

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 140**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/32** (2006.01)  
**B01J 20/28** (2006.01)  
**B01J 20/32** (2006.01)  
**B01J 20/287** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2008 E 08010569 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2003455**

54 Título: **Preparación de muestras para CL-EM/EM mediante la utilización de partículas magnéticas**

30 Prioridad:

**14.06.2007 EP 07011633**  
**14.03.2008 EP 08004796**

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

**06.08.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**GRENZACHERSTRASSE 124**  
**4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**KOBOLD, UWE;**  
**GEIGER, ALBERT;**  
**HERRMANN, RUPERT y**  
**VOGESER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 417 140 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

Preparación de muestras para CL-EM/EM mediante la utilización de partículas magnéticas.

5 La invención hace referencia al campo de la preparación de muestras para la cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem. Particularmente, la invención hace referencia a los procedimientos de preparación adecuados para la detección de ciertas sustancias de bajo peso molecular en muestras biológicas complejas tales como el plasma, el suero o la sangre total.

10 Antecedentes de la invención

La cromatografía líquida (CL) es una técnica analítica extremadamente importante que se utiliza para la separación, la identificación y la cuantificación de un analito de interés, incluso si éste está presente en una mezcla compleja de diferentes constituyentes en la muestra. Durante la CL, los componentes químicos en una mezcla se hacen pasar por una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil líquida. La separación en la cromatografía líquida se logra mediante las diferencias en las interacciones de los analitos tanto con la fase móvil como con la estacionaria. Tal y como los expertos en la materia apreciarán, deben escogerse tanto una fase móvil como una fase estacionaria apropiadas para los analitos en investigación. Además, el usuario identificará las condiciones cromatográficas apropiadas para mantener la nitidez de las bandas del analito mientras una muestra se mueve a través de la columna de la fase estacionaria hacia el detector.

La cromatografía líquida de alto rendimiento, también conocida como cromatografía líquida de alta presión, y abreviada como HPLC, es una forma especial de cromatografía líquida que, actualmente, se utiliza frecuentemente en bioquímica y química analítica. El analito se fuerza a través de una columna de la fase estacionaria en un líquido (fase móvil) a alta presión, lo que disminuye el tiempo que los componentes separados permanecen en la fase estacionaria y, por consiguiente, el tiempo que tienen que difundir en la columna. Esto lleva a unos picos más estrechos en el cromatograma resultante y, consecuentemente, a una mejor resolución y sensibilidad en comparación con la CL.

La fase móvil se escoge para asegurar la solubilidad de los solutos de la muestra. Preferiblemente, para la fase estacionaria se utiliza sílice microparticulada (puro o modificado químicamente) debido a que su mayor área de superficie acentúa las diferencias en las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria. La utilización de una fase estacionaria que interacciona fuertemente con los solutos en relación con las interacciones soluto-fase móvil dará como resultado unos tiempos de retención muy largos, y dicha situación no es útil analíticamente. Por eso, la fase estacionaria debe seleccionarse de manera que proporcione interacciones con el soluto leves-moderadas en relación con las de la fase móvil. Como consecuencia, la naturaleza del soluto gobierna sobre el tipo de CL seleccionada. Las interacciones más fuertes deberían ocurrir en la fase móvil para asegurar la solubilidad de la muestra y su fácil elución, mientras que la fase estacionaria debería responder a diferencias más sutiles entre los solutos. Por ejemplo, los compuestos neutros polares se suelen analizar mejor mediante la utilización de una fase móvil polar junto a una fase estacionaria no polar que distingue entre diferencias sutiles en el carácter dispersivo de los solutos. Uno de los aspectos más potentes de la HPLC es que la fase móvil puede variarse para alterar el mecanismo de retención. Se pueden añadir modificadores a la fase móvil para controlar la retención. Por ejemplo, el pH es una variable importante en las fases móviles acuosas.

Se pueden distinguir cinco clases generales de CL:

1. La cromatografía de fase normal requiere la utilización de una fase estacionaria polar en conjunción con una fase móvil no polar (dispersiva).

2. La cromatografía de fase reversa, la posibilidad opuesta, requiere la utilización de una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar (compuesta por uno o más disolventes polares, por ejemplo, agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano).

3. La cromatografía de intercambio iónico involucra las interacciones iónicas. En este caso, la fase móvil debe soportar la ionización para asegurar la solubilidad de los solutos iónicos. La fase estacionaria también debe ser parcialmente iónica para promover cierta retención. Consecuentemente, las interacciones con la fase estacionaria son fuertes, y habitualmente esto se refleja en unos tiempos de análisis más largos y picos más anchos.

4. La cromatografía de exclusión por tamaño involucra unas separaciones basadas sólo en el tamaño molecular e idealmente requiere que no haya interacción energética de los solutos con la fase estacionaria.

5. La cromatografía de afinidad se basa en una interacción específica, por ejemplo, entre los miembros de un par de unión específico, como un antígeno y el anticuerpo correspondiente o un receptor y el ligando correspondiente. Por ejemplo, un primer componente de un par de unión se une a una fase estacionaria apropiada y se utiliza para capturar al segundo componente del par de unión. El segundo componente puede liberarse y asilarse mediante medios apropiados.

La clasificación general de los principios de separación citados con anterioridad no es exhaustiva y, por consiguiente, no es limitante; hay otros principios de separación que pueden utilizarse para la separación de muestras líquidas, por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de interacción hidrofílica, la cromatografía de par iónico, y la separación basada en materiales impresos.

El analito de interés puede detectarse mediante cualquier medio apropiado. Los detectores apropiados y adecuados notan la presencia de un compuesto que pasa a través de estos y proporcionan una señal electrónica a un registro o a una estación computerizada de datos. Habitualmente, el resultado se proporciona en forma de cromatograma y se encuentra una sustancia de interés en cierto pico. El área del pico o la altura del pico pueden utilizarse para cuantificar la cantidad del analito presente en la muestra investigada.

El detector para un sistema de HPLC es el componente que emite una respuesta en relación al compuesto de la muestra que se eluye y, subsiguientemente, señala un pico en el cromatograma. Está colocado inmediatamente después de la fase estacionaria para detectar los compuestos a medida que eluden desde la columna. Habitualmente, la amplitud y la altura de los picos se pueden ajustar mediante la utilización de los controles groseros y finos de sintonización, y el experto en la materia también puede controlar los parámetros de detección y sensibilidad. Existen muchos tipos de detectores que pueden utilizarse en la HPLC. Algunos de los detectores más comunes incluyen: el índice refractivo (IR), los ultravioleta (UV), los fluorescentes, los radioquímicos, los electroquímicos, los cercanos al infrarrojo (Near-IR), la espectrometría de masas (EM), la resonancia magnética nuclear (RMN), y la dispersión de luz (LS).

Los detectores de índice refractivo (RI) miden la capacidad de las moléculas de la muestra de desviar o refractar la luz. Para cada molécula o compuesto, esta propiedad se denomina índice refractivo. En la mayoría de detectores de RI la luz pasa por una celda de flujo bimodular hacia un fotodetector. Un canal de la celda de flujo dirige la fase móvil que pasa a través de la columna mientras que el otro solamente dirige la fase móvil. La detección ocurre cuando la luz se desvía debido a las muestras que eluyen desde la columna, y esto se lee como un disparidad entre los dos canales.

Los detectores fluorescentes miden la capacidad de un compuesto para absorber y luego reemitir la luz a una determinada longitud de onda. Cada compuesto tiene una fluorescencia característica. La fuente de excitación pasa a través de la celda de flujo hacia un fotodetector mientras un monocromador mide la emisión de longitudes de onda.

La detección radioquímica involucra la utilización de material radiomarcado, habitualmente tritio ( $^3\text{H}$ ) o carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Funciona mediante la detección de fluorescencia asociada con la ionización de partículas beta, y es la más popular en la investigación de metabolitos.

Los detectores electroquímicos miden compuestos que sufren reacciones de oxidación o reducción. Habitualmente, esto se logra mediante la medición de la ganancia o pérdida de electrones a partir de muestras que migran mientras estas pasan entre electrodos con una determinada diferencia de potencial eléctrico.

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir la relación entre masa y carga ( $m/z$  o  $m/q$ ) de los iones. Generalmente, es la más utilizada para analizar la composición de una muestra física mediante la generación de un espectro de masas que representa las masas de los componentes de la muestra. La técnica tiene varias aplicaciones, incluyendo: la identificación de compuestos desconocidos por la masa del compuesto y/o fragmentos del mismo; la determinación de la composición isotópica de uno o más elementos en un compuesto; la determinación de la estructura de compuestos mediante la observación de la fragmentación del compuesto; la cuantificación de la cantidad de un compuesto en una muestra mediante la utilización de métodos diseñados cuidadosamente (la espectrometría de masas no es cuantitativa de forma inherente); el estudio de los fundamentos de la química iónica en fase gaseosa (la química de iones y neutros en el vacío); la determinación de otras propiedades físicas, químicas o incluso biológicas de los compuestos con varios enfoques.

Un espectrómetro de masas es un aparato utilizado para la espectrometría de masas, y produce un espectro de masas de una muestra para analizar su composición. Normalmente, esto se logra mediante la ionización de la muestra, la separación de iones de diferentes masas y el registro de su abundancia relativa mediante la medición de las intensidades del flujo iónico. Un espectrómetro de masas típico incluye tres partes: una fuente iónica, un analizador de masa y un detector.

El tipo de fuente iónica es un factor contribuyente que influencia fuertemente qué tipos de muestras pueden analizarse mediante la espectrometría de masas. La ionización de electrones y la ionización química se utilizan para gases y vapores. En las fuentes de ionización química, el analito se ioniza mediante reacciones químicas moléculas durante las colisiones en la fuente. Dos técnicas que habitualmente se utilizan con las muestras biológicas líquidas y sólidas son la ionización con electropulverización (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Otras técnicas incluyen el bombardeo con átomos rápidos (FAB), la termopulverización, la ionización química a presión atmosférica (APCI), la espectrometría de masas de ión secundario (SIMS) y la ionización térmica.

- 5 La cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) se ha introducido en la química clínica (Vogeser M., Clin. Chem. Lab. Med. 41 (2003) 117-126). Las ventajas de esta tecnología son una especificidad y precisión analíticas altas, y la flexibilidad en el desarrollo de métodos analíticos fiables. En contraste con la cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM), como la tecnología espectrométrica de masas tradicional en la química clínica, se ha observado que la CL-EM/EM es una tecnología robusta y también permite su aplicación en una configuración de laboratorio de rutina a gran escala. Los requisitos para la preparación (limpieza) del material de muestra son limitados en comparación con la CG-EM, no obstante, la desproteinización es preceptiva para los análisis de dianas moleculares pequeñas.
- 10 La mera precipitación proteica, tal y como se presenta en el estado de la materia, puede ser suficiente para algunos métodos de CL-EM/EM, pero para evitar los efectos de la supresión iónica, habitualmente, en los métodos muy sensibles se requieren métodos de extracción más eficientes (Annesley, T.M., Clin. Chem. 49 (2003) 1041-1044). La extracción de fase sólida "fuera de línea" o "en línea", o la extracción de disolvente son las técnicas que habitualmente se utilizan para solventar este problema. La preparación manual respectiva de los protocolos de las muestras, que requiere más tiempo, representa una limitación importante para la aplicación de rutina a gran escala de la CL-EM/EM en el laboratorio clínico. Por consiguiente, la automatización de la preparación de muestras para la CL-EM/EM es una meta abordada mediante la aplicación de diferentes principios técnicos:
- 15
- 20 Las muestras pueden cargarse en placas de 96 pocillos para someterse a la precipitación del lote de proteínas mediante centrifugación (Vogeser, M. y Spohrer, U., Clin. Chem. Lab. Med. 44 (2006) 1126-1130); sin embargo, se trata de un proceso discontinuo debido a que las placas deben transferirse manualmente a la centrifuga. Alternativamente, puede llevarse a cabo la filtración de muestras precipitadas mediante la utilización de placas de filtración y la aplicación de vacío (Williams, M. G., et al., Biomed. Chromatogr. 17 (2003) 215-218). No obstante, la mera precipitación de proteínas no permite la
- 25 concentración del analito.
- La extracción de fase sólida con placas de extracción o con cartuchos individuales de extracción permite una automatización completa con un flujo de trabajo continuo desde la carga de las muestras hasta el análisis con MS (Yang, L., et al., J. Chromatogr. B 809 (2004) 75-80; Alnouti, Y., et al., J. Chromatogr. A 1080 (2005) 99-106; Koal, T., et al., Clin. Chem. Lab. Med. 44 (2006) 299-305; Tarning, J., et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 213-218.). En estos métodos también debe aplicarse vacío o presión aérea positiva durante la extracción, los cuales son técnicamente demandantes.
- 30
- La utilización de las partículas magnéticas se introdujo con éxito en la automatización de los inmunoensayos heterogéneos hace años (Porstmann, T. y Kiessig, S. T., J. Immunol. Methods 150 (1992) 5-21); idealmente, las partículas respectivas utilizadas como fase sólida para la extracción son adecuadas para la automatización, debido a que esta "fase sólida" puede manipularse como un líquido. Actualmente, este principio representa la tecnología predominante en varios sistemas de inmunoensayo automatizados. También se han introducido en los laboratorios de rutina los métodos automatizados para la purificación de DNA basados en partículas magnéticas funcionalizadas (Namvar, L., et al., J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 2058-2064).
- 35
- 40
- Las patentes WO 2005/015216 y WO 2006/075185 describen procesos para la preparación de partículas de polímero recubiertas que contienen cristales superparamagnéticos. Las partículas porosas y con la superficie funcionalizada han reaccionado con, al menos un poliisocianato y, al menos, un diol o, al menos, un epóxido. La patente WO 2005/015216 describe que tales cuentas son útiles en los procesos de adsorción/desorción de manera análoga a los mecanismos en (a) la cromatografía de fase reversa o la cromatografía hidrofóbica, y (b) la cromatografía de interacción hidrofóbica. Particularmente, se describe la adsorción de una mezcla de proteínas por parte de las cuentas funcionalizadas, seguido del fraccionamiento de las proteínas mediante la aplicación de
- 45
- 50 tampones de desorción que contienen (a) concentraciones crecientes de acetonitrilo y (b) concentraciones decrecientes de sulfato de amonio.
- Las cuentas magnéticas funcionalizadas para el aislamiento magnético de la fase reversa, la desalinización, la concentración y el fraccionamiento de mezclas de péptidos complejas están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial de Dynabeads® RPC18 de Invitrogen™. De acuerdo con la descripción del producto, la separación magnética permite fraccionar las muestras complejas y las fracciones pueden aplicarse a dianas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) para el análisis con EM, o analizadas en otras aplicaciones descendentes tales como la MS con electropulverización y la HPLC.
- 55
- Los protocolos de extracción basados en la utilización de partículas magnéticas se han adaptado satisfactoriamente a los análisis con MALDI-TOF. Zhang, X., et al., J. Biomol. Tech. 15 (2004) 167-175 describen el procesamiento de muestras de plasma humano mediante la utilización de una resina de cromatografía de interacción hidrofóbica basada en cuentas magnéticas. Villanueva, J., et al., Anal. Chem. 76 (2004) 1560-1570 describen la preparación automatizada de muestras a partir de muestras de suero humano, en la que los péptidos se capturan y concentran mediante la utilización del procesamiento del lote de fase reversa y de partículas magnéticas, cuyas superficies se han derivatizado con ligandos de fase reversa. No obstante, el documento también describe que en algunos casos, antes de la extracción de fase reversa, los sueros se sometieron de manera adicional a la incubación con aditivos
- 60
- 65

tales como la urea, el DTT o el n-octilglucósido. Además, las proteínas se sustrajeron de los sueros mediante precipitación o filtración, o la albúmina sérica se sustrajo mediante cromatografía de afinidad.

5 Breivold E. et al. "Preparation of Samples for Plasma and Serum Profiling by the Use of Magnetic Bead Technology", póster en INVITROGEN, [en línea] 23 de marzo de 2005 URL:[http://www.invitrogen.com/content/sfs/posters/Preparation of Samples for Plasma and Serum Profiling.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/posters/Preparation_of_Samples_for_Plasma_and_Serum_Profiling.pdf) [recuperado el 16-10-2007] describe un método que requiere la utilización de Dynabeads<sup>®</sup> RPC 18 para sustraer los contaminantes de las muestras peptídicas. El documento también sugiere la utilización de Dynabeads<sup>®</sup> RPC 18 en los ensayos de perfilado sérico dirigidos hacia los péptidos y proteínas del rango de los 700-12.000 Da. Una publicación de Villanueva J. et al. Nature Protocols 1(2) (2006) 880-891 describe un método para el perfilado sérico automatizado mediante la utilización de la espectrometría de masas. Otra publicación de Villanueva J, et al. Anal Chem 76 (2004) 1560-1570 describe un método para el perfilado de péptidos séricos mediante el procesamiento automatizado y asistido por partículas magnéticas, así como la espectrometría de masas MALDI-TOF.

15 Cuando se considera la evaluación cuantitativa, el análisis MALDI-TOF tiene ciertas desventajas. El material de la muestra o la subfracción del mismo debe mezclarse con una solución de un componente de la matriz, y la mezcla se aplica a la diana. Después de esto, el disolvente se evapora. Es importante que, habitualmente, el proceso de evaporación no lleva a una distribución homogénea del analito en la mezcla sobre la diana. Por consiguiente, en relación al punto concreto sobre el que incide el haz del láser para la movilización de la matriz y en relación al material del analito en la fase gaseosa, la cantidad de analito puede variar entre los diferentes puntos. Como consecuencia, el tamaño del pico no refleja de manera fiable la concentración del analito en el material de la muestra o en la subfracción del mismo.

25 Con la intención de obtener una detección cuantitativa mediante la espectrometría de masas, se proporcionan formas alternativas de vaporizar la muestra y/o el material del analito mediante la ionización a presión atmosférica, por ejemplo, la ionización con electropulverización (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI). No obstante, previamente al análisis mediante espectrometría de masas, el analito que debe detectarse cuantitativamente debe enriquecerse o purificarse parcialmente, particularmente cuando el analito debe detectarse en un material de muestra compleja, tal como la sangre, el suero o el plasma. Con esta intención, el paso de separación cromatográfica de la CL-EM/EM es insuficiente cuando se realiza de manera aislada. No obstante, la separación magnética mediante la utilización de cuentas con una superficie hidrofóbica funcionalizada previa al análisis con MS también es insuficiente. Esto es cierto especialmente cuando se busca el análisis cuantitativo de los analitos.

35 Cuando se considera la CL-EM/EM, para reducir suficientemente la complejidad de la muestra y sustraer los contaminantes no deseados, se puede tratar la muestra con un precipitante de manera previa al paso de la LC, para precipitar y sustraer subsiguientemente, por ejemplo, con componentes de alto peso molecular tales como proteínas o carbohidratos. También es posible realizar un paso de extracción líquido/líquido. Además, el paso de LC puede diseñarse en forma de cromatografía bidimensional (2D). En este caso, se realiza una primera cromatografía mediante la utilización de una primera fase estacionaria, y una fracción concreta se someterá a una segunda cromatografía, habitualmente con una segunda fase estacionaria, antes de que el analito se inyecte en el sistema MS/EM. Las soluciones teóricas que se plantean aquí tienen la desventaja de ser poco prácticas, laboriosas, presentan problemas para la automatización y/o requieren equipamientos sofisticados y caros.

45 El problema que la presente invención quiere resolver es la mejora en la preparación de las muestras para el análisis cuantitativo dirigido de analitos moleculares pequeños con medios de espectrometría de masas, es decir CL-EM/EM, en el que los analitos se extraen de matrices biológicas complejas como el suero, el plasma, la sangre total o la sangre total lisada.

50 El análisis de los péptidos preparados a partir de suero o plasma mediante la utilización de partículas magnéticas hidrofóbicas, tal y como se describe en el estado de la materia, se dirige básicamente a moléculas con un peso molecular mayor de 700 Da (Daltons) y de hasta 20.000 Da. En la sangre total, el plasma y el suero hay una infinidad de componentes con un peso molecular inferior a 700 Da. De entre estos, los péptidos son sólo un grupo de entre tantos, incluyendo los aminoácidos, los lípidos y varios metabolitos diferentes de las vías bioquímicas. Por consiguiente, existe una complejidad significativa en las muestras de sangre, plasma y suero en relación a compuestos moleculares pequeños (es decir, de menos de 700 Da).

60 Sorprendentemente, los inventores observaron que la utilización de partículas magnéticas con una superficie hidrofóbica potencia en gran medida el proceso para la extracción de analitos moleculares pequeños desde las matrices biológicas complejas tales como la sangre total, el plasma y el suero. Las partículas magnéticas de acuerdo con la invención pueden unirse de manera reversible a componentes de bajo peso molecular cuando se añaden las partículas a las muestras biológicas. Un hallazgo sorprendente fue que el proceso de unión no se altera cuando los lípidos, los péptidos y las proteínas están presentes en abundancia en la matriz de la muestra. Otro hallazgo muy sorprendente fue que incluso las cantidades muy pequeñas de cuentas magnéticas funcionalizadas son suficientes para extraer y enriquecer los componentes de bajo peso de las matrices de muestras complejas, de forma dependiente a la concentración. Por consiguiente, las cuentas magnéticas son más apropiadas para la separación

de fase reversa, en comparación con las fases estacionarias en forma de columnas de cromatografía, que son más propensas a la obstrucción cuando se procesan materiales de muestra complejos.

5 Se demostró que los hallazgos de los inventores eran especialmente ventajosos cuando las cuentas magnéticas funcionalizadas se utilizaron para la extracción de analitos a partir de plasma, suero y sangre total en los cuales los lípidos, los péptidos y las proteínas son abundantes, entre otros. Tras el paso de unión, los componentes no unidos de las muestras biológicas se pueden separar de manera eficiente de los analitos unidos mediante la separación de las partículas del resto del material de muestra utilizando una fuerza magnética. La elución de los analitos de las partículas proporciona los componentes de bajo peso molecular deseados en una forma suficientemente pura para el análisis mediante espectrometría de masas, tal como el análisis con CL-EM/EM. Sorprendentemente, las partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica pueden utilizarse para extraer analitos moleculares pequeños de las muestras de sangre total que, de manera previa a la extracción, se sometieron a hemólisis. El procedimiento de extracción (=preparación de muestras) de acuerdo con la invención no es únicamente adecuado para la detección cualitativa de un analito deseado con un bajo peso molecular. Sorprendentemente, la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica también permite la detección cuantitativa del analito mediante la utilización de la espectrometría de masas como medio de detección.

#### Resumen de la invención

20 Un aspecto de la presente invención es un método para purificar un compuesto a partir de una muestra biológica líquida compleja, dicho compuesto se selecciona a partir del grupo que incluye itraconazol, sirólimus, tacrólimus, everólimus y ácido micofenólico, y dicho método incluye los pasos de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica que se funcionaliza con un grupo alquilo C18, y el compuesto es capaz de interactuar directamente con la superficie hidrofóbica, o capaz de participar en interacciones hidrofóbicas tras la adición de reactivos de apareamiento iónico, y en el que la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 1,25 mg/ml, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie hidrofóbica, (c) separar las partículas mediante la aplicación de campos magnéticos y sustraer el líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas, caracterizado de manera que en el paso (e) el itraconazol eluye con una mezcla seleccionada a partir del grupo que incluye (i) una mezcla de 1-9 partes en volumen de acetonitrilo y 1 parte en volumen de ácido fórmico (0,1% [v/v]), y (ii) una mezcla de 9 partes en volumen de metanol y 1 parte en volumen de ácido fórmico (0,1% [v/v]), y en el paso (e) el sirólimus, el tacrólimus, el everólimus o el ácido micofenólico eluyen con una mezcla de 9 partes en volumen de metanol y 1 parte en volumen de agua. En una realización particular de la invención la muestra se selecciona a partir del grupo que incluye suero, plasma, sangre total, y sangre hemolizada.

35 Una descripción adicional es la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica para la extracción de un compuesto con un peso molecular de entre 50 y aproximadamente 700 Da a partir de una muestra biológica líquida compleja. Otra descripción aquí es un método para purificar un compuesto con un peso molecular de entre 50 y aproximadamente 700 Da a partir de una muestra biológica líquida compleja, y el método incluye los pasos de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie hidrofóbica, (c) separar las partículas mediante la aplicación de campos magnéticos y sustraer el líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas; en el que la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 1,25 mg/ml y la eficacia de la extracción para el compuesto es de entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 100%. Una descripción adicional es un método para evaluar un compuesto de bajo peso molecular en una muestra biológica líquida mediante la espectrometría de masas, y el método incluye los pasos de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie hidrofóbica, (c) separar las partículas mediante la aplicación de un campo magnético y la sustracción del líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas, (f) fraccionar el eluato del paso (e) mediante cromatografía líquida, y (g) detectar el compuesto en una fracción obtenida en el paso (f) mediante la espectrometría de masas. Una descripción adicional es una partícula magnética porosa con dos superficies diferentes, caracterizada de modo que la primera superficie engulle la luz del poro y se funcionaliza con un grupo funcional seleccionado a partir del grupo que incluye un grupo alquilo C4-C30, un copolímero de 1-vinilpirrolidona y comdivinilbenceno, y un copolímero de estireno y divinilbenceno, y la segunda superficie es la superficie restante alrededor de los poros; en la que la segunda superficie está determinada por la composición química de la fase sólida o funcionalizada con un grupo funcional diferente al grupo funcional de la primera superficie.

#### 60 Descripción detallada de la invención

Ciertos términos se utilizan con un significado particular o se definen por primera vez en la descripción de la presente invención. A efectos de la presente invención, los siguientes términos se definen según las definiciones aceptadas en la materia, cuando éstas existen, excepto cuando dichas definiciones entren en conflicto o estén parcialmente en conflicto con las definiciones descritas a continuación. En caso de que surja un conflicto en la definición, el significado de los términos queda definido por las definiciones que se describen a continuación.

El término "incluye" se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones con el significado de "incluir sin limitarse necesariamente a".

5 Los artículos "un" y "una" se utiliza aquí para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un compuesto" hace referencia a un compuesto o más de un compuesto.

10 Cuando se designa un rango de valores numéricos tal como un rango de concentraciones, el rango se indica mediante la palabra "entre", seguido por el primer valor n1 y un segundo valor n2. Se entiende que el límite inferior del rango designado es el valor igual o mayor al primer valor. Se entiende que el límite superior del rango designado es el valor igual o menor al segundo valor. Por consiguiente, un valor x del rango designado se da de la siguiente manera  $n1 \leq x \leq n2$ .

15 Además, se entiende que el término "aproximadamente" en combinación con un valor numérico n indica un valor x en un intervalo proporcionado por el valor numérico que corresponde al 65% del valor, es decir,  $n - 0,05 * n \leq x \leq n + 0,05 * n$ . En el caso de que el término "aproximadamente" en combinación con un valor numérico n describa una realización preferible de la invención, el valor de n es el más preferible si no se indica lo contrario.

20 La presente invención está relacionada con la potenciación de la preparación de muestras con anterioridad a la detección de analitos, que son compuestos de bajo peso molecular (= BPM). La muestra puede presentar uno o más compuestos de BPM que deben analizarse. Un "compuesto de bajo peso molecular" "molécula pequeña", o una "molécula", "sustancia" o "compuesto" de "bajo peso molecular" es una molécula que muestra un peso molecular inferior a 5.000 Da (Da = Daltons), preferiblemente inferior a 2.000 Da, más preferiblemente inferior a 1.000 Da, lo más preferible inferior a 500 Da.

25 Un compuesto o composición es un "líquido" si a temperatura ambiente y a una presión atmosférica normal el compuesto se presenta en estado "líquido" y forma una fase líquida.

30 Los términos "acuoso", fase "acuosa" y solución "acuosa" describen una fase líquida en la que la porción de disolvente incluye agua. No obstante, la porción de disolvente también puede presentar otros disolventes tales como cosolventes orgánicos miscibles en agua. En vista de la presencia de un codisolvente, se considera que una solución es "acuosa" cuando entre el 30% y el 100%, medido en volumen/volumen [volumen por volumen], de la porción de disolvente es agua.

35 El término "muestra" (o "material de muestra"), tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una mezcla de compuestos en la cual el analito que debe determinarse puede estar presente y a partir de la cual se puede purificar, en caso de que esté presente. Los expertos observarán que la invención es particularmente ventajosa cuando la muestra es una muestra compleja. Una muestra compleja contiene varios compuestos orgánicos e inorgánicos que se quieren separar del analito diana, cuando el analito está presente en la muestra. Habitualmente, la muestra es una muestra biológica. Preferiblemente, la muestra puede incluir cualquier fluido corporal. Algunas de las muestras que se deben evaluar incluyen la sangre, el suero sanguíneo (= suero), el plasma sanguíneo (= plasma), la orina, la saliva, el esputo, el líquido cefalorraquídeo o el líquido sinovial. Otras muestras son muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro, homogenados de células o tejidos bacterianos, de animales, vegetales o fúngicos, y los sobrenadantes aclarados de los mismos.

40 Las muestras más preferibles son la sangre total, el suero, y el plasma, y el plasma y el suero son los más preferibles. Preferiblemente, el plasma sanguíneo es plasma sanguíneo con EDTA, heparina o citrato.

50 De acuerdo con la invención, una muestra biológica preferible es una muestra líquida que puede contener material celular u otro material particulado, por ejemplo, la sangre total. Otras muestras líquidas preferibles son el suero y el plasma.

55 Tal y como apreciarán los expertos en la materia, cualquier ensayo que utilice material de muestra se realiza in vitro. La muestra del paciente se desecha o se almacena posteriormente. La muestra del paciente sólo se utiliza para el método in vitro de la invención, y el material de la muestra del paciente no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente.

60 Además, el término "muestra" incluye un lisado de material biológico o el sobrenadante aclarado del mismo. Un "lisado" puede obtenerse a partir de la muestra en forma de un material que incluye tejido, células, bacterias o virus, en la que la integridad estructural del material se distorsiona, por ejemplo mediante la adición de un disolvente orgánico y/o un detergente y/o una sal caotrópica, o mediante la aplicación de un choque osmótico. El término "lisado" no incluye un tratamiento con una enzima hidrolasa tal como una proteasa o una nucleasa.

65 Se entiende que el término "fase sólida" indica un sustrato insoluble en líquidos acuosos y no acuosos con los cuales se realiza la presente invención.

El término "partícula magnética" indica una partícula con propiedades paramagnéticas o superparamagnéticas. Es decir, la partícula se puede desplazar magnéticamente pero no retiene magnetismo alguno en ausencia de un campo magnético aplicado externamente. Algunos ejemplos de partículas magnéticas y de métodos para la producción de éstas pueden encontrarse en la patente WO 2005/015216 así como en las referencias citadas en este documento. Particularmente se prefiere una partícula magnética polimérica que contiene cristales paramagnéticos o superparamagnéticos. La superficie de una partícula paramagnética polimérica se puede modificar químicamente.

Los términos "funcionalizar" y "funcionalización", tal y como se utilizan aquí, hacen referencia a la modificación química de una fase sólida (sustrato) para proporcionar varios grupos funcionales sobre la superficie de un sustrato. Tal y como se utiliza aquí, se entiende por "superficie funcionalizada" una superficie de sustrato que ha sido modificada para que varios grupos funcionales estén presentes en ésta. La modificación química de la fase sólida incluye uno o más químicos (funcionales) que se unen de manera covalente a la parte sólida o a una parte integral de la fase sólida. Los grupos funcionales son capaces de mediar una interacción física entre un analito y la fase sólida de modo que el analito se une reversiblemente y de forma no covalente. Un ejemplo de grupo funcional es un grupo hidrofóbico.

El término "compuesto biológicamente activo" indica una sustancia sintética o no sintética que produce un efecto en la materia viva o altera una función de la materia viva cuando se pone en contacto con ésta. El término excluye los compuestos que son nutrientes. Habitualmente la actividad biológica es dependiente de la dosis. Un tipo importante de la actividad biológica es la toxicidad de la sustancia.

El significado más aceptado para "CL-EM/EM" es una cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem. La separación cromatográfica líquida con CL-EM/EM, tal como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) u otro sistema de CL, se combina en línea con la espectrometría de masas (EM) para dar como resultado una sensibilidad y especificidad potenciadas. En la CL-EM/EM, el efluente desde una HPLC se dirige hacia la entrada de la EM. El espectrómetro de masas puede ser de diferentes tipos, como los instrumentos cuádrupolos (cuádrupolo simple o triple), instrumentos de tiempo de vuelo, instrumentos de trampa iónica o instrumentos híbridos (por ejemplo, cuádrupolos – tiempo de vuelo). Los compuestos que eluyen del sistema de CL se analizan a tiempo real mientras eluyen. Se pueden realizar dos tipos de escaneos. Uno de los tipos mide las masas de las especies intactas que eluyen del sistema de CL. Esto se puede llevar a cabo mediante el escaneo de un amplio intervalo de masas (por ejemplo, de 100 a 2.000 m/z) o mediante el escaneo de una, dos o varias masas individuales de interés (monitorización iónica seleccionada = SIM). Un segundo tipo de medición se realiza mediante la utilización de la fragmentación en fase gaseosa. La fragmentación puede realizarse en una fuente iónica (por ejemplo, electropulverización, ESI o ionización química a presión atmosférica, APCI), y esto se conoce como "fragmentación en fuente". Preferiblemente, la fragmentación se puede llevar a cabo tras el aislamiento de uno o más iones precursores específicos en una EM en tándem. Los fragmentos iónicos específicos pueden medirse tras la fragmentación. Este tipo de medición se conoce como monitorización de reacción múltiple = MRM o monitorización de reacción seleccionada = SRM. El tipo de medición MRM asegura la mayor sensibilidad y especificidad.

Un problema técnico ejemplar subyacente a la presente invención aparece cuando se deben preparar muestras complejas que contienen abundantes proteínas para un ensayo mediante CL-EM/EM, para obtener compuestos de BPM como analitos. Convencionalmente, para las muestras individuales se realiza una precipitación de proteínas simple. Mientras la precipitación sustrae los compuestos no deseados de la fase líquida, el analito deseado se retiene en la solución. No obstante, el paso de precipitación necesita un paso de centrifugación subsiguiente, o un medio equivalente para separar el precipitado de la fase líquida (sobrenadante), antes de que este último pueda procesarse y analizarse posteriormente. En particular, el paso de centrifugación resulta en un proceso discontinuo. Teniendo en mente una automatización completa del trabajo de preparación de muestras, los inventores se propusieron desarrollar soluciones alternativas y más ventajosas.

Los inventores descubrieron que las partículas magnéticas funcionalizadas proporcionan beneficios inesperados en el proceso de preparación de muestras que precede al análisis de un compuesto de BPM procedente de muestras líquidas complejas. De este modo, un primer aspecto es la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica para la extracción de un compuesto con un bajo peso molecular a partir de una muestra biológica líquida compleja. En una realización preferible, la superficie funcionalizada incluye uno o más grupos hidrofóbicos. En una realización mucho más preferible, la proporción entre partícula/muestra es mayor a 0,1 mg/ml y menor a 100 mg/ml. Aún más preferible, la proporción entre partícula/muestra es mayor a 1 mg/ml.

Aportando una gran ventaja, el método de la invención da como resultado una supresión iónica reducida que tiene un impacto positivo en la calidad del análisis espectrométrico de masas, por ejemplo, mediante CL-EM/EM. Además, el flujo de trabajo mediante la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas de acuerdo con la invención conduce a una pureza mayor del analito del material de muestra. Como consecuencia, la separación por HPLC es menos exigente con respecto a la eficiencia de la separación, reduciendo así los costes y aumentando la velocidad del proceso analítico. Al mismo tiempo, aumenta la vida media de las columnas analíticas de la HPLC.



De manera muy sorprendente, cuando se compara de forma similar el material cromatográfico funcionalizado y las cuentas magnéticas mediante la utilización de una cantidad de aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  de cuentas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica, se pueden recuperar analitos tales como compuestos biológicamente activos y los metabolitos de los mismos a partir de una muestra de 10  $\mu\text{l}$  de sangre total, plasma o suero. Aún más sorprendente fue que la eficacia de la extracción del analito fue de aproximadamente el 70% o mayor.

Por consiguiente, en una realización aún más preferible, la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 1,25 mg/ml y la eficacia de extracción para el componente es de entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 100%. Aún más preferible, la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 3,1 mg/ml y la eficacia de extracción para el componente es de entre aproximadamente el 57% y aproximadamente el 100%. Aún más preferible, la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 6,25 mg/ml y la eficacia de extracción para el componente es de entre aproximadamente el 64% y aproximadamente el 100%. Aún más preferible, la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 9,4 mg/ml y la eficacia de extracción para el componente es de entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 100%. Aún más preferible, la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 12,5 mg/ml y la eficacia de extracción para el componente es de aproximadamente el 100%.

Mucho más preferible, las partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica se utilizan en la extracción de un compuesto con un peso molecular de entre 50 Da y 1.000 Da. Más preferible, el peso molecular del compuesto es de entre 50 Da y 800 Da. Aún más preferible, el peso molecular del compuesto es de entre 100 Da y 500 Da.

Los efectos técnicos de la presente invención también tienen una importancia general en relación al propósito de los métodos de CL-EM/EM completamente automatizados, dado que los inventores demuestran por primera vez la aplicabilidad de una partícula magnética en base a un protocolo de extracción para el análisis dirigido mediante CL-EM/EM cuantitativa. La tecnología de las partículas ofrece ventajas sustanciales en comparación con los protocolos de extracción de fase sólida que implican la utilización de materiales de extracción "inmóviles": manipulación minimizada de componente sólidos (cartuchos, placas); minimización del volumen de las soluciones de extracción líquidas; y, particularmente, la no aplicación de vacío o presión, que son técnicamente demandantes, a los materiales de extracción.

Otro aspecto es un método para purificar un compuesto de bajo peso molecular a partir de una muestra biológica líquida compleja, que incluye los pasos de (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie hidrofóbica, (c) separar las partículas mediante la aplicación de campos magnéticos y sustraer el líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas. Preferiblemente, el compuesto de bajo peso molecular es un compuesto con un peso molecular de entre 50 y aproximadamente 700 Da.

Los expertos conocen bien el procedimiento del paso (c), que consiste en la separación de las partículas magnéticas a partir de la fase líquida restante. Por ejemplo, mediante la aplicación de un campo magnético, se puede atraer a las partículas hacia la pared del contenedor que contiene la muestra líquida y las partículas magnéticas. Entonces se puede aspirar la fase líquida y, de este modo, las partículas se separan con cualquier material adsorbido a éstas desde los compuestos restantes de la muestra. Subsiguientemente, las partículas pueden lavarse con un tampón de lavado. La composición del tampón de lavado debe escogerse para que el analito deseado se mantenga unido a las partículas.

Las partículas adecuadas y preferibles para llevar a cabo la presente invención son nanopartículas magnéticas y partículas poliméricas que contienen partículas de pigmento magnético. No obstante, se pueden utilizar otras partículas. Otra partícula preferible es una partícula porosa que proporciona más de una superficie funcionalizada y que proporciona un acceso restringido a una superficie funcionalizada particular. Mucho más preferibles son las partículas que tienen una superficie funcionalizada con uno o más grupos hidrofóbicos para dar como resultado un área hidrofóbica de superficie.

Las partículas magnéticas (nanopartículas) con una superficie hidrofóbica pueden generarse mediante la unión de grupos hidrofóbicos a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , óxidos mezclados de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y óxidos de iones metálicos bivalentes o trivalentes, o mezclas de los mismos. Con este fin, los procedimientos se describen en la patente WO 00/26927 y en otros documentos. En un enfoque alternativo, se pueden preparar partículas poliméricas que contienen cristales paramagnéticos o superparamagnéticos, tal y como se describe en las patentes WO 2005/015216 y WO 2006/075185. En estos casos, la modificación química está dirigida hacia el polímero. Los copolímeros de estirendivinilbenceno pueden activarse, por ejemplo, mediante la utilización de 1,4-butandioldiglicidiléter y glicidol. Los grupos funcionales epoxi que quedan se pueden modificar mediante la utilización de, por ejemplo, alcilalcoholes. De manera alternativa, se pueden utilizar los copolímeros de estirendivinilbenceno magnéticos modificados con epoxi disponibles comercialmente (por ejemplo, Dynabead M270 epoxi, INVITROGEN Corporation, 1600 Faraday Ave, Carlsbad, CA 92008, catálogo N° 143-01).

Mucho más preferible, el grupo hidrofóbico con el que la superficie o parte de la superficie de la fase sólida se funcionaliza se selecciona a partir del grupo que incluye un residuo hidrocarburo alifático lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, en el que el residuo aromático puede incluir un residuo heterocíclico.

5 De acuerdo con esta descripción, la superficie de las partículas magnéticas está, más preferiblemente, funcionalizada con residuos de alquilo C4-C30, más preferible C8-C25, aún más preferible C18. Otras partículas hidrofóbicas preferibles son, por ejemplo, los copolímeros de 1-vinilpirrolidona y divinilbenceno, y estireno y divinilbenceno, respectivamente.

10 La fase sólida de las partículas magnéticas puede ser una fase sólida porosa o no porosa. Una fase sólida porosa tiene un tamaño medio de poro de entre unos 50 y unos 1000 nm, más preferible de entre unos 50 y unos 300 nm, aún más preferible de aproximadamente 200 nm. Lo más preferible, la fase sólida está funcionalizada exclusivamente en la superficie que rodea la luz del poro. Mediante la utilización de tal fase sólida porosa, también conocida como "material de acceso restringido", se puede lograr la función simultánea de un tamiz molecular,  
15 además de la interacción entre el analito y la superficie funcionalizada. Es decir, los compuestos de alto peso molecular se excluyen del acceso a la luz del poro debido al impedimento esteárico y, por consiguiente, se excluyen de la interacción con la superficie funcionalizada de la fase sólida.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente ventajoso para la separación de un compuesto de BPM biológicamente activo a partir de una muestra biológica líquida.

Preferiblemente, la muestra líquida se selecciona a partir del grupo que incluye sangre total, suero y plasma. Más preferiblemente, la muestra líquida también puede ser sangre hemolizada, es decir, una muestra de sangre en la que la integridad de los constituyentes celulares se ha desorganizado. Por ejemplo, los eritrocitos de la sangre simple se pueden analizar mediante la aplicación de un choque osmótico.  
25

Cuando se utilizan partículas magnéticas con una superficie hidrofóbica, un compuesto de BPM tiene cierto carácter lipofílico y es capaz de interactuar directamente con la superficie hidrofóbica. De forma alternativa, el compuesto de BPM es capaz de participar en interacciones hidrofóbicas tras la adición de reactivos de apareamiento iónico.  
30

En este contexto, el carácter lipofílico hace referencia a que el compuesto de BPM muestra una gran afinidad de unión a las cuentas magnéticas de una solución acuosa con un contenido elevado de agua, y esta unión puede liberarse mediante la disminución del contenido de agua y el aumento del contenido orgánico en la solución.

35 A modo de ejemplo, se considera que un contenido de agua de entre el 100% y el 90% es una solución acuosa con un alto contenido de agua. El aumento en la solución de la concentración de un disolvente orgánico miscible en agua, tal como el metanol al 10%-80%, da como resultado una solución acuosa con un contenido bajo en agua.

40 En este contexto, otros disolventes orgánicos pueden ser el acetonitrilo, el etanol u otros alcoholes alifáticos o compuestos orgánicos miscibles en agua, tal como la dimetilformamida (DMF) o el dimetilsulfóxido (DMSO). Los reactivos de apareamiento iónico pueden ser, por ejemplo, el ácido trifluoroacético, sales de amonio o sales de sulfonio.

45 Particularmente, la invención se lleva a cabo para purificar compuestos de BPM biológicamente activos, por ejemplo, a partir de muestras líquidas complejas tales como fluidos corporales. Mucho más preferible, los compuestos de BPM biológicamente activos son compuestos orgánicos solubles en matrices con un contenido elevado de agua, por ejemplo, en sangre total o suero, y solubles también en mezclas de agua y disolventes orgánicos.

50 La solubilidad de un compuesto de BPM puede influenciarse por el pH de la solución si la protonación y desprotonación del compuesto de BPM es posible.

Los compuestos de BPM típicos para los que la invención es muy adecuada son los compuestos farmacológicos. Ésta es especialmente útil para los inmunosupresores, tales como la rapamicina, el tacrólimus, el MPA, el everólimus, el sirólimus, y los metabolitos de los mismos. Otros compuestos de bajo peso molecular son los metabolitos endógenos, tales como el ácido fólico, las vitaminas y las hormonas.  
55

Un analito diana también preferible, de acuerdo con esta descripción, es una droga de abuso. Preferiblemente, una droga de abuso se selecciona a partir del grupo que incluye la anfetamina, la cocaína y los metabolitos de la cocaína, como la benzoilecgonina; la metanfetamina, el opio y los derivados opiáceos, los cannabinoides como el tetrahidrocannabinol, y la fenciclidina. Otro analito diana también preferible es el folato, especialmente el folato total que se encuentra tanto en el plasma sanguíneo como en los glóbulos rojos de la sangre. Algunos fármacos inmunosupresores conocidos son, por ejemplo, el micofenolato de mofetilo (MMF), la rapamicina (RAPA, también conocida como sirólimus) y el tacrólimus (FK-506). La monitorización de fármacos terapéuticos de los fármacos inmunosupresores es especialmente importante en los pacientes trasplantados, así como en los pacientes que padecen el SIDA (véase, por ejemplo, Drug Ther Perspect 17(22) (2001) 8-12). La mayoría de los pacientes que se someten al trasplante de un órgano sólido requieren una terapia inmunosupresora de por vida para prevenir el  
60  
65

rechazo del aloinjerto. La utilización de la monitorización de fármacos terapéuticos (TDM) junto a la evaluación clínica de estos pacientes es particularmente importante debido a que muchos de los agentes inmunosupresores tienen un rango terapéutico estrecho, están asociados a varias toxicidades y presentan un potencial de interacción con otros fármacos.

5 Por consiguiente, un fármaco inmunosupresor como analito preferible se selecciona a partir del grupo que incluye ciclosporina (CsA), micofenolato de mofetilo (MMF), rapamicina (RAPA también conocido como sirólimus), tacrólimus (FK-506), azatioprina (AZA), y metilprednisolona (MP).

10 Un analito diana presente en los glóbulos rojos sanguíneos también es preferible. Los analitos preferibles que deben medirse a partir de una muestra de sangre total diferencialmente hemolizada son el sirólimus, el tacrólimus y el folato.

15 El micofenolato de mofetilo es un profármaco. Tras su administración oral, el micofenolato de mofetilo (MMF) es sometido a una hidrólisis rápida en el intestino y en la sangre para formar su metabolito activo, el ácido micofenólico (MPA). El MMF está disponible ampliamente y está aprobado en los EE.UU. y en el RU para la prevención del rechazo de aloinjerto renal, hepático o cardíaco, en combinación con corticosteroides y ciclosporina. El fármaco ha demostrado su superioridad frente a la azatioprina en relación a la reducción de la incidencia de rechazo agudo de aloinjertos renales. La concentración mínima terapéutica está en el rango de los 1-3,5 mg/l. El MMF puede medirse en el plasma y en la sangre total.

20 El tacrólimus es un antibiótico macrólido que fue aprobado por primera vez por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. en 1994 para la prevención del rechazo del aloinjerto hepático. Es hasta 100 veces más potente que la ciclosporina in vitro, y clínicamente se asocia con una mayor reducción de la incidencia del rechazo del tejido.  
25 El tacrólimus ha demostrado su eficacia tanto en la terapia inmunosupresora primaria en pacientes que han sido sometidos a varios procedimientos de trasplante, así como en la terapia de rescate para los pacientes con un rechazo de aloinjerto agudo refractario tras el trasplante hepático o renal. La concentración mínima terapéutica está en el rango de los 5-20  $\mu$ g/l.

30 Dado que, al menos, parte del tacrólimus presente en la circulación está compartimentado en los eritrocitos, en la medición clínica rutinaria de este fármaco se utiliza una muestra de sangre total. El tacrólimus se puede detectar, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC con espectrometría de masas (EM), ensayo de radioreceptor (RRA), o mediante un inmunoensayo (IA). Las últimas dos metodologías no detectan con la misma sensibilidad el tacrólimus y algunos de sus varios metabolitos. Esto puede llevar a una interferencia en el  
35 procedimiento utilizado (Murthy, J. N., et al., Clin. Biochem. 31 (1998) 613-617). Al menos, en la detección de algunos metabolitos del tacrólimus se puede considerar que el procedimiento de la HPCL-EM es el mejor método de elección. No obstante, todos los procedimientos mencionados con anterioridad requieren la extracción del tacrólimus de la sangre total. Habitualmente, se utiliza el acetonitrilo en la rutina clínica para la extracción de tacrólimus a partir de la sangre total y parece que no existe un método que permita la medición en línea del tacrólimus a partir de la  
40 muestra de sangre total.

45 Como el tacrólimus, el sirólimus es un antibiótico macrólido. Fue aprobado por primera vez por la FDA de EE.UU. en 1999 para la prevención del rechazo del aloinjerto tras el trasplante renal, y además ha demostrado resultados prometedores cuando se utiliza de forma aguda en combinación con la ciclosporina y los corticosteroides. In vitro, el sirólimus es hasta 100 veces más potente que la ciclosporina, y clínicamente puede mostrar sinergismo con la ciclosporina y permitir así una reducción de la dosis de ciclosporina. La concentración mínima terapéutica está en el rango de los 5-15  $\mu$ g/l.

50 Así como con el tacrólimus, una cantidad significativa del sirólimus está presente dentro de los eritrocitos. Por consiguiente, se requiere la extracción de una muestra de sangre total independientemente del método de detección que se utilice. En la rutina clínica, se somete una muestra sospechosa de contener sirólimus a una HPLC y el sirólimus se detecta mediante luz ultravioleta (UV) o mediante EM/EM. Recientemente, también se ha descrito un inmunoensayo enzimático de micropartículas (Jones, K., et al., Clinical Therapeutics 22/supl. B (2000) B49-B61).

55 El folato es un nombre colectivo de un grupo de moléculas relacionadas que difieren en los estados de oxidación. Los folatos forman parte del grupo de las vitaminas B hidrosolubles y son importantes como coenzimas para el metabolismo de la homocisteína y en la transferencia de grupos monocarbono requerida en la replicación del DNA. El estado inadecuado de los folatos se relaciona con un riesgo incrementado de defectos del tubo neural, se asocia con enfermedades cardiovasculares, anemia, con ciertos tipos de cáncer y con la enfermedad de Alzheimer. Las  
60 concentraciones séricas o plasmáticas del folato reflejan la ingesta dietética reciente, mientras que las concentraciones de folatos en los eritrocitos son más indicativas de las reservas corporales (Gunter, E. W., et al, Clin. Chem. 42 (1996) 1689-1694; Fazili, Z., et al, Clin. Chem. 51 (2005) 2318-2325; Pfeiffer, C. M., et al, Clin. Chem. 50 (2004) 423-432). El folato eritrocítico total (folato de los glóbulos rojos sanguíneos = folato-RBC) es la mejor medida del estado del folato corporal. Estudios recientes han demostrado que el 5-metiltetrahidrofolato es el  
65 vitámero de folato dominante en los eritrocitos circulantes. Para el diagnóstico de la deficiencia de folato se recomienda que las determinaciones se realicen tanto en plasma o suero como en los eritrocitos, dado a que más

del 95% del folato se localiza en estos últimos. La concentración en los eritrocitos refleja de manera más realista el estatus real de folato.

5 Otro descubrimiento sorprendente fue que cuando el método de purificación se utiliza para la preparación de muestras, éste proporciona un compuesto de BPM en una forma adecuada para el análisis mediante la cromatografía líquida y la espectrometría de masas. Por consiguiente, otro aspecto descrito aquí es un método para evaluar un compuesto de bajo peso molecular en una muestra biológica líquida mediante la espectrometría de masas, y éste incluye los pasos de a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie, (c) separar las partículas mediante la aplicación de campos magnéticos y sustraer el líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas, (f) fraccionar el eluato del paso (e) mediante cromatografía líquida, y (g) detectar el compuesto en una fracción obtenida en el paso (f) mediante la espectrometría de masas. Preferiblemente, el compuesto de bajo peso molecular es un compuesto con un peso molecular de entre 50 y aproximadamente 700 Da.

15 Preferiblemente, en el paso (g) el compuesto se detecta mediante CL/EM. No obstante, se logra una forma de análisis más preferible mediante la utilización de la cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM).

20 Se observó que el método para la preparación de muestras descrito da como resultado unos extractos muy puros obtenidos a partir de material de muestras humanas. Cuando se aplica la cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem se obtiene como efecto una reducción en las interferencias analíticas. La supresión iónica representa la interferencia analítica más relevante de la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM). La supresión iónica es el resultado de la presencia de un exceso de moléculas matriz de analitos no diana en la fuente iónica durante la ionización. Los efectos de la supresión iónica producen límites de concentración menores en la cuantificación con los métodos de CL-EM y, por consiguiente, limitan la aplicabilidad de la CL-EM en el campo del diagnóstico in vitro en general. La supresión iónica puede tener un impacto diferencial en el rendimiento de la ionización obtenido para un analito diana y su compuesto estándar interno individual, respectivamente. La falta de precisión puede aumentar debido a la supresión iónica dado que la gravedad de la supresión iónica puede diferir sustancialmente entre las muestras (en particular, entre las muestras de calibración y las muestras de los pacientes).

35 Una ventaja esencial de la técnica de preparación de muestras que se describe aquí es la opción de una automatización completa de todos los pasos que se incluyen en el proceso de extracción. En particular, cuando se combina con la técnica de la cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM), ésta permite el desarrollo de instrumentos analíticos dedicados a su utilización en los laboratorios clínicos de rutina. Hoy en día, la introducción de muestras no procesadas en un instrumento es un prerrequisito para la aplicación de plataformas analíticas en el laboratorio clínico. Esto se puede lograr con la técnica de preparación de muestras descrita aquí. Otro prerrequisito es que la plataforma analítica tenga una gran capacidad de rendimiento junto a unos tiempos de ejecución analíticos cortos y una especificidad analítica elevada. Las respectivas funciones se llevan a cabo de mejor forma mediante la CL-EM/EM, en particular cuando se comparan con las técnicas de CL-EM de etapa única y MALDI-TOF.

45 En una realización preferible, la detección de un analito mediante la utilización de un método de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo mediante la espectrometría de masas. En comparación con otras técnicas de detección, la espectrometría de masas aporta una mayor especificidad, especialmente si se combina con la espectrometría de masas en tándem. Con la espectrometría de masas en tándem, la detección es un proceso bidimensional.

50 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente descripción, y el verdadero ámbito de ésta se describe en las reivindicaciones. Debe comprenderse que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos descritos sin alejarse del espíritu de la descripción.

55 Descripción de las figuras

Figuras 1 a) - d): Cromatogramas representativos de la monitorización de la reacción múltiple de CL-EM/EM obtenidos a partir de diferentes muestras sometidas a la preparación de muestras

60 a) inyección de una solución pura de itraconazol, no diluido

b) inyección del extracto obtenido a partir de la solución pura de itraconazol (concentración inicial de 1.000 µg/l; dilución de unas diez veces durante el proceso de extracción)

65 c) inyección del extracto obtenido a partir de una muestra de suero enriquecida con itraconazol (concentración inicial de 1.000 µg/l; dilución de unas diez veces durante el proceso de extracción)

d) inyección del material obtenido mediante la precipitación de proteínas simple (estado de la materia) con acetonitrilo a partir de la muestra de suero enriquecida con itraconazol (concentración inicial de 1.000 µg/l; dilución de unas diez veces durante el proceso de extracción)

5 Figura 2: Línea de calibración para la medición del itraconazol obtenida a partir de los materiales de calibración sometidos a la preparación de muestras mediante micropartículas. Ordenadas: respuesta CL-EM/EM; estándar interno del área del pico de itraconazol. Abscisas: Concentración en mg/l de itraconazol.

10 Figuras 3 a) - c): Cromatogramas representativos de la monitorización de la reacción múltiple de CL-EM/EM obtenidos a partir de diferentes muestras de sangre total de pacientes sometidas a la preparación de muestras

a) que contienen tacrólimus, resultados representativos para

15 a.1) 2,1 µg/l,  
a.2) 10,5 µg/l, y  
a.3) 39,7 µg/l

20 b) que contienen sirólimus

b.1) 2,1 µg/l,  
b.2) 10,5 µg/l, y  
b.3) 47,2 µg/l

25 c) que contienen everólimus

c.1) 2,1 µg/l,  
c.2) 11,7 µg/l, y  
c.3) 43,9 µg/l

30 Figura 4: Cromatogramas representativos de la monitorización de la reacción múltiple de CL-EM/EM obtenidos a partir de diferentes muestras de suero de pacientes sometidas a la preparación de muestras que contienen ácido micofenólico. A estándar; B muestra del paciente.

35 Ejemplo 1

Análisis del itraconazol a partir de suero

40 Para la demostración de la invención se utiliza el fármaco antimicótico itraconazol (Registro CAS/Número EC (RN) 84625-61-6) como primer analito diana molecular pequeño representativo.

45 En un caso ejemplar se utilizan partículas magnéticas funcionalizadas con C18 comercialmente disponibles (= cuentas) (Dyna<sup>®</sup> Dynabeads<sup>®</sup> RPC18 (Prod. N° 102.01), Invitrogen, Karlsruhe, Alemania; 50 mg/ml, diámetro medio de la partícula de 1 µm). Las cuentas tienen una superficie modificada con grupos alquilo C18. Hasta ahora, tales partículas se especifican para la preparación de muestras de suero para el análisis proteico basado en la EM.

50 Las muestras de suero de los pacientes humanos se extraen mediante la utilización de partículas magnéticas. En general, se sigue el protocolo de manejo estándar proporcionado por el fabricante. Se transfieren 15 µl de las partículas resuspendidas a unos tubos de reacción estándar de polipropileno de 1,5 ml, colocados en un separador magnético de partículas (Concentrador magnético de partículas MPC-S Dynal, producto N° 120.20, Invitrogen). Se introduce un imán permanente en el aparato separador, lo que lleva a la inmovilización de las cuentas en la pared de los tubos. El líquido libre de partículas se sustrae con una pipeta; entonces, se sustrae el imán del aparato separador.

55 Se dispensan 250 µl de ácido tricloroacético al 0,1% [volumen/volumen] en los tubos para el condicionamiento de las cuentas; los precipitados de las cuentas se redisuelven mediante el pipeteado múltiple de líquido de los tubos. El imán se aplica de nuevo y se sustrae el ácido tricloroacético. Este paso de condicionamiento se repite. Las cuentas condicionadas se resuspenden en 50 µl de ácido fórmico (al 0,1% [volumen/volumen]); Se añaden 15 µl de la solución estándar interna (R51012 (Vogeser, M., et al. Clin. Chem. Lab. Med. 41 (2003) 915-920), 1.000 µg/l en metanol/agua (1/1 partes en volumen)) y 15 µl de suero. El contenido de los tubos se aspira y se vacía varias veces con una pipeta para mezclarlo. Se deja que las cuentas adsorban los analitos durante dos minutos. La matriz de la muestra se sustrae con una pipeta tras la nueva aplicación del imán. Las cuentas se lavan dos veces con 250 µl de agua. Tras el segundo paso de lavado, las cuentas se resuspenden en 75 µl de acetonitrilo y 75 µl de ácido fórmico (0,1% [volumen/volumen]) para la elución del analito. Tras dos minutos, las cuentas se capturan magnéticamente y los sobrenadantes se transfieren a los viales de la HPLC. Todo el procedimiento de extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente. El análisis del extracto con CL-EM/EM se lleva a cabo tal y como se describe aquí con

65

anterioridad (Vogeser, M., et al. Clin. Chem. Lab. Med. 41 (2003) 915-920) mediante la utilización de un instrumento Waters Micromass Quattro Ultima Pt.

#### Ejemplo 2

5 Tasa de recuperación del procedimiento de extracción del itraconazol y propiedades de la supresión iónica

10 Para investigar la tasa de recuperación del procedimiento de extracción y caracterizar las propiedades de la supresión iónica de todo el método analítico, se utilizan soluciones puras de itraconazol (1.000 µg/l y 100 µg/l, respectivamente, en metanol/agua (10/90 [volumen/volumen])), y una muestra de suero enriquecida con itraconazol a una concentración de 1.000 µg/l. La inyección de 7 µl de la solución pura con una concentración de 100 µg/l dio como resultado un área de pico en el trazado de MRM del itraconazol de 80.978 (media de tres inyecciones). La solución pura con una concentración de 1.000 µl se somete a la extracción basada en partículas y se inyectan 7 µl del extracto. Se observa un área media del pico de 67.765. Dado que el protocolo de extracción incluye una dilución de la muestra en un factor de 10, estos resultados se corresponden a una tasa de recuperación de la extracción del 84%. La muestra de suero enriquecida con itraconazol se extrae de la misma forma y se observa un pico medio del área de 61.124, que es un 9% menor al que se observa con la solución pura con la misma concentración del analito. La señal ligeramente menor puede ser resultado de una menor tasa de recuperación del método de extracción cuando se aplica al suero, a un efecto de supresión iónica causado por la matriz del suero residual, o una combinación de ambos. Para su comparación, la muestra de suero enriquecida se precipita con acetonitrilo (100 µl de muestra, 900 µl de acetonitrilo); se observa un área media del pico de 49.095. Así, se observa que la eficacia global de la extracción (incluyendo la tasa de recuperación y los efectos de la supresión iónica) del protocolo basado en cuentas es superior en comparación con la precipitación de proteínas.

#### 25 Ejemplo 3

Validación con muestras de pacientes tratados con itraconazol

30 Se lleva a cabo un protocolo de validación en tres series analíticas independientes. En cada serie se lleva a cabo una calibración de cinco puntos mediante la utilización de un material de calibración comercialmente disponible para la medición del itraconazol (2.000 µg/l, 1.000 µg/l, 500 µg/l, 250 µg/l, y 125 µg/l; Recipe, Munich, Alemania). Las alícuotas de la combinación de suero de los pacientes tratados con itraconazol se analizaron por triplicado en cada serie para calcular un coeficiente de variación total (n=9). Se analizan en tres series los materiales de control de calidad comercialmente disponibles (Clin-Check, Recipe, Munich, Alemania) en dos intervalos de concentración (concentraciones diana 150 µg/l y 2.900 µg/l).

35 Las líneas de calibración lineales ( $r > 0,99$ ) se obtienen en todas las series. Se observa un coeficiente de variación total de 3,4% para la combinación de suero (concentración media de 380 µg/l); todas las muestras de control de calidad se encuentran dentro de los rangos predefinidos aceptados ( $\pm 10\%$  de las concentraciones diana).

#### 40 Ejemplo 4

Análisis de muestras de sangre que contienen inmunosupresores

45 Para la demostración de la invención se utilizan como analitos muestras de sangre total de pacientes tratados con fármacos inmunosupresores. Los fármacos inmunosupresores analizados son el tacrólimus, el sirólimus y el everólimus.

50 En un caso ejemplar se utilizan partículas magnéticas funcionalizadas con C18 comercialmente disponibles (= cuentas) (Dyna<sup>®</sup> Dynabeads<sup>®</sup> RPC18 (Prod. N° 102.01), Invitrogen, Karlsruhe, Alemania; 50 mg/ml, diámetro medio de la partícula de 1 µm). Las cuentas tienen una superficie modificada con grupos alquilo C18. Hasta ahora, tales partículas se especifican para la preparación de muestras de suero para el análisis proteico basado en la EM.

55 Las muestras de sangre total de los pacientes humanos se extraen mediante la utilización de partículas magnéticas. Se transfieren 50 µl de las partículas resuspendidas a unos tubos de reacción estándar de polipropileno de 1,5 ml, colocados en un separador magnético de partículas (concentrador magnético de partículas MPC-S Dynal, producto N° 120.20, Invitrogen). Se introduce un imán permanente en el aparato separador, lo que lleva a la inmovilización de las cuentas en la pared de los tubos. El líquido libre de partículas se sustrae con una pipeta; entonces, se sustrae el imán del aparato separador.

60 Se dispensan 250 µl de ácido tricloroacético al 0,1% [volumen/volumen] en los tubos para el condicionamiento de las cuentas; los precipitados de las cuentas se redisuelven mediante el pipeteado múltiple de líquido de los tubos. El imán se aplica de nuevo y se sustrae el ácido tricloroacético. Este paso de condicionamiento se repite. Las cuentas condicionadas se resuspenden en 50 µl de ácido fórmico (al 0,1% [volumen/volumen]); Se añaden 50 µl de la solución estándar interna y 50 µl de la muestra de sangre total. El contenido de los tubos se aspira y se vacía varias

65

veces con una pipeta para mezclarlo. Se deja que las cuentas adsorban los analitos durante dos minutos. La matriz de la muestra se sustrae con una pipeta tras la nueva aplicación del imán. Las cuentas se lavan dos veces con 250  $\mu$ l de agua. Tras el segundo paso de lavado, las cuentas se resuspenden en 100  $\mu$ l de metanol en agua (90+10). Tras dos minutos, las cuentas se capturan magnéticamente y los sobrenadantes se transfieren a los viales de la HPLC. Todo el procedimiento de extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente. El análisis del extracto con CL-EM/EM se lleva a cabo tal y como se describe con anterioridad (Vogeser, M., Spöhrer, U., Clin. Chem Lab. Med. 44 (2006) 1126-1130) mediante la utilización de un instrumento Waters Micromass Quattro Ultima Pt.

Los cromatogramas típicos se muestran en la figura 3.

#### Ejemplo 5

Análisis de una muestra de suero de un paciente que contiene ácido micofenólico

Para la demostración de la invención se utilizan como analitos muestras de suero de pacientes tratados con fármacos micomofetilfenolatos. El ácido micofenólico (MPA) es un metabolito activo del micomofetilfenolato que se utiliza como analito y se determina mediante HPCL-UV

En un caso ejemplar se utilizan partículas magnéticas funcionalizadas con C18 comercialmente disponibles (= cuentas) (Dynal<sup>®</sup> Dynabeads<sup>®</sup> RPC18 (Prod. N<sup>o</sup> 102.01), Invitrogen, Karlsruhe, Alemania; 50 mg/ml, diámetro medio de la partícula de 1  $\mu$ m). Las cuentas tienen una superficie modificada con grupos alquilo C18. Hasta ahora, tales partículas se especifican para la preparación de muestras de suero para el análisis proteico basado en la EM.

Las muestras de sangre total de los pacientes humanos se extraen mediante la utilización de partículas magnéticas. En general, se sigue el protocolo de manejo estándar proporcionado por el fabricante. Se transfieren 50  $\mu$ l de las partículas resuspendidas a unos tubos de reacción estándar de polipropileno de 1,5 ml, colocados en un separador magnético de partículas (concentrador magnético de partículas MPC-S Dynal, producto N<sup>o</sup> 120.20, Invitrogen). Se introduce un imán permanente en el aparato separador, lo que lleva a la inmovilización de las cuentas en la pared de los tubos. El líquido libre de partículas se sustrae con una pipeta; entonces, se sustrae el imán del aparato separador.

Se dispensan 250  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 0,1% [volumen/volumen] en los tubos para el condicionamiento de las cuentas; los precipitados de las cuentas se redisuelven mediante el pipeteado múltiple de líquido de los tubos. El imán se aplica de nuevo y se sustrae el ácido tricloroacético. Este paso de condicionamiento se repite. Las cuentas condicionadas se resuspenden en 50  $\mu$ l de ácido fórmico (al 0,1% [volumen/volumen]); Se añaden 50  $\mu$ l de la solución estándar interna y 50  $\mu$ l de la muestra de sangre total. El contenido de los tubos se aspira y se vacía varias veces con una pipeta para mezclarlo. Se deja que las cuentas adsorban los analitos durante dos minutos. La matriz de la muestra se sustrae con una pipeta tras la nueva aplicación del imán. Las cuentas se lavan dos veces con 250  $\mu$ l de agua. Tras el segundo paso de lavado, las cuentas se resuspenden en 100  $\mu$ l de metanol en agua (90+10). Tras dos minutos, las cuentas se capturan magnéticamente y los sobrenadantes se transfieren a los viales de la HPLC. Todo el procedimiento de extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente. El análisis del extracto con CL-EM/EM se lleva a cabo tal y como se describe con anterioridad (Vogeser M, et al.) mediante la utilización de un instrumento de HPCL-UV.

Los cromatogramas típicos se muestran en la figura 4.

#### Ejemplo 6

Preparación de nanopartículas de magnetita hidrofobizada

En general, la preparación de los ferrofluidos se realizó de acuerdo con la patente US 3.843.540 y con Ramirez, L. P., et al., (Macromol. Chem. Phys. 204 (2003) 22-31).

Se disuelven 14,6 g de cloruro férrico y 12 g de cloruro ferroso tetrahidrato en 50 ml de agua destilada y se añaden 40 ml de la solución de hidróxido de amonio. Tras la coprecipitación de las nanopartículas de magnetita, se añade ácido oleico (45% [peso/peso] con respecto a la magnetita) y se calienta la suspensión hasta los 70°C durante 30 min. Después de esto, se eleva la temperatura hasta los 110°C para evaporar el agua y el exceso de amonio. El sedimento se enfría a temperatura ambiente y se lava varias veces con agua destilada.

#### Ejemplo 7

Preparación del ferrofluido en base a agua

En general, la preparación de los ferrofluidos se realizó de acuerdo con la patente US 3.843.540 y con Ramirez, L. P., et al., (Macromol. Chem. Phys. 204 (2003) 22-31).

Se añaden 5 g de polvo de magnetita del ejemplo 6 (preparación de nanopartículas de magnetita hidrofobizada) a 30 g de octano. La dispersión se vierte en una solución que consiste en 120 g de agua y SDS (12% [peso/volumen] con respecto a la fase dispersada que consiste en octano, magnetita y ácido oleico). La suspensión se mezcla durante 1 h. y se sonica con un UP200s (Dr. Hielscher GmbH) en un baño refrigerado con hielo. El octano se evapora a 80°C y se añade agua de vez en cuando para compensar el agua coevaporada.

#### Ejemplo 8

Preparación de partículas de látex de siembra en base a poliestireno

Se disuelven 6 g de SDS en 475 ml agua y se agitan a 225 r.p.m. en un vaso de reacción. La solución se desgasifica con nitrógeno. Se añaden 26 ml de estireno y la emulsión resultante se agita durante 50 min. a 80°C en una atmósfera de argón. Se añaden 25 ml de una solución acuosa de carbonato de hidrógeno de sodio (10% [peso/volumen]). La solución se agita durante 10 min. más. La reacción de polimerización se inicia mediante la adición de 2,5 ml de una solución de peroxodisulfato de amonio (326 mg en 2,5 ml de agua desgasificada). Tras 4 h. a 80°C, se añaden 3 M de ácido clorhídrico para neutralizar el pH. La suspensión se filtra en caliente. El contenido sólido se ajusta al 4% [peso/volumen].

#### Ejemplo 9

Preparación de partículas magnéticas mediante la polimerización por crecimiento de semillas

Paso 1:

Se dispersan 3 ml de tolueno con 152,4 mg de peróxido de bisbenzoilo en 30 ml de una solución acuosa de SDS (0,25 % [peso/volumen]). Se añade 1 ml de las partículas de látex de siembra del ejemplo 8 (preparación de partículas de látex de siembra en base a poliestireno) y se agita la dispersión durante 24 h.

Paso 2:

Se homogenizan 2 ml de hexadecano, 10 ml de agua y 30 mg de SDS en una emulsión. A esta emulsión se le añaden 125 ml del ferrofluido del ejemplo 7 (preparación del ferrofluido en base a agua) y se mezcla con la dispersión del paso 1 en un reactor.

Paso 3:

Se dispersan 5,8 g de ciclohexanol, 3,75 g de glicidimetacrilato y 2,5 g de etilenglicoldimetacrilato en 50 ml de SDS acuoso (0,25% [peso/volumen]) y se agitan a temperatura ambiente durante 3 horas. La dispersión resultante se añade a la dispersión del paso 1 y se agita durante otras 24 h. a temperatura ambiente. Se añade una solución de 2 g de PVA (Erkol W 25 / 140) en 50 ml de agua y la mezcla de reacción se desgasifica durante 20 min. mediante la utilización de nitrógeno. La polimerización se lleva a cabo a 70°C durante 24 h. El precipitado resultante se lava dos veces en agua y metanol.

#### Ejemplo 10

Hidrólisis específica por tamaño de poro y modificación con C8 de la superficie

Se tratan 0,5 g de las partículas del ejemplo 9 (preparación de partículas magnéticas mediante la polimerización por crecimiento de semillas) durante 48 h con 10 ml de ácido poliestirensulfónico acuoso (1% [peso/volumen]). El producto se filtra y se lava varias veces con agua para neutralizar el pH.

Se añaden las partículas a una solución de 14 mg de hidróxido de potasio en 3,5 g de octanol caliente. La reacción tiene lugar durante 10 horas a 70°C. La mezcla de reacción se diluye con 20 ml de dioxano y se refrigera hasta la temperatura ambiente. Las partículas se filtran y se lavan varias veces con agua.

El producto se redispersa en 10 ml de una solución de 0,1 N de hidróxido de sodio y se mezcla durante 15 h. a temperatura ambiente para inactivar los grupos funcionales epoxi restantes. El producto filtrado se lava con agua y se redispersa en agua destilada hasta un contenido sólido del 2% [peso/volumen].

#### Ejemplo 11

Comparación de la tasa de recuperaciones lograda con la precipitación proteica, la extracción de la fase sólida y mediante la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas con C18



El análisis de las diferentes soluciones y extractos que contienen el analito de ejemplo itraconazol se llevó a cabo con una CL-EM/EM; se registraron las áreas de pico respectivas del seguimiento de la MRM (monitorización de reacción múltiple). La muestra 1 era una solución pura de 200 µg/l de itraconazol en una mezcla 9/1 (proporción de partes en volumen) de metanol/ácido fórmico (0,1% [v/v]). La muestra 2 se obtuvo a partir de una muestra de plasma con una concentración de itraconazol de 2.000 µg/l mediante la precipitación proteica con metanol/acetonitrilo (proporción 9/1), en la que se mezclan 100 µl de la muestra con 900 µl de la mezcla de precipitación; el precipitado se sedimenta mediante centrifugación durante 12 min. con 16.000 g. La muestra 3 se obtuvo a partir de una muestra de plasma con una concentración de itraconazol de 2.000 µg/l mediante la extracción de la fase sólida con una columna de extracción C18 comercialmente disponible (Isolute™ C18) que contiene 100 mg de material de extracción. Cada columna se equilibró con 1 ml de agua seguido de metanol; se cargaron 100 µl de la muestra de plasma; la columna se lavó con 1 ml de agua; para la elución del analito se aplicó 1 ml de metanol/ácido fórmico (0,1%) (9/1). Las muestras 4-1 a 4-5 se prepararon a partir de una muestra de plasma con una concentración de itraconazol de 2.000 µg/l mediante la extracción con partículas magnéticas funcionalizadas con C18 (Dynabeads® RPC 18 de Invitrogen™). De acuerdo con la realización del fabricante la suspensión concentrada de estas partículas contenía 12,5 mg/ml del material de extracción. Se preparó una suspensión de trabajo de las partículas (mediante la sustracción de la matriz de la suspensión original tras la inmovilización magnética, el lavado con ácido tricloroacético (0,1%), la resuspensión en etanol); esta solución de trabajo contenía 1,25 mg/ml del material de extracción. Se extrajeron alícuotas de 10 µl de la muestra de plasma con diferentes volúmenes de esta solución de trabajo (muestra 4-1 con 100 µl; muestra 4-2 con 75 µl; muestra 4-3 con 50 µl; muestra 4-4 con 25 µl; muestra 4-5 con 10 µl. La cantidad absoluta del material de extracción aplicada a los 10 µl de muestra fue de 125 µg, 94 µg, 62,5 µg, 31 µg, y 12,5 µg, respectivamente, para las muestras 4-1 a 4-5. Para la extracción, la suspensión de cuentas se transfirió a unos tubos de reacción de polipropileno en las concentraciones descritas: la matriz (etanol) se sustrajo durante la inmovilización magnética de las partículas. El imán se sustrajo de las muestras; se añadieron el plasma y 100 µl de agua, y se homogeneizó la mezcla con una pipeta. Subsiguientemente, la matriz líquida se sustrajo durante la inmovilización magnética de las partículas; las partículas se resuspendieron y se lavaron con 500 µl de agua; el fluido se sustrajo durante la inmovilización magnética después de un minuto. Para la elución, las partículas se resuspendieron en 100 µl de metanol/ácido fórmico (0,1%) (9/1). El extracto se recuperó durante la inmovilización magnética de las partículas. Todos los experimentos de extracción se realizaron por duplicado. Todos los duplicados de las muestras (1 - 4-5, A/B) se analizaron con una CL-EM/EM por duplicado en un lote. Se calcularon las áreas de pico medias. El área del pico media de la solución pura fue de 205.176; el área del pico media del extracto de plasma obtenido mediante la precipitación proteica fue de 143.957; el área del pico media del extracto de plasma obtenido mediante la extracción de la fase sólida fue de 207.100. Las áreas de pico medias de las muestras 4-1 a 4-5 fueron las siguientes: 216.811; 143.596; 130.349; 116.332; 83.632. Por consiguiente, la eficacia de extracción de la precipitación proteica fue del 70%, es decir, aproximadamente el 70% de la cantidad del analito (itraconazol en este caso) presente en la muestra se recuperó mediante el proceso de extracción; la eficacia de extracción de la extracción de la fase sólida mediante la utilización de 100 mg de material de extracción (material columnar) fue del 100%; la eficacia de extracción de la extracción mediante partícula magnética fue de aproximadamente el 100% mediante la utilización de 125 µg de material de extracción, 70% mediante la utilización de 94 mg de material de extracción, 64% mediante la utilización de 62,5 µg de material de extracción, 57% mediante la utilización de 31 µg de material de extracción, y 40% mediante la utilización de 12,5 mg. Este experimento muestra el sorprendente efecto de que 12,5 µg de partículas magnéticas funcionalizadas con C18 tuvieron aproximadamente la misma eficacia de extracción que 1.000 µg del material de extracción funcionalizado con C18 utilizado en un protocolo de extracción de fase sólida para el análisis cuantitativo de un analito molecular pequeño representativo mediante la CL-EM/EM. Esto se corresponde con una proporción de masas de 1/80.

#### 45 Ejemplo 12

##### Preparación de muestras para la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

50 Como analito representativo, el fármaco antimicótico itraconazol se extrajo de las muestras de los pacientes mediante la utilización de pequeñas cantidades de micropartículas ferromagnéticas modificadas con C18. Los extractos se sometieron al análisis con CL-EM/EM. Se evaluaron la recuperación de la extracción, la linealidad y la reproducibilidad del método de extracción. 125 µg de micropartículas funcionalizadas fueron suficientes para extraer el analito diana de los 10 µl de plasma, con una tasa de recuperación de aproximadamente el 100%. Mediante la aplicación de este protocolo de extracción se lograron la linealidad ( $r > 0,9$ ) y reproducibilidad de los resultados cuantitativos (coeficientes de variación interensayo  $\leq 7\%$ ). Las micropartículas ferromagnéticas modificadas con C18 pueden utilizarse para extraer de manera eficiente analitos moleculares pequeños a partir de matrices biológicas complejas para el análisis cuantitativo mediante la utilización de la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. En base a esta observación, el desarrollo de módulos de preparación de muestras completamente automatizados para la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem es una opción interesante.

Las muestras de plasma se extrajeron mediante la utilización de micropartículas ferromagnéticas modificadas C18 (Dyna<sup>®</sup> Dynabeads<sup>®</sup> RPC18, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania; 12,5 mg/mL; diámetro medio de la partícula de 1 µm). Para preparar una suspensión de trabajo de micropartículas se transfirieron 200 µl de la suspensión original de

partículas hasta unos tubos de reacción estándar de polipropileno de 2 ml, colocados en un separador magnético de partículas (concentrador magnético de partículas MPC-S Dynal, producto N° 120.20, Invitrogen). Se introdujo un imán permanente en el aparato separador, llevando a la inmovilización de las micropartículas sobre la pared del tubo. El fluido libre de partículas se sustrajo con una punta de pipeta; entonces se retiró el imán del aparato separador. Para el condicionamiento de las cuentas se dispensó 1 ml de ácido triclorórico al 0,1% en el tubo; el precipitado de partículas se redisolvió mediante el pipeteado múltiple. La barra de imán se introdujo de nuevo y se sustrajo el ácido triclorórico. Las cuentas condicionadas se resuspendieron en 2 ml de agua para obtener una cantidad de 1.25 µg de material de extracción funcionalizado con C18 en 1 µl de esta suspensión de trabajo de partículas magnéticas.

Para la preparación de las muestras de plasma para la cuantificación del itraconazol mediante la CL-EM/EM, se pipetearon 10 µl de una solución estándar interna (compuesto R51012 (14); 1,000 µg/l en metanol/agua (1/1)) en un tubo de reacción de 1,5 ml, y se añadieron 10 µl de plasma. Para la mezcla, se aspiró el contenido de los tubos y se dispensó con la punta de pipeta varias veces. Entonces se añadieron 100 µl de suspensión de trabajo de partículas magnéticas; tras la mezcla, se dejó que el material de extracción adsorbiera el analito durante dos minutos. Entonces, la matriz de la muestra se sustrajo con una punta de pipeta tras la inserción de nuevo del imán en el aparato separador. El imán se sustrajo, se añadieron 500 µl de agua para el lavado y, tras la inmovilización de las partículas, se desechó el agua. Para la elución del analito, se añadieron 100 µl de acetonitrilo/ácido fórmico (0,1%) (90/10), se resuspendieron las partículas y, finalmente, se inmovilizaron para permitir la transferencia del extracto a los viales de HPLC. El análisis con CL-EM/EM del extracto se llevó a cabo mediante la utilización de un instrumento Waters Micromass Quattro Ultima, similar al descrito con anterioridad (Vogesser M, et al. Clin Chem Lab Med 41 (2003) 915-920.), pero sin un lavado posterior.

Para investigar la tasa de recuperación del procedimiento de extracción y para caracterizar las propiedades de la supresión iónica del método analítico completo, se extrajo una muestra de plasma que contenía 2.000 µg/l de itraconazol; el extracto se analizó mediante CL-EM/EM y se registró el área del pico en el seguimiento monitorizado de reacción múltiple del itraconazol. Para la comparación, se analizó una solución pura de itraconazol en agua/metanol (200 µg/l, ya que el protocolo de extracción incluía la dilución). Las áreas de pico medias de los cuatro experimentos difirieron en menos del 5% entre la solución pura y los extractos de plasma. Así, fueron suficientes 12,5 µg de material de extracción para la extracción de recuperación completa de 1 µl de plasma, evitando la supresión iónica. Habitualmente, los protocolos de extracción estándar que utilizan cartuchos de extracción de fase sólida extraen 1 µl de muestra con 1 mg de material de extracción.

Se realizó un protocolo básico de validación en cuatro series analíticas independientes. En cada serie se llevó a cabo la calibración en cinco puntos (2.000, 1.000, 500, 250, 125 µg/l). Se observaron funciones de calibración lineales en todas las series ( $r > 0.99$ ). En estas series, las alícuotas de itraconazol que contenían combinaciones de plasma en tres niveles diferentes de concentración se analizaron por triplicado para calcular el coeficiente de variación total ( $n=12$ ). Se observaron CVs de entre 5,4% y 7,0% para las concentraciones de analito medias dentro del intervalo comprendido entre 111 µg/l y 2.652 µg/l.

**REIVINDICACIONES**

1.Un método para purificar un compuesto a partir de una muestra biológica líquida compleja, dicho compuesto se selecciona a partir del grupo que incluye itraconazol, sirólimus, tacrólimus, everólimus y ácido micofenólico, y dicho método incluye los pasos de

5 (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrofóbica que se funcionaliza con un grupo alquilo C18, y el compuesto es capaz de interactuar directamente con la superficie hidrofóbica, o capaz de participar en interacciones hidrofóbicas tras la adición de reactivos de apareamiento iónico, y en el que la proporción partículas/muestra es igual o mayor a 1,25 mg/ml, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo así el compuesto en la superficie hidrofóbica, (c) separar las partículas mediante la aplicación de campos magnéticos y sustraer el líquido, (d) lavar las partículas de manera opcional, (e) eluir el compuesto a partir de las partículas,

10  
15 caracterizado de manera que

en el paso (e) el itraconazol eluye con una mezcla seleccionada a partir del grupo que incluye

20 (i) una mezcla de 1-9 partes en volumen de acetonitrilo y 1 parte en volumen de ácido fórmico (0,1% [v/v]), y  
(ii) una mezcla de 9 partes en volumen de metanol y 1 parte en volumen de ácido fórmico (0,1% [v/v]),

y en el paso (e) el sirólimus, el tacrólimus, el everólimus o el ácido micofenólico eluyen con una mezcla de 9 partes en volumen de metanol y 1 parte en volumen de agua.

25 En una realización particular de la invención la muestra se selecciona a partir del grupo que incluye suero, plasma, sangre total, y sangre hemolizada.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra se selecciona a partir del grupo que incluye suero, plasma, sangre total, y sangre hemolizada.

Fig. 1 a)

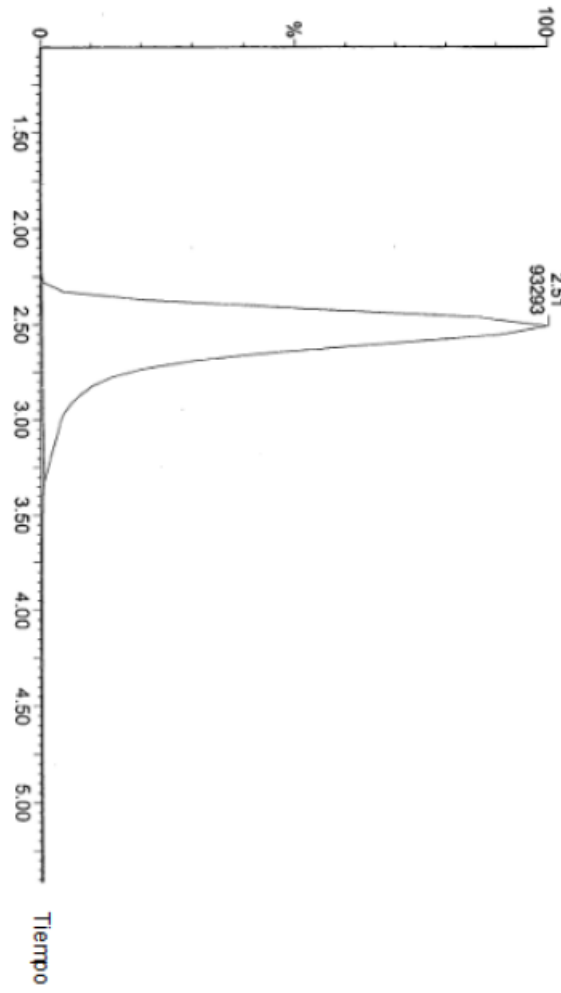


Fig. 1 b)

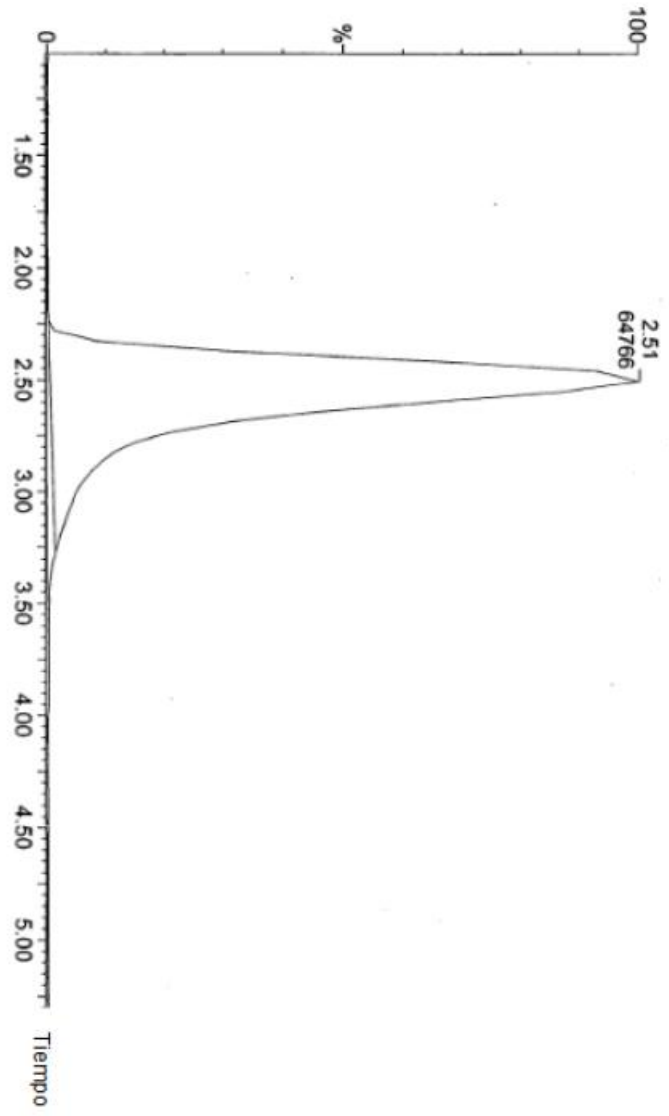


Fig. 1 c)

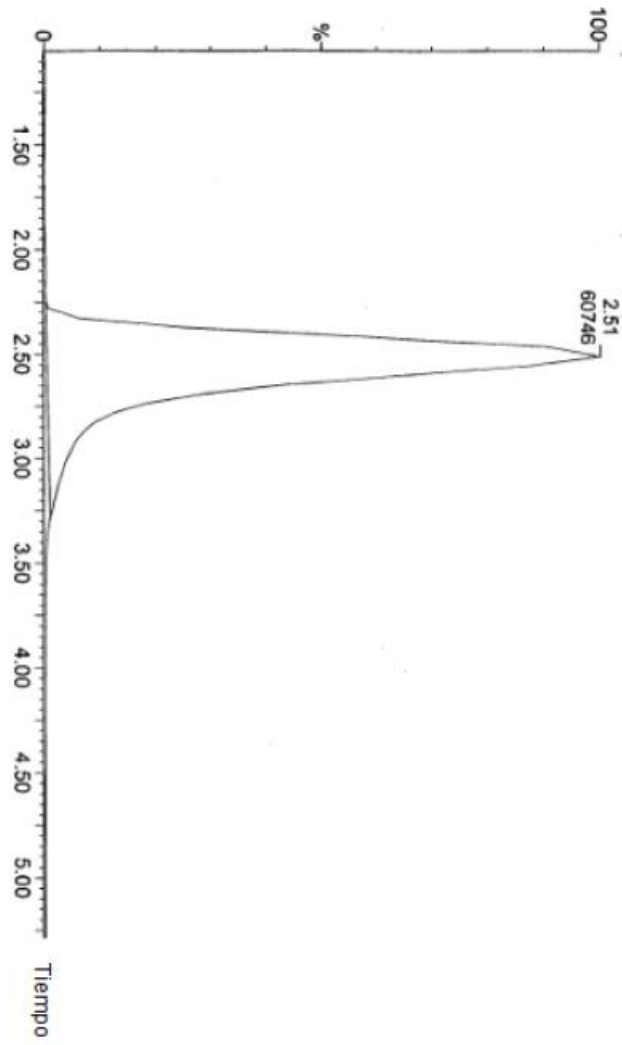


Fig. 1 d)

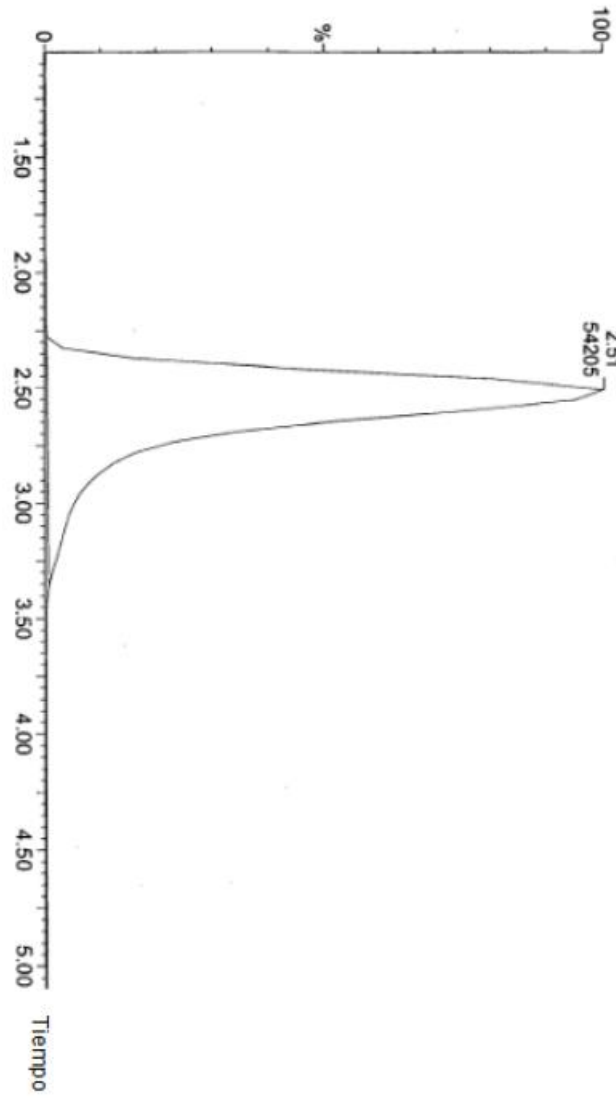
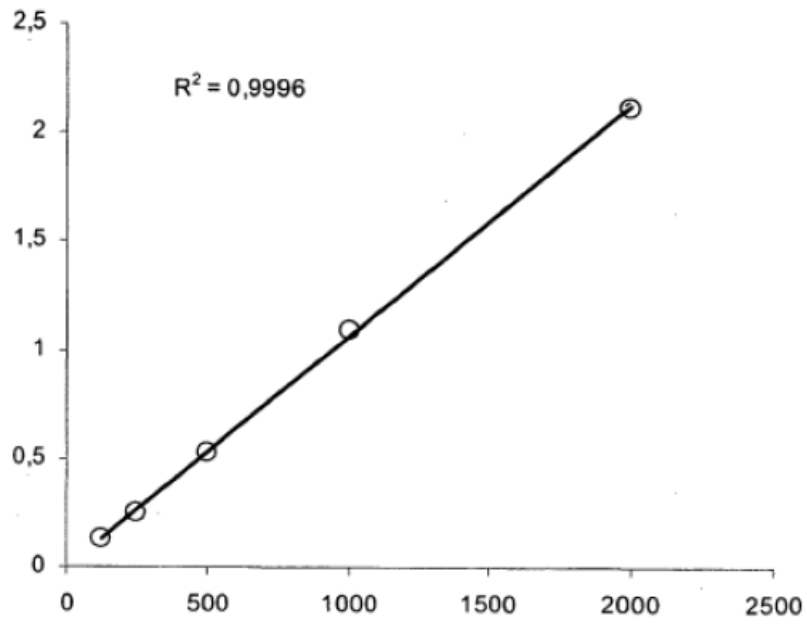
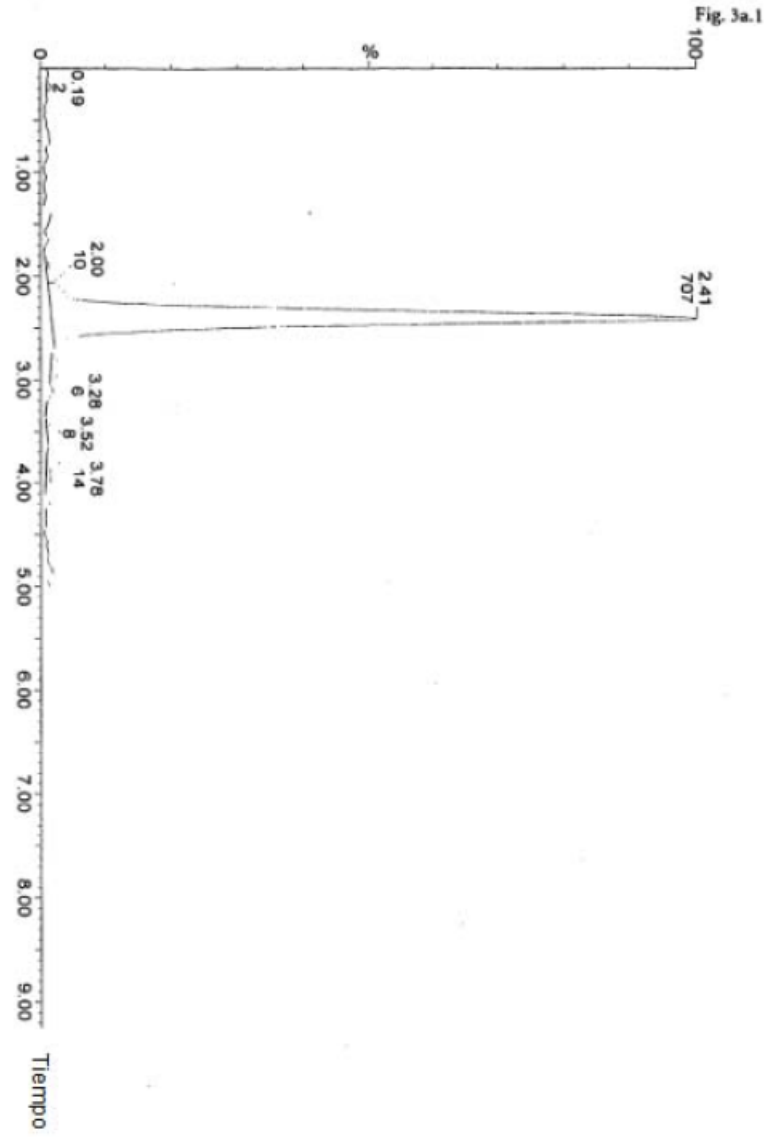
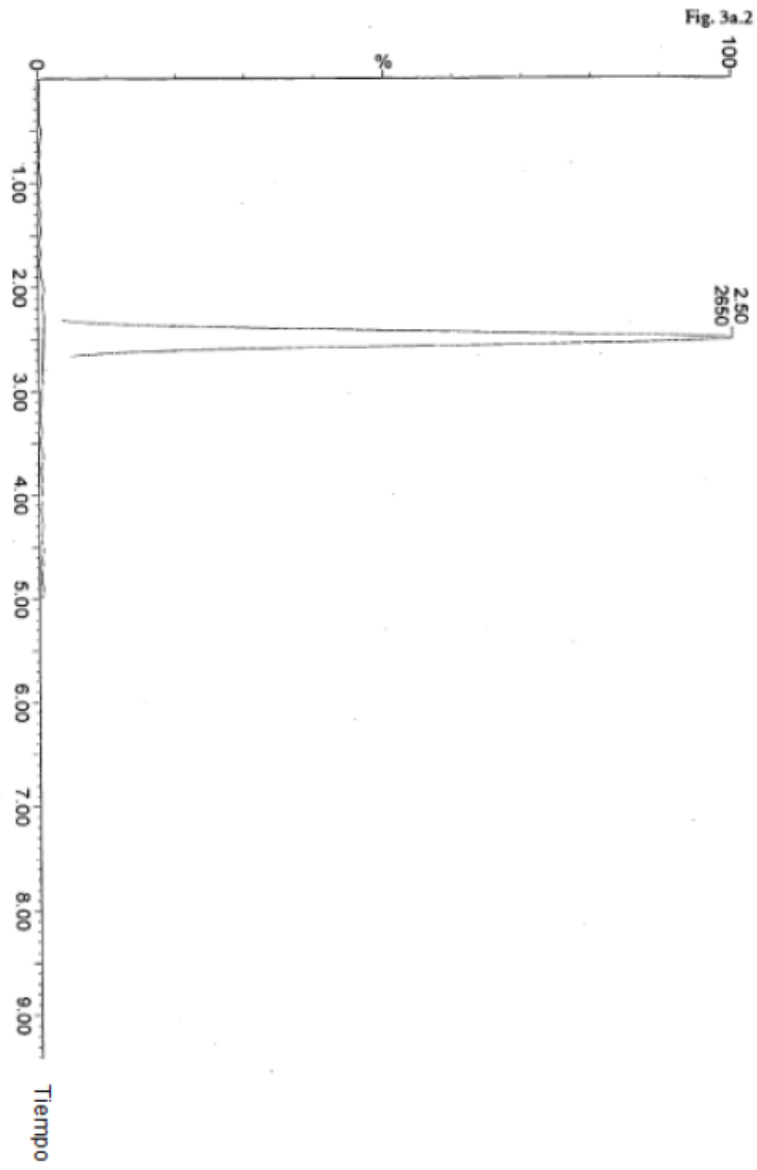


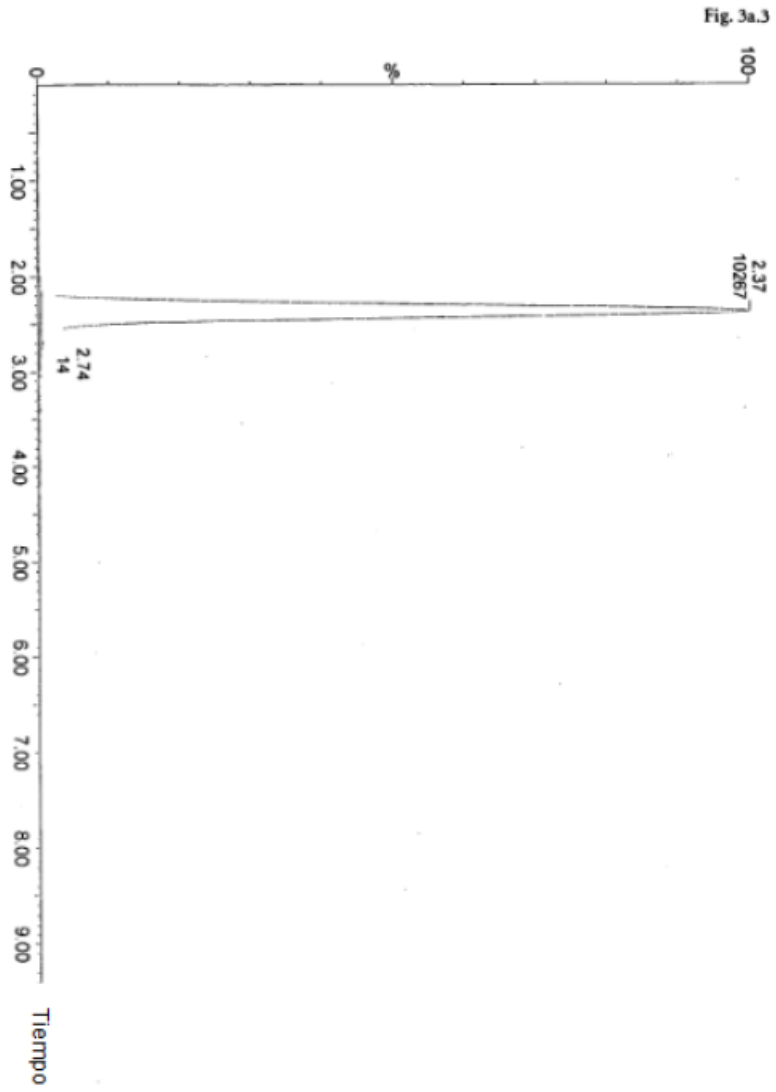
Fig. 2

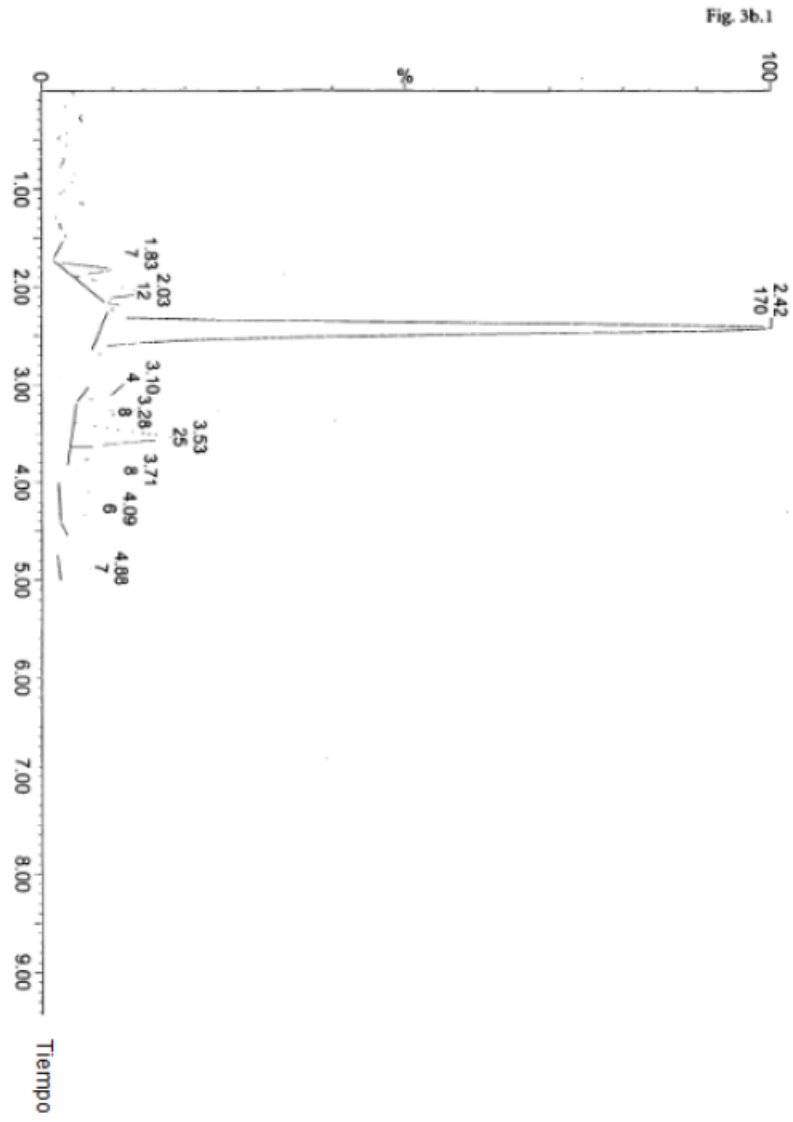


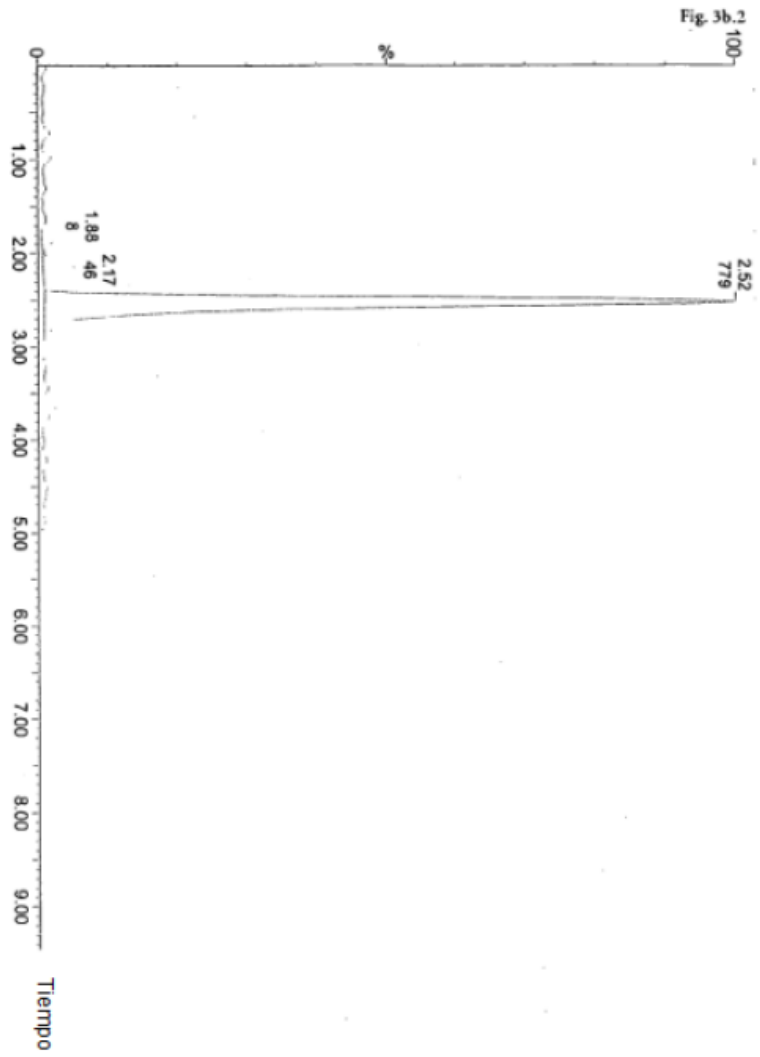


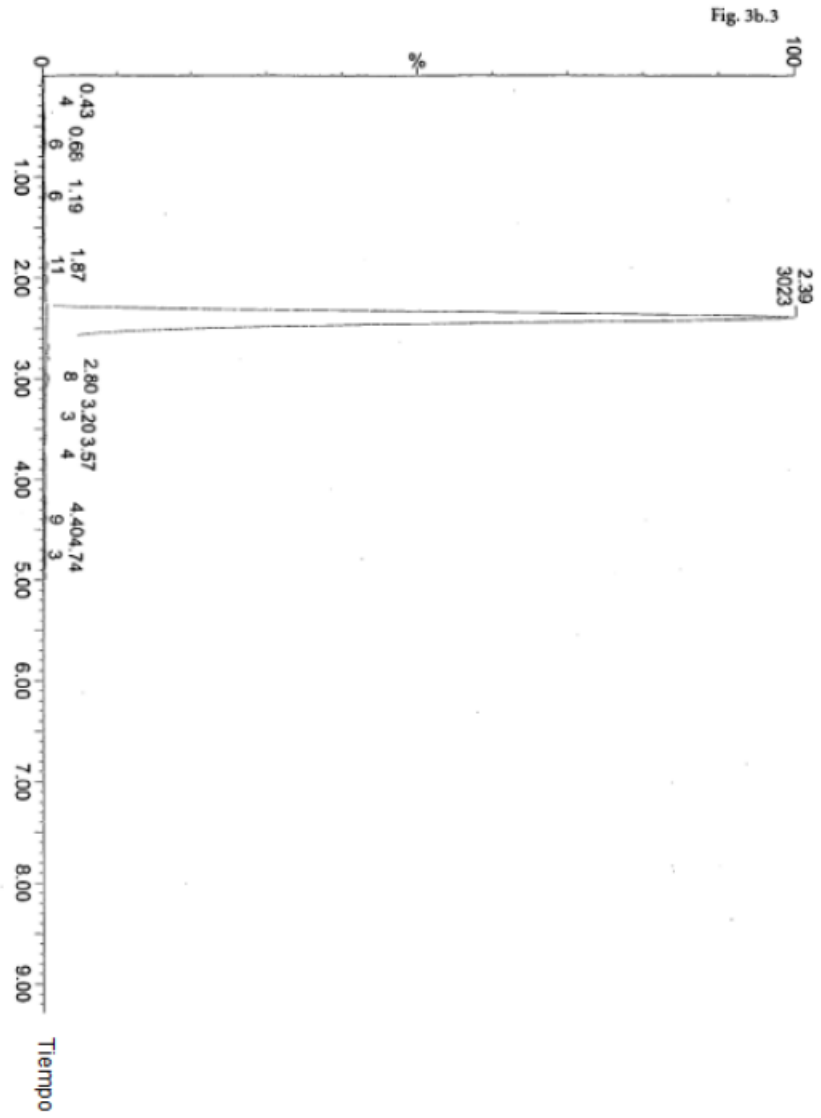


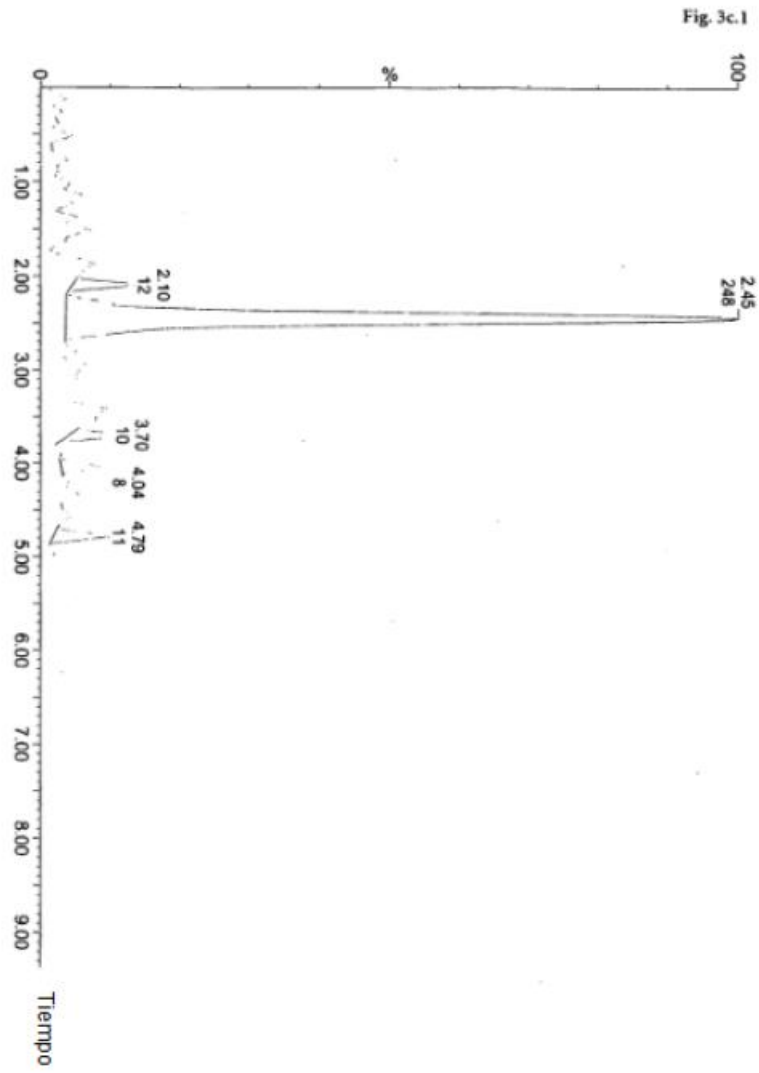


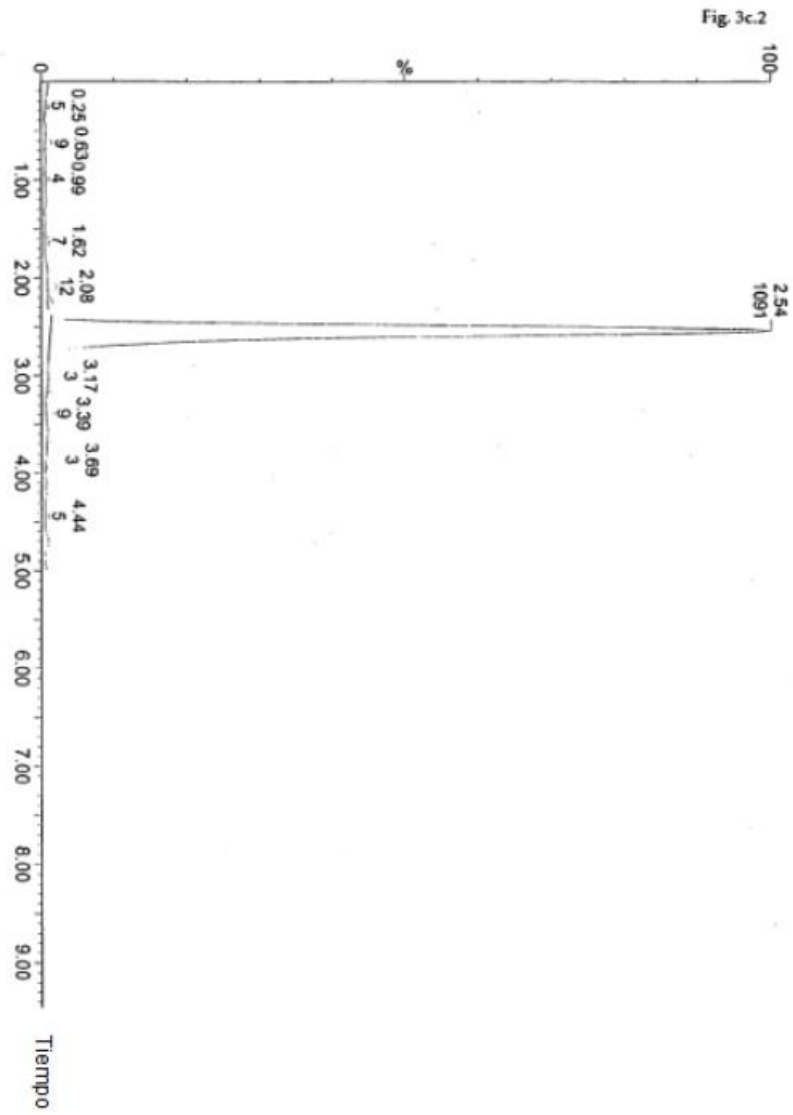














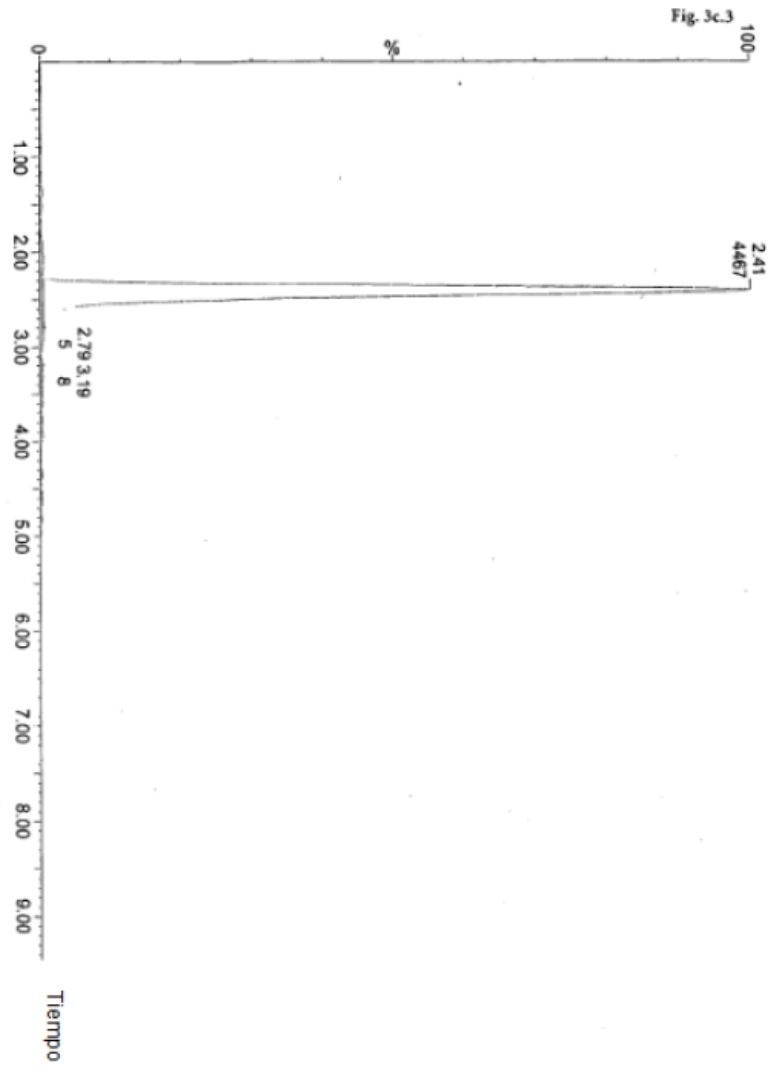


Fig. 4

