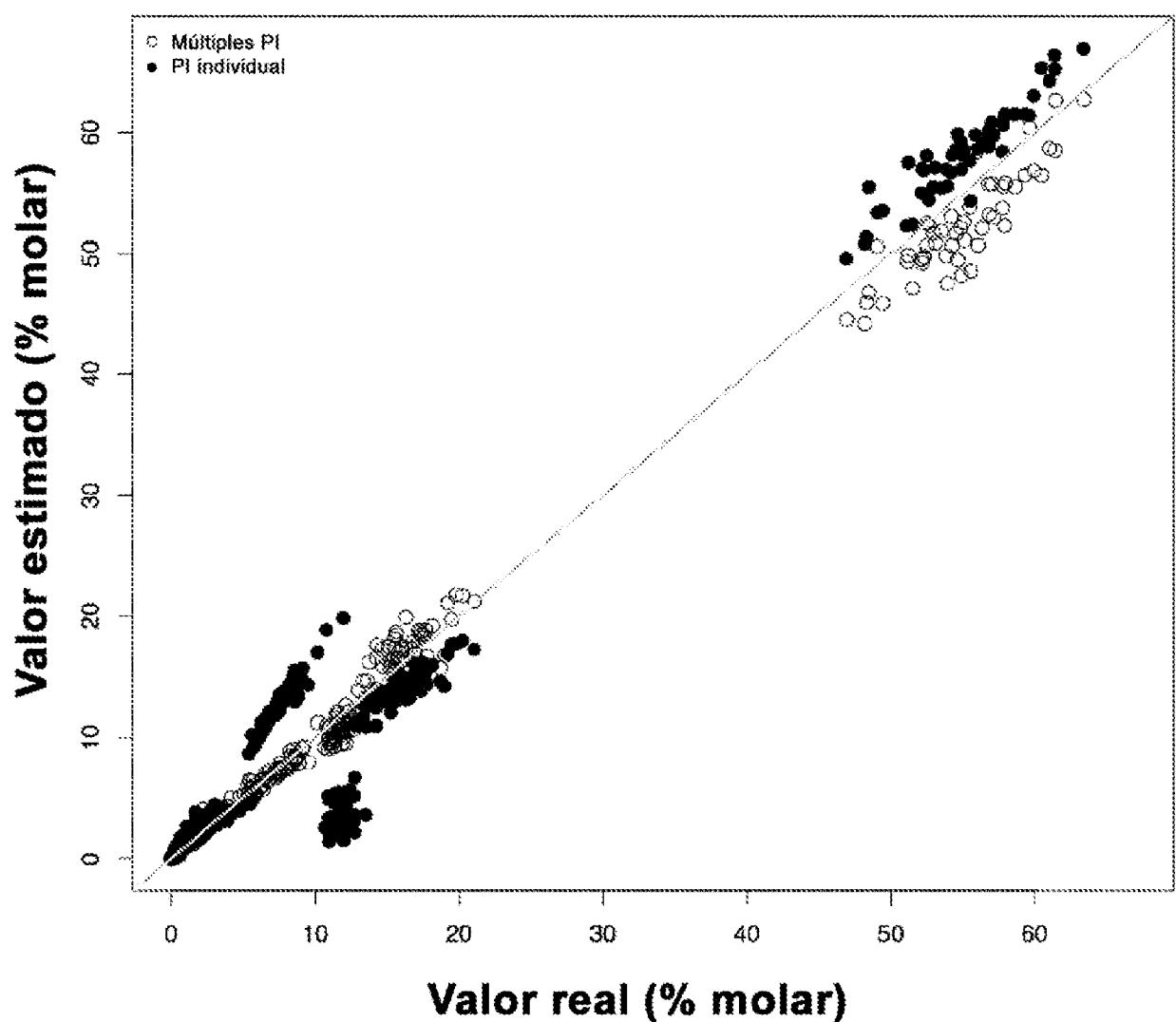


FIG. 16

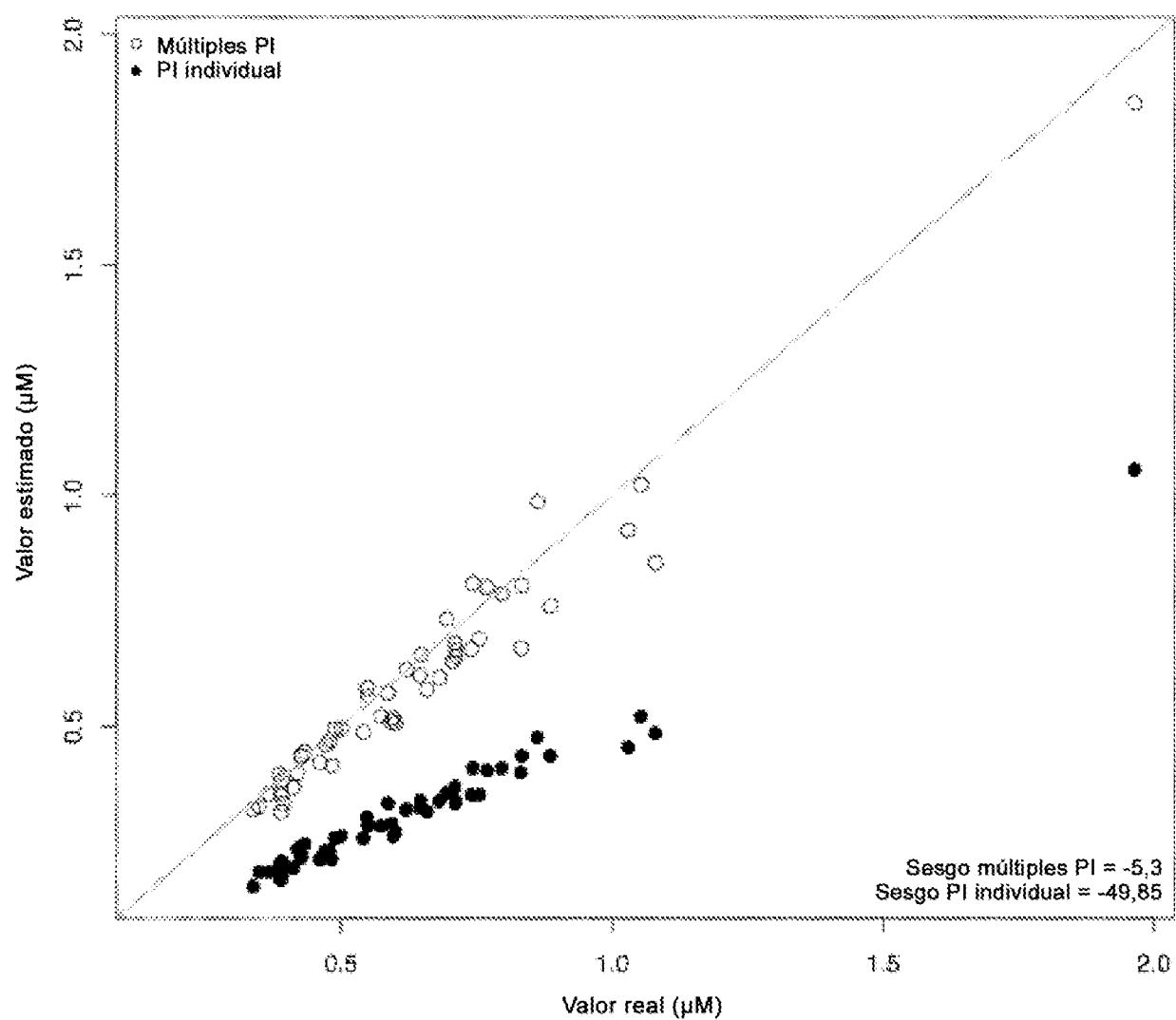


FIG. 17A

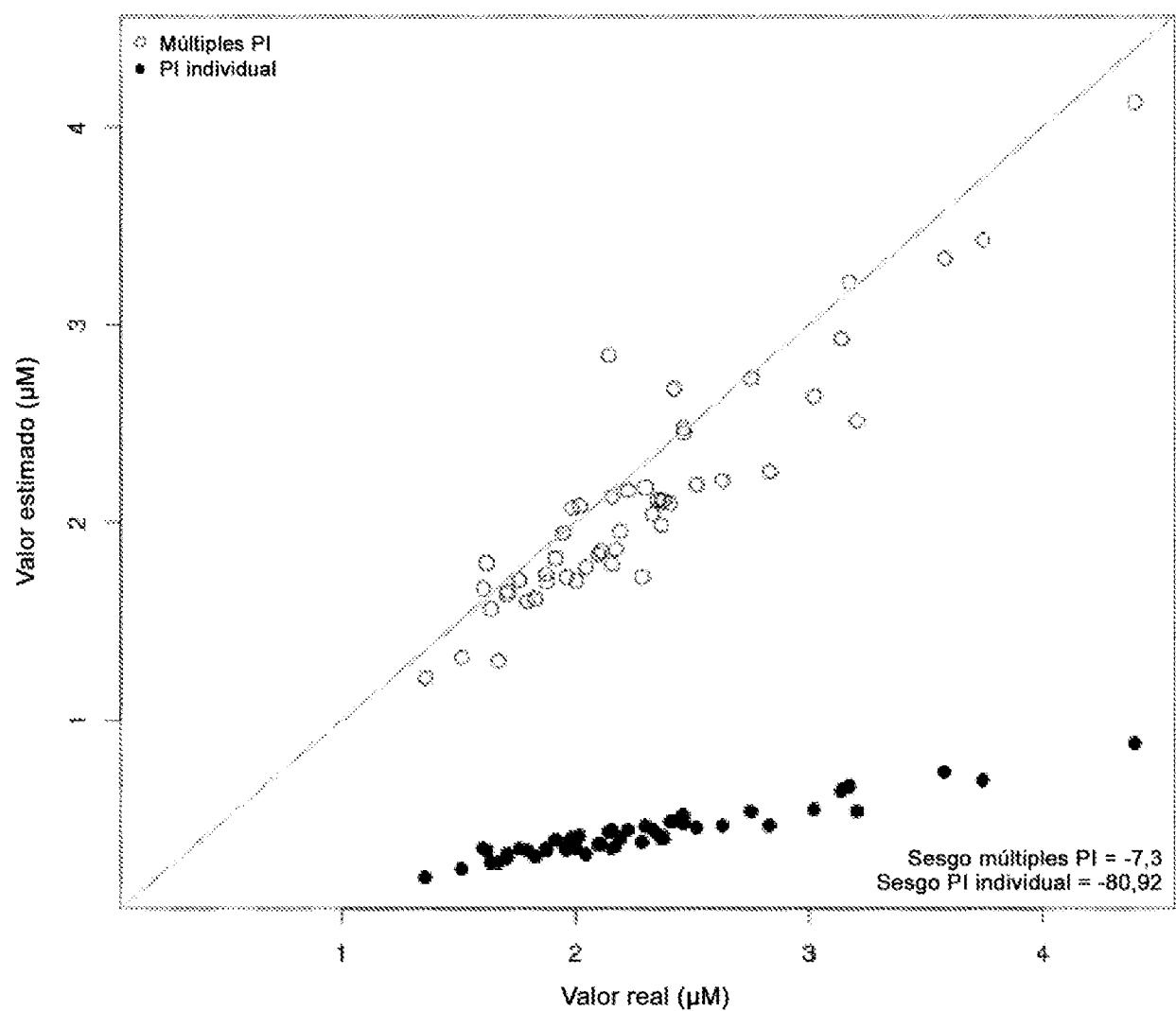


FIG. 17B

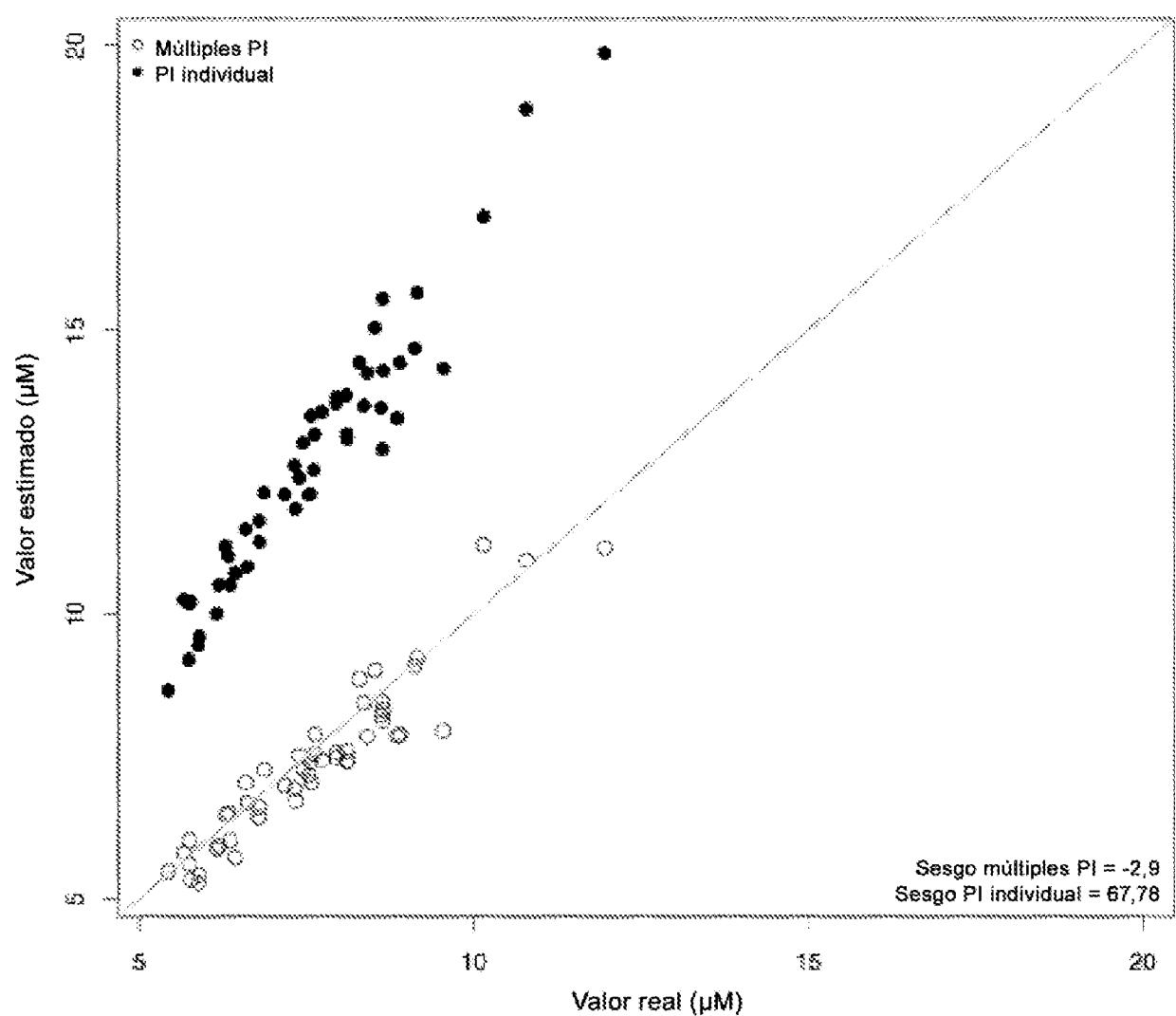


FIG. 17C

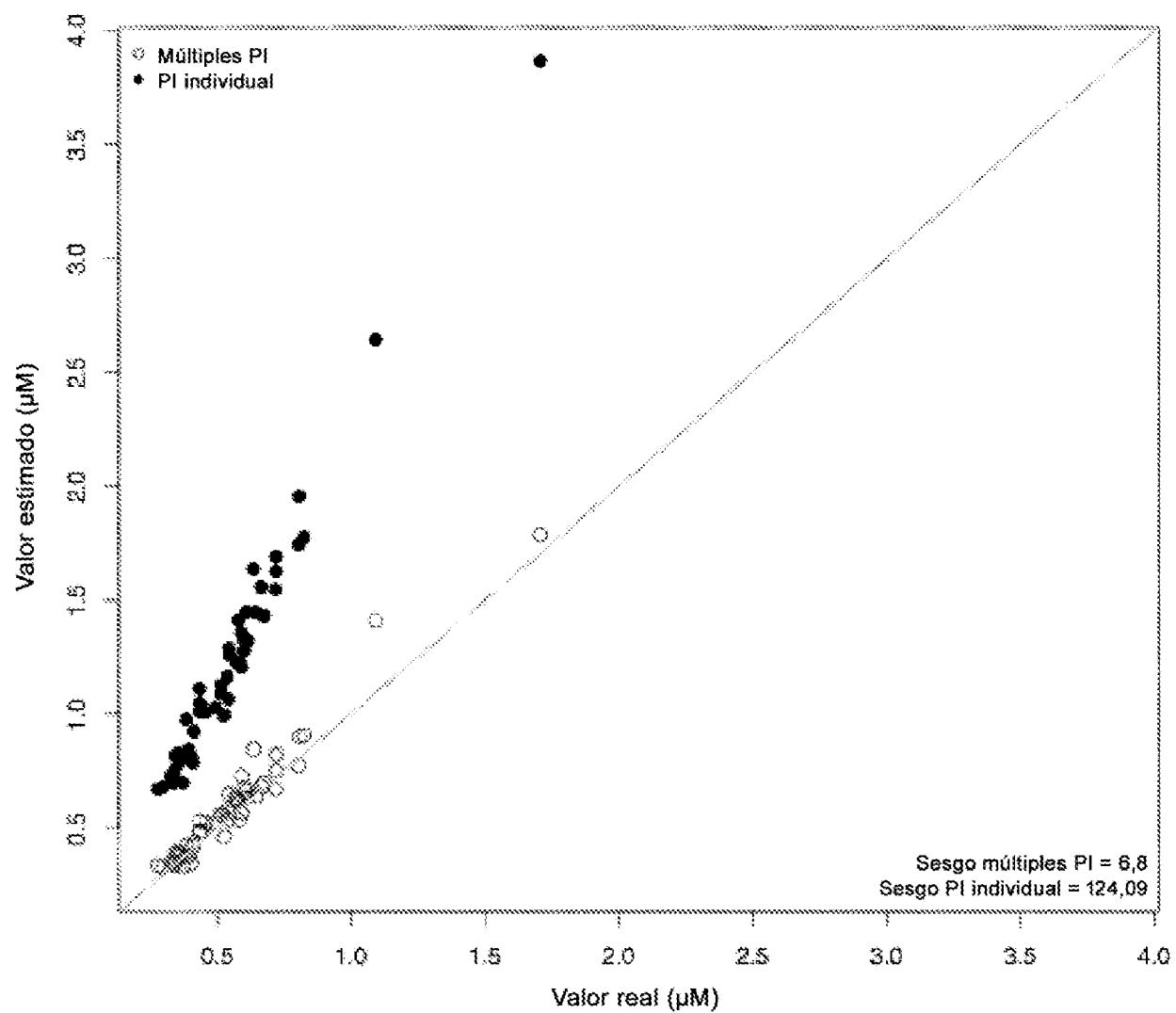


FIG. 17D