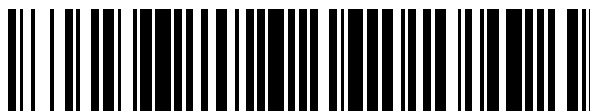


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 319**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 30/06</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/38</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/72</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/02</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/60</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2007 PCT/EP2007/004923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2007 WO07140961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2007 E 07725792 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2032979**

54 Título: **Hemólisis diferencial de una muestra de sangre completa**

30 Prioridad:

**06.06.2006 EP 06011604**

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

**20.11.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOBOLD, UWE;  
DUELFFER, THOMAS;  
HERRMANN, RUPERT y  
VON DER ELTZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 690 319 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

Hemólisis diferencial de una muestra de sangre completa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida que se sabe o se sospecha que comprende glóbulos rojos y se sospecha o se sabe que comprende células eucariotas, comprendiendo el procedimiento las etapas de procesar dicha muestra líquida con un agente solubilizante de membrana en condiciones apropiadas para lisar las membranas celulares de los glóbulos rojos y, al mismo tiempo, no causar la precipitación de los  
10 constituyentes de la muestra, someter la muestra procesada a una separación cromatográfica y detectar el analito. La hemólisis diferencial de los glóbulos rojos es ventajosa en un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida que puede comprender tanto eritrocitos como células nucleadas. La solubilización diferencial de los glóbulos rojos se puede combinar fácilmente con una metodología de detección en línea, como CL-EM, y es ventajosa en la detección de muchos analitos, por ejemplo, en la detección de folato o de fármacos inmunodepresores, como tacrolimus o sirolimus.

15 **Antecedentes de la invención**

Cuanto más constituyentes están presentes en una muestra, más difícil es el análisis de un analito diana comprendido en la misma. Los glóbulos rojos contienen una cantidad espectacular de proteínas y componentes de baja masa molecular que interfieren potencialmente con un analito que se desea detectar en un líquido biológico como la sangre completa.  
20 Esta es una de las principales razones por las que, en la práctica clínica rutinaria, se usan preferentemente plasma sanguíneo (a menudo referido simplemente como plasma, es decir, una muestra de sangre completa anticoagulada, privada de células y eritrocitos) o suero sanguíneo (a menudo referido simplemente como suero, es decir, sangre completa coagulada, privada de células, eritrocitos y de la mayoría de las proteínas del sistema de coagulación, especialmente de fibrina/fibrinógeno), respectivamente. Las muestras de sangre completa también tienden a ser más difíciles de manejar, por ejemplo, en comparación con el suero o el plasma. La sangre completa tiende a ser menos estable y la lenta ruptura de los eritrocitos dificulta una medición fiable de bastantes analitos de interés.

Además, en este momento no parece factible utilizar una muestra de sangre completa en muchos de los procedimientos de detección en línea existentes. Por ejemplo, no es posible usar una muestra de sangre completa en un procedimiento de diagnóstico clínico rutinario que requiera una etapa de separación basada en cromatografía de líquidos (CL). La separación cromatográfica líquida rutinaria se basa en general en una columna que consiste esencialmente en una unidad de filtro o frita para proteger el material de la columna y el material de columna requerido para la separación del analito o analitos de interés. Si se aplica sangre completa a dicha columna, la columna se bloqueará bastante pronto o incluso de inmediato, según el tamaño y el sistema de la columna. Este problema hace que sea simplemente imposible utilizar sangre completa en un procedimiento de detección en línea en combinación con un procedimiento de CL como, por ejemplo, el preferente en el diagnóstico clínico rutinario. En la actualidad, parece que es esencial una separación/manipulación apropiada de una muestra de sangre, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración, precipitación o extracción de analito, antes de que dicha muestra procesada se pueda analizar de forma adecuada y fiable.

40 Como se indicó anteriormente, el suero o el plasma se pueden obtener a partir de sangre completa y utilizar en la detección de un analito. En teoría, las células y los eritrocitos también se pueden eliminar mediante filtración o centrifugación de sangre completa. Sin embargo, estos procedimientos no son apropiados para su uso en una configuración de diagnóstico rutinario y no permitirían una medición correcta de dichos analitos al menos parcialmente presentes en el interior de los glóbulos rojos.

45 En una forma adicional de procesamiento de muestras, el analito de interés se separa primero de la mayoría de las sustancias potencialmente interferentes mediante procedimientos de extracción o precipitación selectiva. La extracción se puede realizar en fase líquida o en una fase sólida. Esto se ejemplificará ilustrando algunos de los procedimientos utilizados en la detección de fármacos inmunodepresores.

50 Los fármacos inmunodepresores bien conocidos son, por ejemplo, micofenolato mofetilo (MMF), rapamicina (RAPA, también conocido como sirolimus) y tacrolimus (FK-506). La monitorización farmacoterapéutica de fármacos inmunodepresores es especialmente importante para pacientes sometidos a trasplantes, así como para pacientes que padecen SIDA (véase, por ejemplo: Drug Ther. Perspect. 17 (22) (2001) 8-12). La mayoría de los pacientes que se someten a un trasplante de órgano sólido requieren un tratamiento inmunodepresor de por vida para prevenir el rechazo del aloinjerto. Pero, debido a que muchos agentes inmunodepresores tienen intervalos terapéuticos reducidos y están asociados con diversas toxicidades y con la posibilidad de interacciones farmacológicas, el uso de la monitorización farmacoterapéutica (TDM) junto con la evaluación clínica de los pacientes puede ser particularmente importante.

60 El micofenolato mofetilo es un profármaco. Después de la administración oral, el micofenolato mofetilo (MMF) se hidroliza rápidamente en el intestino y la sangre para formar su metabolito activo, el ácido micofenólico (MPA). El MMF está ampliamente disponible y está aprobado en EE. UU. y el Reino Unido para la prevención del rechazo de aloinjerto renal, hepático o cardíaco en combinación con corticoesteroides y ciclosporina. El fármaco ha demostrado superioridad sobre la azatioprina en la reducción de la incidencia de rechazo agudo de aloinjertos renales. La concentración mínima terapéutica está en el intervalo de 1-3,5 mg/l. El MMF se puede medir en plasma y en sangre completa.

El tacrolimus es un antibiótico macrólido que fue aprobado por primera vez por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. en 1994 para la prevención del rechazo de aloinjerto hepático. Es hasta 100 veces más potente que la ciclosporina *in vitro* y, clínicamente, se asocia con una mayor reducción de la incidencia de rechazo de tejido. El tacrolimus ha demostrado eficacia como tratamiento inmunodepresor primario en pacientes que se someten a diversos procedimientos de trasplante y como tratamiento de rescate para pacientes con rechazo agudo del aloinjerto resistente al tratamiento después de un trasplante de hígado o riñón. La concentración mínima terapéutica está en el intervalo de 5-20 µg/l.

Dado que al menos parte del tacrolimus presente en la circulación se encuentra compartimentado dentro de los eritrocitos, en la medición de este fármaco en la práctica clínica rutinaria se utiliza una muestra de sangre completa. El tacrolimus se puede detectar, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), HPLC y espectrometría de masas (EM), radioensayo de receptor (RRA) o mediante un inmunoensayo (IA). Las dos últimas metodologías no detectan el tacrolimus ni algunos de sus diversos metabolitos con la misma sensibilidad. Esto puede conducir a una interferencia en el procedimiento utilizado (Murthy, J. N., *et al.*, Clin. Biochem. 31 (1998) 613-617). Al menos en la detección de los diversos metabolitos de tacrolimus, el procedimiento de HPLC-EM se puede considerar el procedimiento de referencia. Sin embargo, todos los procedimientos mencionados anteriormente requieren la extracción de tacrolimus de la sangre completa. Por lo general, el acetonitrilo se usa en la práctica clínica rutinaria para la extracción de tacrolimus de sangre completa y no parece existir ningún procedimiento que permita una medición en línea de tacrolimus en una muestra de sangre completa.

El sirolimus es, como el tacrolimus, un antibiótico macrólido. Fue aprobado por primera vez en 1999 por la FDA de EE. UU. para la prevención del rechazo de aloinjertos después del trasplante renal y, de hecho, ha mostrado resultados prometedores en este sentido cuando se usa de manera aguda en combinación con ciclosporina y corticosteroides. *In vitro*, el sirolimus es hasta 100 veces más potente que la ciclosporina y, clínicamente, puede mostrar sinergia con la ciclosporina, tal vez permitiendo una reducción de la dosificación de ciclosporina. La concentración mínima terapéutica está en el intervalo de 5-15 µg/l.

Al igual que el tacrolimus, hay una cantidad significativa de sirolimus dentro de los eritrocitos. Por lo tanto, se requiere la extracción de una muestra de sangre completa sin importar qué procedimiento de detección se use. En la práctica clínica rutinaria, una muestra que se sospecha que comprende sirolimus se somete a HPLC y el sirolimus se detecta mediante luz ultravioleta (UV) o mediante EM/EM. Recientemente también se ha descrito un inmunoensayo enzimático en micropartículas (Jones, K., *et al.*, Clinical Therapeutics 22, Suppl. B (2000) B49-B61).

El folato es el nombre colectivo de un grupo de moléculas relacionadas que difieren en el estado de oxidación. Los folatos son parte del grupo de la vitamina B soluble en agua y son importantes como coenzimas para el metabolismo de la homocisteína y en la transferencia de grupos de un solo carbono requeridos para la replicación del ADN. Un nivel inadecuado de folatos está relacionado con un mayor riesgo de anomalías congénitas del tubo neural, se asocia con enfermedades cardiovasculares, anemia, con ciertos cánceres y con la enfermedad de Alzheimer. Las concentraciones séricas o plasmáticas de folato reflejan la ingesta reciente en la dieta, mientras que las concentraciones de folato eritrocítico son más indicativas de depósitos 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 en los glóbulos rojos = folato-RBC) es la mejor medida del estado de los folatos en todo el cuerpo. Estudios recientes han demostrado que el 5-metiltetrahydrofolato es el vitámero de folato dominante en los eritrocitos en circulación. Para el diagnóstico de la deficiencia de folato se recomienda que las determinaciones se realicen no solo en suero o en plasma sino también en eritrocitos, ya que el folato se localiza en más de un 95 % en estos últimos. La concentración en los eritrocitos refleja más fielmente los niveles reales de folato.

Hay varios procedimientos disponibles para medir el folato en diferentes matrices. Los principales procedimientos analíticos son el análisis microbiológico, el radioinmunoensayo, la quimioluminiscencia, los procedimientos cromatográficos y los procedimientos de espectrometría de masas. La mayoría de los procedimientos se basan en la unión competitiva del folato a la proteína de unión a folato.

Para la medición de folato-RBC, el uso de un reactivo hemolizante es obviamente obligatorio. Por ejemplo, el ensayo Elecsys™ (Elecsys es una marca registrada de un miembro del Grupo Roche) para la determinación de folato-RBC utiliza ácido ascórbico como reactivo de lisis. El reactivo hemolizante de folato-RBC Elecsys se usa junto con el ensayo de folato Elecsys para la determinación cuantitativa de los niveles de folato en los eritrocitos (folato-RBC). La sangre completa tratada con anticoagulantes (heparina o EDTA) se diluye con solución de ácido ascórbico (0,2 %) y se incuba durante aproximadamente 90 minutos a 20-25 °C. La lisis de los eritrocitos tiene lugar con la liberación del folato intracelular. El hemolizado se usa luego como una muestra "prediluida" (en analogía al suero) para la medición posterior en el ensayo de folato de Elecsys. El valor del hematocrito determinado en sangre completa y el efecto de dilución provocado por el pretratamiento de la muestra se compensan en el cálculo de la concentración de folato eritrocítico (Greiling, H., Gressner, A.M., Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3.ª ed., Stuttgart-Nueva York, Schattauer (1995) págs. 460-462; Gunter, E.W., *et al.*, Clin. Chem. 42 (1996) 1689-1694).

El hemolizado generado por el tratamiento con ácido ascórbico no se puede usar para procedimientos cromatográficos rutinarios. Para usar dicho hemolizado en un procedimiento cromatográfico o en la determinación por espectrometría de

masas, es necesario eliminar los restos celulares y la proteína precipitada antes del análisis.

Los restos y las proteínas precipitadas se eliminan en general de una muestra mediante centrifugación, filtración fuera de línea o extracción en fase sólida.

5

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica cromatográfica ampliamente utilizada, por ejemplo, para la preconcentración y limpieza de muestras analíticas, para la purificación de diversos productos químicos y para la eliminación de sustancias tóxicas o valiosas de soluciones acuosas. La SPE se realiza en general usando una columna o cartucho que contiene una resina apropiada. Los procedimientos de SPE se han desarrollado utilizando sorbentes que pueden interactuar con los analitos mediante mecanismos hidrófobos, de intercambio iónico, de quelación, de sorción y otros mecanismos para unir y eliminar los analitos de los fluidos. Dado que diferentes aplicaciones de SPE para diferentes clases de analitos pueden requerir sorbentes diferentes, existe una necesidad concomitante de sorbentes con propiedades específicas que tengan una selectividad única para el analito o clase de analitos de interés. Ejemplos representativos de materiales de SPE y columnas de SPE, respectivamente, se pueden encontrar en los documentos US 6.322.695 y US 6.723.236.

10

15

La concentración de hemoglobina en sí misma, así como la relación entre la glucohemoglobina (HbA1c) y la hemoglobina no glucosilada son analitos importantes en hematología y diabetes. En dicha evaluación, los eritrocitos comprendidos en una muestra de sangre completa se lisan y luego se mide la hemoglobina. El documento US 6.050.956 describe un tubo hemolizante que se prellena con una cantidad estandarizada de un líquido que disuelve la sangre. No obstante, la sangre completa se recoge primero en un tubo de extracción de sangre rutinario. Posteriormente, la sangre se diluye 1 a más de 100 en el tubo hemolizante. La muy alta concentración de hemoglobina hace que sea posible una dilución 1 a más de 100 de la sangre completa y que no se requiera hemólisis diferencial, es decir, que no se requiera hemólisis para evitar efectos secundarios negativos como la precipitación de proteínas y/o la liberación de ADN. Habitualmente, la HbA1c se detecta mediante un inmunoensayo.

20

25

Varias familias de patentes de Coulter International Inc., como los documentos US 5.874.310; US 5.882.934; EP 1 000 356; EP 0 874 988; EP 0 305 491 o EP 0 185 048 se refieren al campo de la hematología y especialmente al análisis de células sanguíneas. En el documento EP 0 794 435 se divulga el uso de sales de piridinio N-monoalquiladas que tienen una cadena de alquilo de ocho a veinte átomos de C en el análisis de las células eucariotas comprendidas en una muestra de sangre. El documento US 5.316.951 menciona que se pueden usar sales de piridinio N-monoalquiladas que tienen una cadena de alquilo de diez a veinte átomos de C en el análisis de las células eucariotas comprendidas en una muestra de sangre completa.

30

35

Sarapuk, J. *et al.*, Z. Naturforschung 54c (1999) 952-955 mencionan que se puede usar cloruro de 3-carbamoil-1-deciloximetilpiridinio para lisar glóbulos rojos.

40

El documento EP 1 000 356, por ejemplo, describe un diluyente mejorado para la dilución de una muestra de sangre que es adecuado para la enumeración y determinación del tamaño de células sanguíneas, la determinación de parámetros de hemoglobina y la diferenciación de subpoblaciones de leucocitos en una única muestra de sangre. El análisis se realiza mediante el uso de instrumental electrónico adecuado. Para dicho análisis, la sangre la recoge en general un médico, luego se debe transportar al laboratorio clínico, y solo poco antes del análisis se agrega un reactivo de lisis.

45

Las referencias disponibles para los autores de la presente invención no divulgan ni sugieren que se pueda usar una muestra de sangre completa hemolizada en la separación en línea mediante un procedimiento de cromatografía de líquidos, por ejemplo, en la detección de un analito normalmente presente en un glóbulo rojo.

50

Al igual que sucede con muchos otros analitos de interés, parece que no hay ningún procedimiento disponible que permita la detección de folato, sirolimus o tacrolimus en una muestra de sangre completa en ningún procedimiento de detección basado en el uso de un procedimiento cromatográfico en línea.

55

Resulta obvio de la discusión anterior del estado de la técnica que no parece estar disponible ningún procedimiento para una separación cromatográfica en línea y medición de un analito en una muestra de sangre completa. Incluso hoy en día, todos los procedimientos rutinarios parecen requerir la extracción o el fraccionamiento de un analito de interés o de una cierta clase de compuestos que comprende el analito de interés del resto de dicha muestra.

60

Sin embargo, sería altamente deseable que la sangre completa se pudiera usar directamente como muestra. Esto sería especialmente ventajoso en un procedimiento de detección en línea que hace uso de una etapa de separación por cromatografía de líquidos (CL). También es obvio que la detección directa en línea de un fármaco inmunodepresor en una muestra de sangre completa sería un avance importante para un laboratorio clínico.

65

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado y podría establecerse que es posible procesar una muestra de sangre completa con ayuda de un agente solubilizante de membrana adecuado, por ejemplo, para convertirla en una muestra apropiada para la separación directa por CL y la detección del analito por EM. También ha sido posible detectar un analito en dicha muestra procesada. Esto es especialmente valioso para un analito que también esté presente en una extensión relevante dentro de los glóbulos rojos, como los fármacos inmunodepresores sirolimus y tacrolimus o como el folato.

**Sumario de la invención**

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida que se sabe o se sospecha que comprende glóbulos rojos y se sospecha o se sabe que comprende células eucariotas, de acuerdo con la reivindicación 1.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un agente solubilizante de membrana en la hemólisis diferencial de una muestra de sangre completa para la separación mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento y detección de analito por espectroscopia de masas, de acuerdo con la reivindicación 8.

**Descripción detallada de la invención**

15 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza *in vitro*, es decir, no en el cuerpo humano o animal.

20 En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida que se sabe o se sospecha que comprende glóbulos rojos y se sospecha o se sabe que comprende células eucariotas, comprendiendo el procedimiento las etapas de a) procesar dicha muestra líquida con un agente solubilizante de membrana en condiciones apropiadas para lisar las membranas celulares de los glóbulos rojos y, al mismo tiempo, no causar la precipitación de los constituyentes de la muestra, b) someter la muestra procesada obtenida en la etapa (a) a una separación cromatográfica y c) detectar el analito.

25 Los "glóbulos rojos", en el sentido de la presente invención, son glóbulos rojos que no tienen un núcleo celular. Dichos glóbulos rojos que no tienen un núcleo celular son, por ejemplo, los glóbulos rojos maduros como los que se encuentran en la circulación de los mamíferos. La presente invención no se refiere a glóbulos rojos nucleados como, por ejemplo, los conocidos de especies aviares. Estos últimos cumplirían los criterios para células nucleadas o eucariotas.

30 "Mamífero", para el propósito de la presente invención, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de competición o mascotas, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un humano.

35 Una "célula eucariota" o una "célula nucleada", en el sentido de la presente invención, es una célula derivada de un organismo eucariota y que todavía tiene su núcleo celular. Los ejemplos de células eucariotas son células derivadas de tejido nucleado, células de cultivo de tejido nucleado y células sanguíneas nucleadas. En un modo de realización preferente, la célula eucariota es una célula sanguínea nucleada como un trombocito, un monocito, neutrófilos, eosinófilos o un leucocito. Las células de organismos inferiores, como las bacterias, aunque contienen material genético, no son células eucariotas.

40 Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un glóbulo rojo" significa un glóbulo rojo o más de un glóbulo rojo.

45 Las propiedades ventajosas de la hemólisis diferencial, es decir, procesar una muestra líquida con un agente solubilizante de membrana en condiciones apropiadas para lisar membranas celulares de glóbulos rojos y, al mismo tiempo, no causar la precipitación de los constituyentes de la muestra, como se demuestra en la presente invención, han sido establecidas mediante el uso de muestras de sangre completa. Sin embargo, ahora que el procedimiento está establecido, también se pueden usar y procesar otras muestras líquidas de la misma manera. Por lo tanto, la muestra líquida de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier muestra investigada en el diagnóstico clínico rutinario, como orina, líquido cefalorraquídeo, suero, plasma o sangre.

50 Preferentemente, la muestra líquida sometida a una hemólisis diferencial con un agente solubilizante de membrana apropiado comprende glóbulos rojos y puede comprender o comprende células nucleadas. Más preferentemente, la muestra líquida comprende tanto glóbulos rojos como células nucleadas. Preferentemente, la muestra líquida de acuerdo con la presente invención será sangre completa. Como se apreciará, una muestra de sangre completa contiene tanto glóbulos rojos sin núcleo como células sanguíneas nucleadas.

60 Preferentemente, la muestra de sangre completa se procesa directamente, es decir, directamente después del muestreo en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la muestra de sangre no se tratará en absoluto antes de someterla a la hemólisis diferencial de acuerdo con la presente invención. Más preferentemente, la sangre completa se recogerá/tratará con un anticoagulante apropiado para producir una muestra de sangre completa anticoagulada antes de someterla a hemólisis diferencial. Los anticoagulantes bien conocidos usados frecuentemente en el diagnóstico clínico rutinario son heparina, citrato y EDTA. Preferentemente, la muestra de acuerdo con la presente invención es una muestra de sangre completa anticoagulada, especialmente una muestra de sangre completa citrada o una muestra de sangre completa anticoagulada con EDTA.

65 En un procedimiento de acuerdo con la presente invención, la muestra líquida se trata con el agente solubilizante de

membrana de tal modo que se cumplen dos requisitos: a) si están presentes glóbulos rojos, las membranas de los glóbulos rojos se destruyen y b) al mismo tiempo, no se produce precipitación de los constituyentes de la muestra. Este procedimiento se denomina hemólisis diferencial. En caso de que el procedimiento se practique en una muestra de sangre completa, se obtiene una muestra procesada que contiene glóbulos rojos lisados, pero, al mismo tiempo, sin precipitado.

5 Preferentemente, el agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención provocará la lisis de al menos un 95 % de los eritrocitos presentes en una muestra. Más preferentemente, el reactivo para la hemólisis diferencial provocará la lisis de al menos un 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % de los eritrocitos presentes en una muestra.

10 Sin querer limitarse a la siguiente teoría, se puede suponer que el equilibrio ventajoso encontrado y establecido dentro del marco de la presente invención, en el que la membrana de un glóbulo rojo se destruye, pero en el que, al mismo tiempo, no se produce precipitación de los constituyentes de la muestra, es esencial para superar al menos algunos de los problemas conocidos de la técnica. Mediante la aplicación de un agente solubilizante de membrana adecuado en condiciones apropiadas, se pierde la integridad de la membrana celular que, por ejemplo, es esencial para proteger el contenido de un glóbulo rojo del plasma sanguíneo. El contenido de los eritrocitos (por ejemplo, hemoglobina, pero también algunos analitos de interés) se libera al líquido circundante. Al mismo tiempo, no se produce precipitación de los constituyentes de la muestra.

20 Como apreciará el experto en la técnica, los constituyentes de la muestra que podrían interferir con un último análisis pueden ser especialmente ADN y proteínas desnaturalizadas, respectivamente. En la medida en que los núcleos de células eucariotas, tales como linfocitos o monocitos, no se destruyan, no se liberará ADN de esos núcleos. En la medida en que no precipiten proteínas, las proteínas comprendidas en la muestra sometida a hemólisis diferencial no interferirán, al menos no en un grado significativo, con la etapa de cromatografía o con el análisis.

25 La integridad de los glóbulos rojos se puede evaluar fácilmente, por ejemplo, mediante tinciones apropiadas. En un modo de realización preferente de acuerdo con la presente invención se usa azul tripano para evaluar la integridad de una membrana de glóbulo rojo. Los glóbulos rojos intactos no acumulan azul tripano, mientras que un glóbulo rojo con una membrana destruida se tiñe con azul tripano. La integridad de la membrana de un glóbulo rojo se evalúa fácilmente bajo el microscopio después de teñir una muestra con azul tripano. El porcentaje de glóbulos rojos destruidos se calcula contando los glóbulos rojos intactos antes y después del tratamiento, luego dividiendo el primer número por el último número y luego multiplicando este valor por 100. Los glóbulos rojos que se solubilizan se conocen como glóbulos rojos lisos o como eritrocitos lisados.

35 El tratamiento apropiado será adecuado para lisar un glóbulo rojo, pero, al mismo tiempo, no causará la precipitación de los constituyentes de la muestra. Se espera que el tratamiento de hemólisis apropiado en un procedimiento de acuerdo con la presente invención afectará también a las membranas externas de las células eucariotas. Sin embargo, se puede y se debe tener cuidado de que el ADN contenido en los núcleos de las células no se libere a la muestra. El reactivo de hemólisis y las condiciones para la hemólisis utilizados o bien dejarán preferentemente la membrana nuclear y, por lo tanto, los núcleos macroscópicamente intactos, o al menos el ADN no se liberará de sus proteínas nucleares circundantes y estabilizadoras de ADN. Si el ADN se liberara en un grado significativo, dicho ADN podría interferir o incluso interferiría con la manipulación adicional de la muestra. El ADN liberado, por ejemplo, tiende a hacer que el líquido sea muy viscoso. Esto hace que ya no sea posible pipetear o transferir dicha muestra ni pasarla a través de ciertos filtros o columnas.

45 Se puede y se debe tener cuidado de que no se produzca la precipitación de proteínas. Como apreciará el experto en la técnica, hay muchísimas proteínas diferentes presentes en una muestra biológica, por ejemplo, en una muestra de sangre completa. Todas estas proteínas tienen propiedades individuales que influyen en su tendencia a precipitar o agregarse.

50 Ahora se ha descubierto que es posible describir y definir si el procesamiento de muestras con un agente solubilizante de membrana se realiza en condiciones apropiadas para lisar las membranas celulares de los glóbulos rojos por un lado y, al mismo tiempo, no causar la precipitación de los constituyentes de la muestra. Tanto los glóbulos rojos no lisados como los constituyentes de la muestra precipitados tienen un impacto negativo en las propiedades de dicha muestra.

55 Si las condiciones para la hemólisis diferencial son apropiadas se puede determinar fácil y preferentemente utilizando el siguiente procedimiento estandarizado. Una muestra de sangre completa con un hematocrito de 40 se diluye 1:10 y se mezcla 1:1 con el reactivo de hemólisis candidato. La eficacia de un reactivo para producir hemólisis diferencial se observa visualmente. Tras la lisis de los eritrocitos, la mezcla se vuelve transparente. Si la precipitación de los constituyentes de la muestra se produce, la muestra se vuelve turbia o viscosa o ambas.

60 Como se indicó anteriormente, las condiciones usadas en un procedimiento de hemólisis diferencial de acuerdo con la presente invención se pueden evaluar fácilmente de forma visual. Si una muestra de sangre completa se incuba con un reactivo candidato apropiado para la hemólisis diferencial, la concentración mínima requerida para hemolizar los glóbulos rojos se puede reconocer como la concentración que hace que la muestra de sangre turbia se vuelva transparente. La concentración más alta posible es aquella que todavía da lugar a una muestra transparente y no viscosa.

65 Resultó bastante fácil determinar la concentración final mínima apropiada del reactivo de hemólisis candidato como la concentración que provoca el cambio en la transparencia de una muestra de sangre completa tratada. Este cambio en la

transparencia se correlaciona bien con la idoneidad de dicha muestra procesada para el análisis directo por HPLC. Sin embargo, en aras de una definición inequívoca, es preferente que la concentración mínima de un reactivo de hemólisis se confirme mediante el procedimiento de HPLC como se describe a continuación.

5 La concentración máxima de reactivo de hemólisis posible es la concentración que todavía no causa la liberación de ADN y/o la precipitación de una proteína. La muestra se volvería de ese modo viscosa o turbia o ambas y ya no sería adecuada para una aplicación de HPLC directa. Mientras que la viscosidad y la turbidez se pueden seguir visualmente, es preferente que la concentración máxima de un reactivo de hemólisis se confirme mediante un procedimiento de HPLC como se describe a continuación.

10

Ambas, tanto una muestra de sangre completa que todavía comprende demasiados eritrocitos no lisados como una muestra de sangre completa tratada que comprende constituyentes de la muestra precipitados, no serán adecuadas para ningún procedimiento cromatográfico. Esta es la razón por la que las condiciones apropiadas para provocar la hemólisis diferencial se determinan preferentemente pasando de manera estandarizada una muestra de sangre completa tratada con un reactivo candidato para hemólisis diferencial por una columna de HPLC.

15

La hemólisis incompleta y/o la precipitación de los constituyentes de la muestra se evalúan pasando 50 veces 10 µl de la muestra de sangre completa procesada por una columna de HPLC. Para evaluar si un reactivo de hemólisis candidato para la hemólisis diferencial es apropiado, dicho reactivo de hemólisis se mezcla con una muestra de sangre completa. Preferentemente se usa sangre-EDTA que se ha prediluido 1:10 en solución salina fisiológica. Se mezcla en una proporción 1:1 con el reactivo de hemólisis candidato y la mezcla se incuba durante 30 min a 20 °C. La dilución final de sangre completa en esta mezcla es 1:20. Se pasan 50 alícuotas de 10 µl de esta mezcla, es decir, una muestra de sangre completa procesada, por un filtro con un diámetro de 2 mm y un tamaño de poro de 0,5 µm que es parte de un sistema de HPLC. En el caso de que la frita sea parte de una columna de HPLC, la fase estacionaria se debe seleccionar para que no cause ninguna interferencia ni bloqueo. La contrapresión se monitoriza. Un reactivo candidato para la hemólisis diferencial que causara un aumento en la contrapresión de 20 bar o más, si se comparan entre sí la contrapresión para la 50.<sup>a</sup> inyección y la contrapresión para la primera inyección, se consideraría no apropiado. De esta manera, tanto la concentración mínima como la concentración final máxima de un reactivo apropiado para la hemólisis diferencial se pueden identificar fácilmente. La concentración mínima es la concentración más baja del reactivo de hemólisis candidato que da lugar a la hemólisis diferencial según se evalúa en la configuración descrita anteriormente. La concentración máxima es la concentración más alta posible del reactivo de hemólisis candidato que da lugar a una hemólisis diferencial, pero que no provoca la precipitación de los constituyentes de la muestra según se evalúa en la configuración descrita anteriormente.

20

25

30

Preferentemente, el filtro utilizado en la evaluación anterior de un reactivo candidato para hemólisis diferencial es una frita de HPLC. Más preferentemente, la frita es parte de una columna de HPLC de 20 mm de longitud rellena con partículas Symmetry® C18 de 3,5 µm con un tamaño de poro de 100 Å como material del lecho, y tiene un diámetro interior de columna de 2 mm.

35

Como el experto en la técnica apreciará fácilmente, la muestra de sangre completa utilizada para dicha evaluación se obtiene de un individuo sano, es decir, un individuo que no tiene una enfermedad conocida y que tiene valores bioquímicos en el intervalo normal.

40

Se ha encontrado y establecido en la presente invención que se pueden establecer condiciones apropiadas para que bastantes reactivos cumplan ambos requisitos para hemólisis diferencial.

45

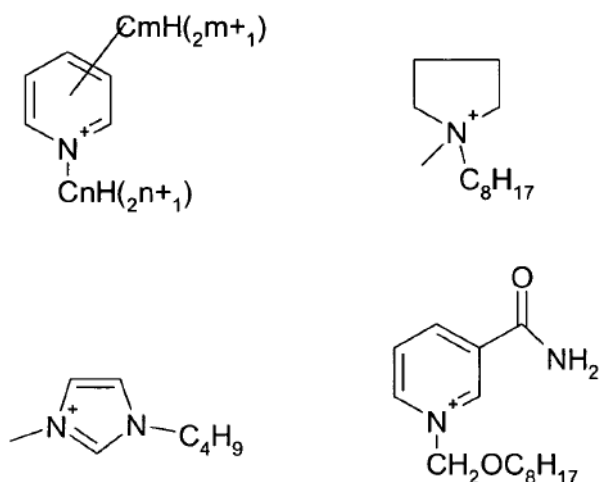
El agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención se basa preferentemente en agua como disolvente, comprende un producto químico o reactivo que provoca la hemólisis diferencial como se describe anteriormente, y más preferentemente puede comprender un tampón y/o un conservante. Los agentes utilizados para la hemólisis diferencial se basan preferentemente en productos químicos o reactivos con actividad de solubilización de membrana que tienen una masa molecular de menos de 1000 Dalton.

50

El agente solubilizante de membrana se basa preferentemente en la acción membranólítica de uno o más de los siguientes productos químicos: KBr; KI y KSCN o en una sal que consiste en uno o más de los siguientes cationes y aniones:

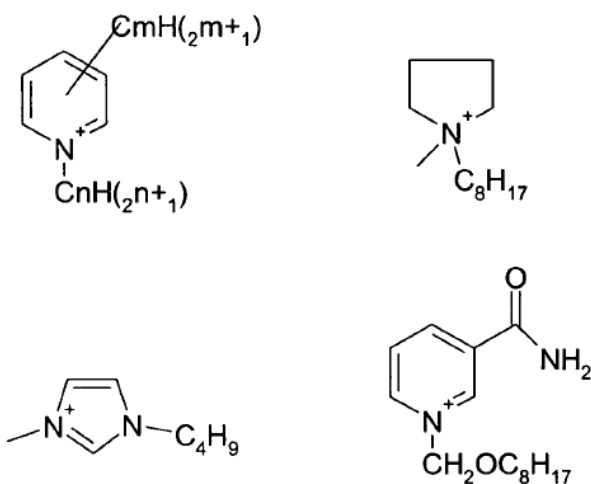
55

El catión se selecciona preferentemente de



en el que m es 0 o 1 y n es 4 o 6.

- 5 El anión se selecciona preferentemente de cloruro, tetrafluoroborato, octilsulfato, yoduro y tiocianato. También es posible usar mezclas de los productos químicos mencionados anteriormente. Tal como aprecia el experto en la técnica, son estos productos químicos los que facilitan la hemólisis diferencial, mientras que otros ingredientes de un reactivo de hemólisis pueden servir para diferentes propósitos y pueden funcionar, por ejemplo, como un tampón o como un conservante.
- 10 Preferentemente, el producto químico comprendido en un reactivo para hemólisis diferencial es una sal en la que el catión se selecciona preferentemente de



- 15 en el que m es 0 o 1 y n es 4 o 6, y en la que el anión se selecciona preferentemente de cloruro, tetrafluoroborato, octilsulfato, yoduro y tiocianato.

Los productos químicos membranólíticos apropiados comprendidos en un agente solubilizante de membrana se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio; tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio; octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio; cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio; cloruro de 1-hexilpiridinio; cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio; cloruro de N-octilpiridinio; cloruro de 3-carbamoil-1-octiloximetilpiridinio; KBr; KI y KSCN y combinaciones de los mismos.

25 Preferentemente, los productos químicos membranólíticos comprendidos en un agente solubilizante de membrana se seleccionan del grupo que consiste en tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio; tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio; octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio; cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio; cloruro de 1-hexilpiridinio; cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio; cloruro de N-octilpiridinio y cloruro de 3-carbamoil-1-octiloximetilpiridinio. Más preferentemente, se usa una mezcla de uno de estos reactivos y de KSCN.

30 Como es obvio para el experto en la técnica, una vez que se ha identificado una concentración apropiada de un reactivo candidato para hemólisis diferencial en el procedimiento definido anteriormente que se basa en una dilución 1:20 de una muestra de sangre completa en un reactivo de hemólisis candidato, se puede usar otra proporción entre la muestra de



sangre completa y un reactivo de hemólisis ajustado según se requiera.

En caso de que se espere que el analito de interés esté altamente concentrado en la muestra de sangre bajo investigación, la concentración final del reactivo de hemólisis puede permanecer igual a la identificada en la configuración anterior y se pueden usar proporciones más bajas de sangre completa con respecto al reactivo de hemólisis, por ejemplo, 1:30, 1:40 o 1:50. Preferentemente, en un agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención, el reactivo para hemólisis diferencial se usa en al menos la concentración mínima suficiente para lograr la hemólisis diferencial como se determina anteriormente.

En caso de que el analito de interés esté presente en una concentración bastante baja, puede no ser necesario diluir la muestra de sangre completa a 1:20, sino a una proporción menor. Esto es factible ajustando la concentración del reactivo de hemólisis en consecuencia, de modo que la concentración relativa final del reactivo de hemólisis con respecto a la sangre completa en la mezcla del reactivo de hemólisis y la muestra de sangre completa se mantenga dentro de la proporción identificada para la concentración mínima y máxima requerida, respectivamente, del reactivo de hemólisis como se determina en la evaluación descrita anteriormente.

A modo de ejemplo: Se ha encontrado que el cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio y el KSCN, si se usan en una concentración final de un 1 % y un 0,4 % en un agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención, respectivamente, son apropiados para lograr el resultado deseado, es decir, hemólisis diferencial de una muestra de sangre completa a una dilución final de 1:20. La dilución de un analito en la muestra de sangre procesada se puede reducir si, por ejemplo, la concentración de este reactivo de hemólisis se ajusta a un 2 % para el cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio y a un 0,8 % para el KSCN, respectivamente. El agente solubilizante de membrana que comprende esta concentración ajustada de reactivo de hemólisis, si se mezcla posteriormente 1:1 con una muestra de sangre completa diluida 1:5, también da lugar a una hemólisis diferencial de la muestra de sangre completa. Dado que la proporción de sangre completa y reactivo de hemólisis se mantiene constante, esta muestra de sangre procesada solo se diluye 1:10. Si se mezcla 1 ml de un agente solubilizante de membrana que comprende un 10 % de cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio y un 4 % de KSCN, respectivamente, con 1 ml de sangre completa diluida 1:1 en PBS, también se observa hemólisis diferencial. De forma alternativa, se podría añadir 1 ml de sangre completa a 2 ml de un agente solubilizante de membrana que comprende un 10 % de cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio y un 4 % de KSCN, respectivamente.

Para muchas aplicaciones rutinarias se espera que la proporción ideal de muestra de sangre completa y agente solubilizante de membrana se encuentre entre 10:1 y 1:50. Preferentemente, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, la muestra de sangre completa se mezcla con el reactivo de hemólisis en una proporción de 5:1 a 1:20. Más preferentemente, la proporción se encuentra entre 2:1 y 1:10, más preferentemente entre 1:1 y 1:5. La concentración final, es decir, la más alta posible de un reactivo de hemólisis ajustado utilizado en la práctica clínica rutinaria dependerá de la solubilidad y también del precio de dicho reactivo.

Preferentemente, un reactivo apropiado para diferentes hemólisis se caracteriza además por que la concentración (mínima) del producto químico requerida para destruir la membrana de un glóbulo rojo y la concentración (máxima) tolerada de dicho producto químico a la que, al mismo tiempo, no se produce precipitación de los constituyentes de la muestra están al menos separadas por un factor de 2. Cuanto más amplia sea la ventana entre la concentración mínima y la máxima del reactivo responsable de la hemólisis diferencial, más fácil será utilizar dicho reactivo en el diagnóstico clínico rutinario.

Más preferentemente, el producto químico membranolítico comprendido en un reactivo para hemólisis diferencial se usa a una concentración tal que, después de mezclar dicho reactivo con una muestra, la concentración final de ese producto químico membranolítico corresponde al valor medio más un 30 % de la concentración mínima y menos un 30 % de la concentración máxima, respectivamente. Más preferentemente, la concentración del producto químico membranolítico comprendido en el reactivo para hemólisis diferencial se ajusta de manera que, después de mezclarlo con una muestra, está dentro de más o menos un 25 %, 20 % o 15 % del valor medio de la concentración mínima y máxima, respectivamente.

Más preferentemente, el producto químico membranolítico comprendido en un reactivo para hemólisis diferencial se utiliza a una concentración tal que, después de mezclarlo con una muestra, da lugar a una concentración final de ese producto químico hemolítico correspondiente a una concentración entre una y cuatro veces la concentración mínima, y más preferentemente entre 1,5 veces y 3 veces la concentración mínima determinada como se describe anteriormente.

Preferentemente, el reactivo para hemólisis diferencial en un agente solubilizante de membrana de la presente invención se usa a una concentración de no más de un 75 % en peso/volumen, más preferentemente de no más de un 50 % en peso/volumen.

Preferentemente, el procedimiento de procesamiento de una muestra líquida mediante un reactivo solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención va seguido de una etapa de cromatografía de líquidos (CL) en línea.

En un modo de realización más preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida, comprendiendo el procedimiento las etapas de obtener dicha muestra líquida, someter dicha muestra líquida a un procedimiento de procesamiento de muestra mediante un agente solubilizante de membrana, en el que el agente solubilizante es apropiado para destruir la membrana de glóbulos rojos y no para destruir los núcleos de

células eucariotas, someter dicha muestra procesada a cromatografía de líquidos y analizar el analito que se está investigando por medios apropiados. Preferentemente, el procedimiento de análisis también se realiza directamente (en línea) sobre la muestra procesada.

5 La cromatografía de líquidos (CL) es una técnica analítica extremadamente importante que se utiliza para la separación, identificación y cuantificación de un analito de interés, incluso si está presente en una mezcla compleja de diferentes constituyentes de muestra. Durante la CL, los componentes químicos de una mezcla se transportan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil líquida. En cromatografía de líquidos, la separación se logra por medio de diferencias en las interacciones de los analitos con las fases móvil y estacionaria. Como el experto en la técnica aprecia, se deben elegir tanto una fase estacionaria como una fase móvil apropiadas para los analitos investigados. Además, el usuario identificará las condiciones cromatográficas apropiadas para mantener la nitidez de las bandas de analito a medida que una muestra se desplaza a través de la columna de fase estacionaria hacia el detector.

15 La cromatografía de líquidos de alto rendimiento, también conocida como cromatografía de líquidos a alta presión, abreviada como HPLC, es una forma especial de cromatografía de líquidos y hoy en día se usa con frecuencia en bioquímica y química analítica. El analito es forzado a pasar a través de una columna de la fase estacionaria en un líquido (fase móvil) a alta presión, lo que disminuye el tiempo que permanecen los componentes separados en la fase estacionaria y, por lo tanto, el tiempo que tienen para difundirse dentro de la columna. Esto conduce a picos más estrechos en el cromatograma resultante y, por consiguiente, a una mayor resolución y sensibilidad en comparación con la CL.

20 La fase móvil se elige para garantizar la solubilidad de los solutos de muestra. Para la fase estacionaria se usa preferentemente sílice microparticulada (no modificada o químicamente modificada), debido a que su elevada área superficial acentúa las diferencias en las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria. El uso de una fase estacionaria que interactúa fuertemente con los solutos con respecto a las interacciones entre la fase móvil y el soluto dará como resultado unos tiempos de retención muy largos, una situación que no es analíticamente útil. Por lo tanto, la fase estacionaria se debe seleccionar para que proporcione interacciones con los solutos de débiles a moderadas con respecto a las de la fase móvil. Como consecuencia, la naturaleza del soluto determina el tipo de CL seleccionada. Las interacciones más fuertes deben ocurrir en la fase móvil para garantizar la solubilidad de la muestra y una buena elución, mientras que la fase estacionaria debe responder a diferencias más sutiles entre los solutos. Por ejemplo, los compuestos polares neutros se analizan en general mejor usando una fase móvil polar junto con una fase estacionaria apolar que distingue diferencias sutiles en el carácter dispersivo de los solutos. Uno de los aspectos poderosos de la HPLC es que la fase móvil se puede variar 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.

35 Se pueden distinguir cinco clases generales de CL:

1. La cromatografía en fase normal requiere el uso de una fase estacionaria polar junto con una fase móvil apolar (dispersiva).
- 40 2. La cromatografía en fase inversa, la posibilidad opuesta, requiere el uso de una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar (compuesta de uno o más de los disolventes polares, por ejemplo, agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano).
- 45 3. La cromatografía de intercambio iónico implica interacciones iónicas. En este caso, la fase móvil debe soportar la ionización para garantizar la solubilidad de los solutos iónicos. La fase estacionaria también debe ser parcialmente iónica para promover cierta retención. En consecuencia, las interacciones con la fase estacionaria son fuertes, y esto se refleja en general en tiempos de análisis más largos y picos anchos.
- 50 4. La cromatografía de exclusión por tamaño implica separaciones basadas solo en el tamaño molecular e idealmente requiere que no haya interacción energética de los solutos con la fase estacionaria.
- 55 5. La cromatografía de afinidad se basa en una interacción específica, por ejemplo, entre los miembros de un par de unión específico, como el antígeno y el anticuerpo correspondiente o el receptor y el ligando correspondiente. Por ejemplo, un primer componente de un par de unión se une a una fase estacionaria apropiada y se usa para capturar el segundo componente del par de unión. El segundo componente se puede liberar y aislar por medios apropiados.

60 La clasificación general de los principios de separación dada anteriormente no debe ser exhaustiva y, por lo tanto, no es limitante; existen otros principios de separación que se pueden utilizar para la separación de muestras líquidas, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de interacción hidrófila, cromatografía de pares iónicos y separación basada en materiales de impresión molecular.

65 En aplicaciones rutinarias, la fase estacionaria, el denominado material del lecho, por ejemplo, partículas de sílice en una aplicación de RP-HPLC, se empaqueta en una columna apropiada, y se protege mediante una frit. El material de la frit se selecciona habitualmente para que tenga, por ejemplo, un tamaño de poro más pequeño en comparación con el tamaño de poro del material del lecho.

En los procedimientos de HPLC, el diámetro de las partículas de la fase estacionaria está, en general, en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . Estas partículas pequeñas requieren la alta presión utilizada en HPLC. En general, el material del lecho está protegido por una frita. Las fritas típicas tienen un tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  o 0,2  $\mu\text{m}$ . Cuanto más pequeñas son las partículas, menor es habitualmente el tamaño de poro de la frita. Si una muestra comprende un constituyente capaz de bloquear una frita de HPLC, esto es perjudicial para cualquier análisis rutinario. Una muestra de sangre completa, así como una muestra de sangre completa "sobretrotada" que comprende precipitados de constituyentes de la muestra, provoca un bloqueo rápido de cualquier frita o columna de HPLC rutinaria. Como apreciará el experto en la técnica, el bloqueo de la frita utilizada en una columna de HPLC se producirá más rápidamente cuanto menor sea el tamaño de poro de la frita, cuanto menor sea el diámetro de las partículas de la fase estacionaria y cuanto menor sea el diámetro de la columna. En caso de que la frita no se seleccione apropiadamente, es decir, un tamaño de poro demasiado grande, el tamaño de partícula del material de la columna también sería importante y la columna en sí misma se bloquearía más rápidamente cuanto más pequeñas fueran las partículas.

Al aplicar el tratamiento con un agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención a una muestra, por ejemplo, a una muestra de sangre completa, ahora es posible pasar directamente dicha muestra tratada por una columna de HPLC, sin correr el riesgo de bloquear la columna. En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento de procesamiento de una muestra líquida en el que dicha muestra se somete primero a tratamiento con un agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención y después se somete a una etapa de HPLC. Preferentemente, esta etapa de HPLC se realiza en línea con la muestra obtenida por tratamiento con un agente solubilizante de membrana. Preferentemente, las partículas de la fase estacionaria usadas en dicha etapa de HPLC están en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , más preferentemente en el intervalo de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Preferentemente, la frita utilizada en dicha etapa de HPLC tiene un tamaño de poro de 0,5  $\mu\text{m}$  o, más preferentemente, de 0,2  $\mu\text{m}$ .

El analito de interés se puede detectar por cualquier medio apropiado. Los detectores apropiados y preferentes detectan la presencia de un compuesto que pasa a través de ellos y proporcionan una señal electrónica a un registrador o estación de datos informáticos. El resultado se muestra normalmente en forma de cromatograma y una sustancia de interés se encuentra normalmente en un cierto pico. Se pueden usar el área del pico o la altura del pico para cuantificar la cantidad de analito presente en la muestra investigada.

El detector para un sistema de HPLC es el componente que emite una respuesta debido al compuesto de muestra eluyente y, a continuación, señala un pico en el cromatograma. Se coloca inmediatamente posterior a la fase estacionaria para detectar los compuestos a medida que eluyen desde la columna. El ancho de banda y la altura de los picos se pueden ajustar normalmente usando los controles de sintonización gruesa y fina, y un experto en la técnica también puede controlar los parámetros de detección y sensibilidad. Hay muchos tipos de detectores que se pueden usar con HPLC. Algunos de los detectores más comunes incluyen: índice de refracción (RI), ultravioleta (UV), fluorescente, radioquímico, electroquímico, infrarrojo cercano (IR cercano), espectroscopia de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) y dispersión de luz (DL).

Los detectores de índice de refracción (RI) miden la capacidad de las moléculas de muestra de desviar o refractar la luz. Esta propiedad de cada molécula o compuesto se denomina su índice de refracción. En la mayoría de los detectores RI, la luz pasa a través de una cubeta de lectura bimodular hasta un fotodetector. Un canal de la cubeta de lectura dirige la fase móvil que pasa a través de la columna, mientras que el otro dirige solo la fase móvil. La detección se produce cuando la luz se desvía debido a las muestras que eluyen desde la columna, y esto se lee como una disparidad entre los dos canales.

Los detectores fluorescentes miden la capacidad de un compuesto para absorber y luego reemitir la luz a longitudes de onda dadas. Cada compuesto tiene una fluorescencia característica. La fuente de excitación pasa a través de la cubeta de lectura hasta un fotodetector, mientras que un monocromador mide las longitudes de onda de emisión.

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

Los detectores electroquímicos miden compuestos que se someten a reacciones de oxidación o reducción. Esto se logra normalmente midiendo la ganancia o pérdida de electrones de las muestras migratorias a medida que pasan entre los electrodos a una diferencia de potencial eléctrico dada.

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir la relación masa-carga ( $m/z$  (o  $m/q$ )) de iones. En general, se usa para analizar la composición de una muestra física al generar un espectro de masas que representa las masas de los componentes de la muestra. La técnica tiene varias aplicaciones, que incluyen: identificar compuestos desconocidos por la masa del compuesto y/o de fragmentos de los mismos; determinar la composición isotópica de uno o más elementos de un compuesto; determinar la estructura de compuestos mediante observación de la fragmentación del compuesto; cuantificar la cantidad de un compuesto en una muestra utilizando procedimientos cuidadosamente diseñados (la espectrometría de masas no es intrínsecamente cuantitativa); estudiar los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y de partículas neutras en vacío); determinar otras propiedades físicas, químicas o incluso biológicas de compuestos con una variedad de otros enfoques.

Un espectrómetro de masas es un dispositivo utilizado para la espectrometría de masas, y produce un espectro de masas de una muestra para analizar su composición. Esto se logra normalmente ionizando la muestra y separando iones de diferentes masas y registrando su abundancia relativa mediante la medición de las intensidades del flujo de iones. Un espectrómetro de masas típico comprende tres partes: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector.

El tipo de fuente de iones es un factor contribuyente que influye enormemente en el tipo de muestras que se pueden analizar mediante 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 ion-molécula durante las colisiones en la fuente. Dos técnicas utilizadas a menudo con muestras biológicas líquidas y sólidas incluyen la ionización por electronebulización (ESI) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Otras técnicas incluyen bombardeo atómico rápido (FAB), termonebulización, ionización química a presión atmosférica (APCI), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) e ionización térmica.

La detección de un analito en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza mediante espectroscopia de masas.

La detección por resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en el hecho de que ciertos núcleos con número de masa impar, incluyendo el H y el  $^{13}\text{C}$ , giran alrededor de un eje de forma aleatoria. Sin embargo, cuando se colocan entre los polos de un imán fuerte, los espines se alinean ya sea de forma paralela o antiparalela al campo magnético, estando la orientación paralela favorecida por tener una energía ligeramente más baja. Los núcleos se irradian entonces con radiación electromagnética que es absorbida y que coloca los núcleos paralelos en un estado de energía superior; en consecuencia, ahora están en "resonancia" con la radiación. Cada H o C producirá diferentes espectros dependiendo de su ubicación y de las moléculas adyacentes, o de los elementos del compuesto, ya que todos los núcleos de las moléculas están rodeados por nubes de electrones que cambian el campo magnético circundante y, por lo tanto, alteran la frecuencia de absorción.

Cuando una fuente emite un rayo de luz paralelo que golpea a las partículas en solución, parte de la luz se refleja, absorbe, transmite o dispersa. Estos fenómenos se pueden medir con un detector de dispersión de luz (DL). Las formas más prominentes de detección por DL se denominan nefelometría y turbidimetría. La nefelometría se define como la medición de la luz dispersada por una solución de partículas. Este procedimiento permite la detección de la porción de luz dispersada en una multitud de ángulos. La turbidimetría se define como la medida de la reducción de la luz transmitida debido a partículas en solución. Mide la dispersión de la luz como una disminución de la luz que se transmite a través de la solución de partículas. Por lo tanto, cuantifica la luz residual transmitida.

Los detectores infrarrojos cercanos funcionan escaneando compuestos en un espectro de 700 a 1100 nm. Las vibraciones de estiramiento y flexión de enlaces químicos particulares en cada molécula se detectan en ciertas longitudes de onda.

En un modo de realización preferente de acuerdo con la presente invención, una muestra de sangre completa derivada de un mamífero o una muestra de sangre completa anticoagulada derivada de un mamífero se someterá al tratamiento con un agente solubilizante de membrana como se describe en la presente invención y el analito de interés comprendido en dicha muestra tratada se detectará en línea, es decir, sin ninguna etapa adicional como filtración, precipitación o centrifugación. En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al procedimiento de análisis de una muestra de sangre completa, que comprende las etapas de procesar la muestra con un agente solubilizante de membrana en condiciones apropiadas para destruir la membrana de dichos glóbulos rojos y no destruir los núcleos de células eucariotas, someter dicha muestra procesada a una etapa de HPLC y detectar un analito de interés en dicha muestra. Preferentemente, las tres etapas del análisis anterior se realizan en línea.

Un analito de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula inorgánica u orgánica, incluyendo una biomolécula, excluyendo los ácidos nucleicos. El analito no será un ácido nucleico, especialmente no será un ADN. El analito se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un polipéptido, un carbohidrato y una molécula de fármaco inorgánica u orgánica. Preferentemente, el analito de interés tiene un PM de 10 000 Da o menos, más preferentemente de 9 kDa o menos, de 8 kDa o menos, de 7 kDa o menos, de 6 kDa o menos o de 5 kDa o menos, respectivamente.

Un polipéptido o proteína es una molécula que está esencialmente compuesta de aminoácidos y que tiene al menos dos aminoácidos unidos por enlace peptídico. En el caso del analito de interés que se va a investigar en un procedimiento divulgado en el presente documento, el polipéptido consistirá preferentemente en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 y 30 hasta aproximadamente 100 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido contendrá de 5 a 100, más preferentemente de 10 a 40 aminoácidos. Los analitos peptídicos de interés adecuados son, por ejemplo, hormonas peptídicas y otros polipéptidos presentes en la circulación y, especialmente, polipéptidos liberados de glóbulos rojos debido al tratamiento con un agente solubilizante de membrana de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se usa en la detección en línea de un analito a partir de una muestra de sangre completa en la que dicho analito se encuentra al menos parcialmente en el interior de un glóbulo rojo.

Un analito diana preferente de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en las drogas y los fármacos inmunodepresores.

5 Analitos diana preferentes son las drogas. La droga se selecciona preferentemente del grupo que consiste en anfetamina, cocaína y metabolitos de cocaína como benzoilecgonina, metanfetamina, opiáceos y derivados de opiáceos, cannabinoides como tetrahidrocannabinol y fenciclidina.

10 Un analito diana más preferente es el folato, especialmente el folato total, que se encuentra tanto en el plasma sanguíneo como en los glóbulos rojos.

15 Analitos diana preferentes son fármacos inmunodepresores. El fármaco inmunodepresor se selecciona preferentemente del grupo que consiste en ciclosporina (CsA), micofenolato mofetilo (MMF), rapamicina (RAPA también conocida como sirolimus), tacrolimus (FK-506) azatioprina (AZA) y metilprednisolona (MP).

Más preferentemente es un analito diana que está presente en un glóbulo rojo. Los analitos preferentes que se van a medir a partir de una muestra de sangre completa sometida a hemólisis diferencial son sirolimus, tacrolimus y folato.

20 Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

### Descripción de las figuras

25 **Figura 1** Microscopia óptica de una dilución 1:10 de sangre completa hemolizada con agua. Se aplicó la tinción de May-Grünwald. Las membranas y los núcleos de los eritrocitos son visibles.

30 **Figura 2** Microscopia óptica de una dilución 1:10 de sangre completa hemolizada con tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio (25 %). Se aplicó la tinción de May-Grünwald. No quedan eritrocitos ni membranas, los núcleos están intactos.

**Figura 3** Microscopia óptica de una dilución 1:10 de sangre completa hemolizada con agua. Se usó tinción con azul tripano.

35 **Figura 4** Microscopia óptica de una dilución 1:10 de sangre completa hemolizada con tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio (25 %). Se usó tinción con azul tripano. a) Tiempo de incubación de 2,5 min: solo quedan unos pocos eritrocitos residuales; b) Tiempo de incubación de 15 min: no quedan eritrocitos ni membranas.

40 **Figura 5** Cromatograma CL-EM/EM de una dilución 1:10 de sangre completa enriquecida con rapamicina.

**Figura 6** Cromatograma CL-EM/EM de una muestra de sangre completa enriquecida con 5-metil-tetrahidrofolato. El 5-metil-tetrahidrofolato eluye a los 17,5 minutos.

### Ejemplo 1

#### **Evaluación de varios reactivos de hemólisis candidatos**

##### **Ejemplo 1.1 Evaluación visual de la hemólisis**

50 Solución A: sangre completa estabilizada con EDTA reciente se diluye con solución de cloruro de sodio 0,15 molar en una proporción 1:10 (50 µl de sangre-EDTA más 450 µl de solución de cloruro de sodio).

55 Solución B: se prepara una solución del reactivo de hemólisis candidato en cloruro de sodio 0,15 molar en la que la concentración del reactivo de hemólisis es dos veces mayor que la concentración final deseada en el hemolizado; por ejemplo, para obtener una concentración final de un 25 % de tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio, se prepara una solución al 50 % (50 mg de sal más 50 ml de cloruro de sodio 0,15 molar en agua).

60 En el caso de la adición de un segundo compuesto, por ejemplo, yoduro de potasio (cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio/KI), la sal indicada se agrega en una cantidad aproximadamente equimolar.

El hemolizado se prepara mezclando la solución A y la solución B en volúmenes iguales, por ejemplo, 500 µl de solución A más 500 µl de solución B.

65 Después de mezclar, en el hemolizado se inspecciona visualmente la turbidimetría y la transparencia inmediatamente después de la mezcla, después de 1 minuto, 2, 5, 6, 7, 20 y 40 minutos. Se registra el tiempo hasta que se observa una

solución transparente.

**Tabla 1: Evaluación visual de reactivos candidatos para hemólisis diferencial**

Reactivo de hemólisis	concentración final (peso/volumen)	transparente después de (min)
Tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio	25 %	20 min
Tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio	12,5 %	40 min
Tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio	6 %	turbio
Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio	25 %	20 min
Octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio	25 %	inmediatamente
Cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio	25 %	turbio
Cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio/KI	25 %/22 %	20 min
Cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio/KSCN	25 %/13 %	5 min
Cloruro de 1-hexilpiridinio/KSCN	25 %/12 %	inmediatamente
Cloruro de 1-hexilpiridinio/KSCN	12,5 %/6 %	1 min
Cloruro de 1-hexilpiridinio/KSCN	6,25 %/3 %	6 min
Cloruro de 1-hexilpiridinio/KSCN	3,12 %/1,5 %	turbio
Cloruro de 1-hexilpiridinio	25 %	7 min
Cloruro de 1-hexilpiridinio	12,5 %	turbio
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	25 %/10 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	12,5 %/5 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	6,25 %/2,5 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	3,12 %/1,25 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	2,5 %/1 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	1,25 %/0,5 %	2 min
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN	0,62 %/0,25 %	turbio
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio	25 %	inmediatamente
Cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio	2,5 %	turbio
Cloruro de N-octilpiridinio	25 %	2 min
Cloruro de 3-carbamoil-1-octiloximetilpiridinio	12,5 %	inmediatamente
Cloruro de 3-carbamoil-1-octiloximetilpiridinio	6,25 %	inmediatamente
Cloruro de 3-carbamoil-1-octiloximetilpiridinio	1,5 %	inmediatamente

5

Como es obvio a partir de la tabla anterior, mediante evaluación visual se pueden identificar visualmente buenos reactivos candidatos para la hemólisis diferencial.

#### Ejemplo 1.2 Evaluación microscópica de la hemólisis

10

Solución A: sangre completa estabilizada con EDTA reciente se diluye con solución de cloruro de sodio 0,15 molar en una proporción 1:10 (50 µl de sangre-EDTA más 450 µl de solución de cloruro de sodio).

15

Solución B: se prepara una solución del reactivo de hemólisis en cloruro de sodio 0,15 molar en la que la concentración del reactivo de hemólisis es dos veces mayor que la concentración final deseada en el hemolizado; por ejemplo, para obtener una concentración final de un 25 % de tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio, se prepara una solución al 50 % (50 mg de sal más 50 ml de cloruro de sodio 0,15 molar en agua). En el caso de la adición de un segundo anión, por ejemplo, yoduro (cloruro de 1-butil-3-metilpiridinio/KI), la sal indicada se agrega en una cantidad equimolar.

El hemolizado se prepara mezclando la solución A y B en volúmenes iguales, por ejemplo, 20 µl de solución A más 20 µl de solución B.

5 **Tinción de May-Grünwald y microscopia:**

Después de mezclar el hemolizado, se coloca una gotita sobre un portaobjetos del microscopio, se deja secar al aire a temperatura ambiente y se tiñe con reactivo de tinción May-Grünwald (Merck ref. cat. 1.01424, eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald). Después de tinción de los núcleos según May-Grünwald a diferentes tonos de púrpura, el citoplasma se ve en tonos de azul a rosa claro, gránulos finos de color rojizo a lila pueden estar presentes en el citoplasma de algunos tipos de células, los basófilos mostrarán gránulos de color azul oscuro a negro en el citoplasma, los eosinófilos mostrarán gránulos de color naranja brillante en el citoplasma y los glóbulos rojos se teñirán de color rosa a naranja.

15 La microscopia se realiza por microscopia óptica de inmersión en aceite (aumento x630).

Resultados comparativos: el lisado de la figura 1 obtenido con agua y el lisado de la figura 2 obtenido de acuerdo con la presente invención, respectivamente, muestran que la adición de un reactivo hemolizante apropiado conducirá en pocos minutos a la lisis completa de los eritrocitos.

20 **Tinción con azul tripano y microscopia:**

La muestra de sangre completa procesada se mezcla (1:1) con solución de azul tripano (Merck ref. cat. 1.11732; azul tripano C.I. 23850) y se dispensa en una cámara Neugebauer para microscopia. La microscopia se realiza por microscopia óptica de inmersión en aceite (aumento x630).

Resultados comparativos: el lisado de la figura 3 obtenido con agua y el lisado de las figuras 4a y 4b obtenidos de acuerdo con la presente invención, respectivamente, muestran que la adición de un reactivo hemolizante apropiado conducirá en pocos minutos a la lisis completa de los eritrocitos.

30 **Ejemplo 2**

**Evaluación de varios reactivos de hemólisis candidatos por HPLC**

35 Para evaluar la eficacia de la lisis, se inyecta una muestra de sangre completa hemolizada preparada de acuerdo con el ejemplo 1 en un sistema de HPLC y se monitoriza la contrapresión del sistema.

El sistema de HPLC consiste en un cromatógrafo de líquidos HP 1090 (Agilent) con un sistema de entrega de disolvente DR 5, un tomamuestras automático equipado con un termostato y un inyector automático. La eficacia de la lisis se evalúa inyectando 50 veces 10 µl de la muestra de sangre completa tratada en una columna de HPLC que tiene partículas Symmetry C18 de 5 µm como material del lecho, un diámetro interior de columna de 2 mm, una longitud de columna de 20 mm y una fritta con un tamaño de poro de 0,5 µm. El eluyente es un gradiente desde agua con ácido fórmico al 0,1 % hasta acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % en 5 minutos y a un caudal de 0,2 ml/min. El aumento de contrapresión observado en más de 50 inyecciones es inferior a 20 bar.

Si la lisis se logra solo con agua destilada, el aumento de contrapresión observado en las condiciones de HPLC anteriores es superior a 100 bar.

50 **Ejemplo 3**

**Medición de rapamicina en una muestra de sangre completa**

Una muestra de sangre completa se enriquece con rapamicina y se mezcla con un reactivo hemolizante. Se añaden 50 µl de una solución de 400 µg/ml de rapamicina en metanol/agua al 50 % a 450 µl de sangre-EDTA fresca, se homogeneiza la mezcla y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una alícuota de 50 µl de esta muestra de sangre completa enriquecida se diluye con 950 µl de una solución al 25 % de tetrafluoroborato de 1-butil-4-metilpiridinio en cloruro de sodio 0,15 molar en agua. Se inyectan 25 µl del hemolizado en el sistema de HPLC.

60 El sistema de HPLC consiste en un cromatógrafo de líquidos HP 1090 (Agilent) con un sistema de entrega de disolvente DR 5, un tomamuestras automático equipado con un termostato, un inyector automático y una válvula de derivación entre el HPLC y el espectrómetro de masas. El detector es un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal, Thermo Electron LTQ, con ionización por electronebulización. Para la separación cromatográfica se utiliza una columna de HPLC que tiene partículas Vydac C18 de 5 µm como material del lecho, un diámetro interior de columna de 2 mm, una longitud de columna de 250 mm y una fritta con un tamaño de poro de 0,5 µm. El eluyente es un gradiente desde agua con ácido

fórmico al 0,1 % (A) hasta acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % (B) en 30 minutos y, a continuación, es isocrático durante 10 minutos a 100 % de B. El caudal es de 0,2 ml/min. La rapamicina eluye aproximadamente a los 26 minutos (véase la figura 5).

#### 5 **Ejemplo 4**

##### **Medición de 5-metil-tetrahidrofolato en una muestra de sangre completa**

10 Una muestra de sangre completa se enriquece con 5-metil-tetrahidrofolato y se mezcla con reactivo hemolizante, 10 µl de una solución de 10 µg/ml de 5-metil-tetrahidrofolato en agua con ácido ascórbico al 1 % (ajustado a pH 7 con solución de hidróxido de sodio 4 M); a continuación, se añade a 90 µl de sangre-EDTA fresca. Se diluyen 10 µl de esta sangre enriquecida con 90 µl de cloruro de sodio 0,15 molar en agua y se mezclan con 100 µl de una solución de 2 mg de cloruro de 1-metil-1-octilpirrolidinio/KSCN en ácido ascórbico al 1 % (ajustado a pH 7 con solución de hidróxido de sodio 4 M). Este hemolizado se usa para el análisis por HPLC.

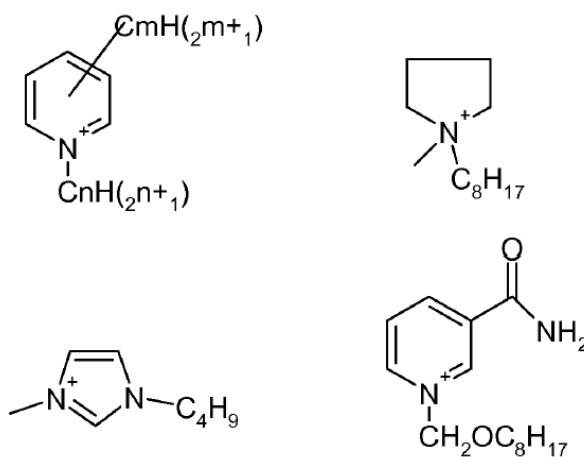
15 El sistema de HPLC consiste en un cromatógrafo de líquidos HP 1090 (Agilent) con un sistema de entrega de disolvente DR 5, un tomamuestras automático equipado con un termostato, un inyector automático y una válvula de derivación de 6 vías para el cambio de columna entre la precolumna y la columna de HPLC analítica. Para la inyección y la carga de la precolumna se usa una bomba Waters HPLC 515. El detector es un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal, Thermo Electron LTQ, con ionización por electronebulización. Para la separación cromatográfica se utiliza una precolumna ADS-C18, 25 x 4 mm (Merck) y una columna de HPLC analítica que tiene partículas Vydac C18 de 5 µm como material del lecho, un diámetro interior de columna de 2 mm, una longitud de columna de 250 mm y una fritada con un tamaño de poro de 0,5 µm. El disolvente A es agua con 0,5 % de ácido acético, el disolvente B es metanol con 0,5 % de ácido acético.

20 Se inyectan 20 µl de la muestra enriquecida y hemolizada en la precolumna ADS-C18 con eluyente A a un caudal de 1,5 ml/min. Después de 4 minutos, el analito atrapado eluye en modo de retrolavado (*backflush*) con un caudal de 0,2 ml/min en la columna analítica Vydac C18 aplicando un gradiente desde agua (con ácido acético al 0,5 %) (A) hasta metanol (con ácido acético al 0,5 %) (B) usando 0 % de B hasta 5 minutos, y un gradiente hasta 100 % de B entre 5 y 30 minutos a un caudal de 0,2 ml/min. El analito 5-metiltetrahidrofolato eluye aproximadamente a los 17 minutos (véase la figura 6).

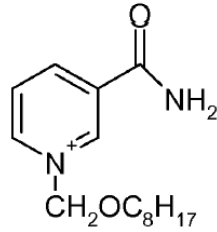
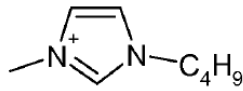
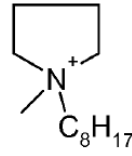
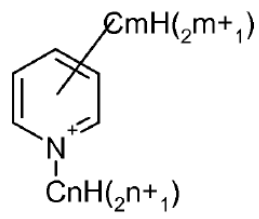


## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un analito en una muestra líquida que se sabe o se sospecha que comprende glóbulos rojos y se sospecha o se sabe que comprende células eucariotas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 a) procesar dicha muestra líquida con un agente solubilizante de membrana, lisando así las membranas celulares de los glóbulos rojos y, al mismo tiempo, no causando la precipitación de los constituyentes de la muestra,
- 10 b) someter la muestra procesada obtenida en la etapa (a) a una separación cromatográfica, en la que dicha separación cromatográfica se realiza mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y
- c) detectar el analito
- 15 en el que dicho reactivo solubilizante de membrana comprende un producto químico seleccionado de KBr (bromuro de potasio), KI (yoduro de potasio), KSCN (tiocianato de potasio) o una sal que consiste en uno o más de los siguientes cationes y aniones, en la que el catión se selecciona de

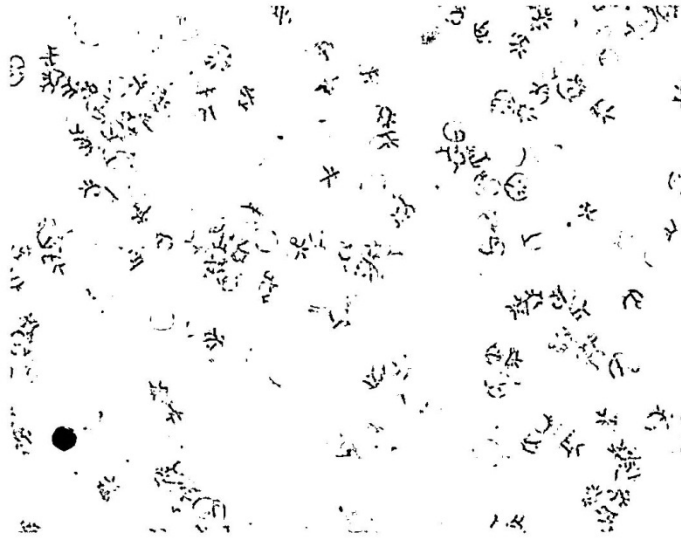


- 20 en el que m es 0 o 1 y n es 4 o 6, y en la que el anión se selecciona de cloruro, tetrafluoroborato, octilsulfato, yoduro y tiocianato y
- en el que dicho analito se detecta mediante espectroscopia de masas.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha separación cromatográfica se basa en la cromatografía en columna y se realiza mediante el uso de una columna que comprende una fritada y un material de lecho o mediante el uso de una columna monolítica.
- 30 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha fritada tiene un tamaño de poro de 0,2 o 0,5  $\mu\text{m}$ .
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en el que dicho material de lecho está en forma de partículas y las partículas tienen un diámetro de 1 a 10  $\mu\text{m}$ .
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona de líquido cefalorraquídeo y sangre completa.
6. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho analito está localizado al menos parcialmente dentro de un glóbulo rojo.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho analito es un fármaco inmunodepresor.
8. Uso de un agente solubilizante de membrana que comprende un producto químico seleccionado de KBr (bromuro de potasio), KI (yoduro de potasio), KSCN (tiocianato de potasio) o una sal que consiste en uno o más de los siguientes cationes y aniones, en la que el catión se selecciona de
- 45



5 en el que m es 0 o 1 y n es 4 o 6, y en la que el anión se selecciona de cloruro, tetrafluoroborato, octilsulfato, yoduro y tiocianato en la hemólisis diferencial de una muestra de sangre completa para la separación mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y la detección de analito mediante espectroscopia de masas.

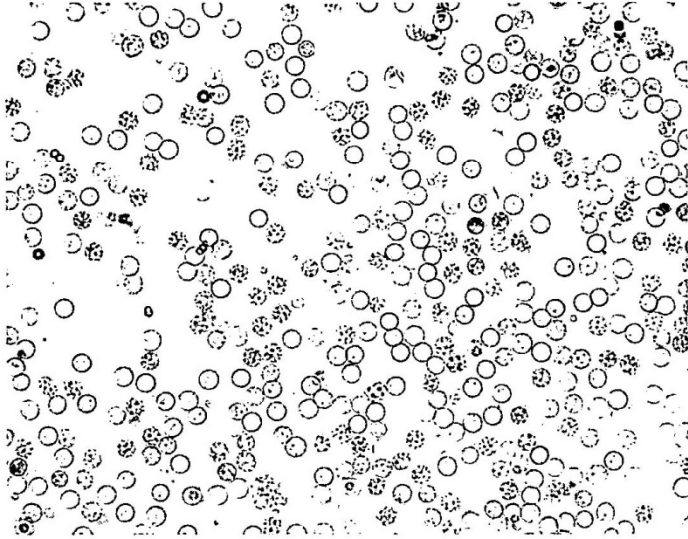
**Figura 1**



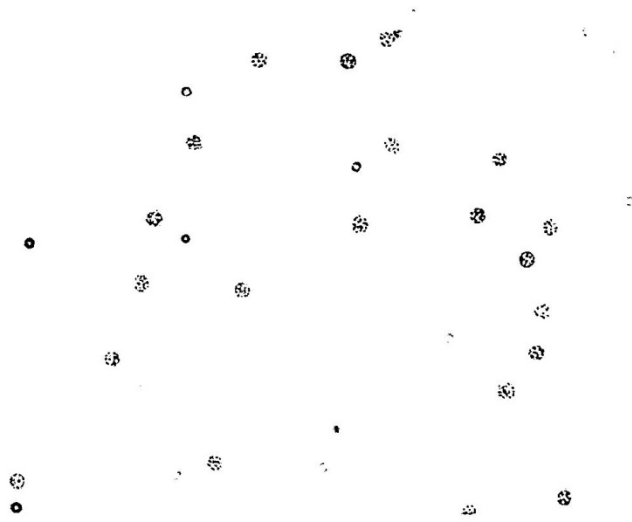
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4a**



**Figura 4b**

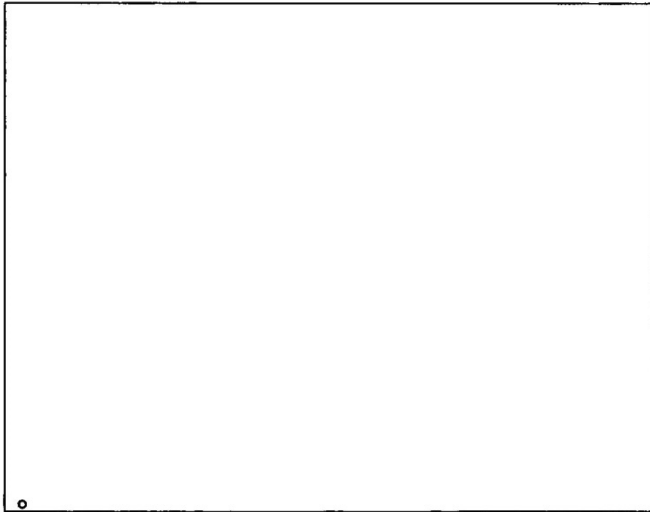
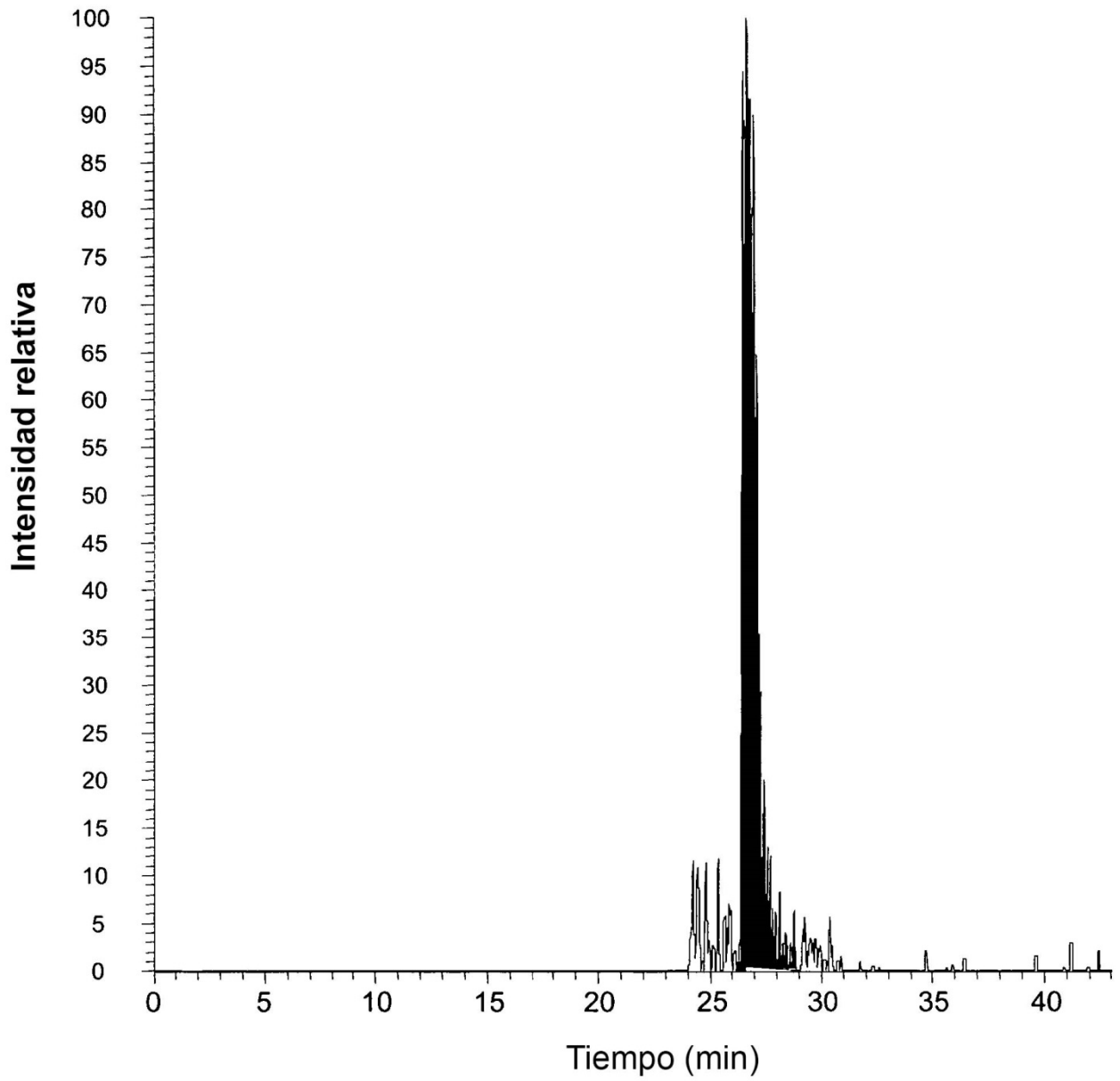


Figura 5



**Figura 6**

