

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 822**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/06** (2006.01)  
**G01N 30/24** (2006.01)  
**G01N 30/46** (2006.01)  
**G01N 30/88** (2006.01)  
**G01N 35/00** (2006.01)  
**B01D 15/18** (2006.01)  
**G01N 30/60** (2006.01)  
**G01N 30/72** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/EP2016/081538**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103180**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16819054 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3391041**

54 Título: **Sistema y procedimiento de diagnóstico clínico automatizado**

30 Prioridad:

**18.12.2015 EP 15201395**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.05.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRANZ, TOBIAS;**  
**KOBOLD, UWE;**  
**KUPSER, PETER y**  
**THIELE, ROLAND**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 761 822 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**

Sistema y procedimiento de diagnóstico clínico automatizado

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

Se divulga un sistema y procedimiento de diagnóstico clínico que incluye la preparación automatizada de muestras antes de cromatografía de líquidos multiplexada, opcionalmente acoplada a espectrometría de masas.

## 10 ANTECEDENTES

15 Existe un interés creciente por la implementación de la espectrometría de masas y más específicamente de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) en el laboratorio clínico. El número de procedimientos publicados especialmente para moléculas pequeñas en la detección de fármacos o pruebas de drogas está incrementándose.

20 Algunos kits listos para su uso para aplicaciones clínicas de EM prevalidadas están llegando a estar disponibles comercialmente. Sin embargo, el uso de la espectrometría de masas, incluso en relación con dichos kits, puede no estar autorizado por las autoridades sanitarias para el diagnóstico clínico. Esto se debe principalmente a la falta de procedimientos estandarizados, excepto para muy pocos analitos, y debido al todavía gran número de factores dependientes del usuario, por ejemplo, debido a una serie de etapas manuales que todavía se realizan y la diversidad de componentes físicos que se pueden usar y combinar, y que desempeñan un papel en el suministro de resultados fiables y reproducibles de relevancia clínica. En particular, la preparación de muestras es típicamente un procedimiento manual y tedioso. La precipitación de proteínas con la centrifugación posterior es el procedimiento más popular para retirar la matriz de muestra no deseada y potencialmente perturbadora. El uso de kits puede en parte facilitar la preparación de muestras que puede ser al menos en parte automatizada. Sin embargo, los kits solo están disponibles para un número limitado de analitos de interés y todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la separación y la detección, sigue siendo complejo, requiriendo la asistencia de personal de laboratorio altamente capacitado para hacer funcionar instrumentos altamente sofisticados.

35 Además, típicamente, se sigue un enfoque por lotes, donde un lote de muestras preparadas con antelación en las mismas condiciones de preparación se somete a tandas de separación consecutivas en las mismas condiciones de separación. Sin embargo, este enfoque no permite un alto rendimiento y no es flexible, por ejemplo, no permite la reprogramación (cambio de una secuencia de procesamiento predefinida) a la vista, por ejemplo, de muestras urgentes entrantes que tienen mayor prioridad y se tienen que procesar en primer lugar.

40 El documento WO 2012/058632 divulga un sistema automatizado de preparación y análisis de muestras de la técnica anterior. Los documentos EP 1 881 329, WO 2013/151920 y EP 2 402 766 divulgan procedimientos para programar muestras en un analizador clínico combinatorio.

45 En el presente documento se describe un sistema y un procedimiento que hacen que el uso de CL acoplada a espectrometría de masas sea más cómodo y más fiable y, por lo tanto, adecuado para el diagnóstico clínico. En particular, se puede obtener un alto rendimiento, por ejemplo, hasta 100 muestras/hora o más con preparación de muestra de acceso aleatorio y separación por CL, permitiendo al mismo tiempo el acoplamiento en línea a la espectrometría de masas. Además, el procedimiento se puede automatizar completamente incrementando el tiempo de funcionamiento autónomo y disminuyendo el nivel de habilidades requeridas.

## 50 DESCRIPCIÓN GENERAL

Se describe un sistema de diagnóstico clínico de acuerdo con la reivindicación 1 y un procedimiento de diagnóstico clínico de acuerdo con la reivindicación 11. El sistema de diagnóstico clínico comprende una estación de preparación de muestras para la preparación automatizada de muestras que comprenden analitos de interés, una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) que comprende una pluralidad de canales de CL y una interfaz de preparación de muestras/CL para introducir muestras preparadas en cualquiera de los canales de CL. El sistema de diagnóstico clínico comprende además un controlador programado para asignar muestras a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización, dependiendo de los analitos de interés. El controlador se programa además para asignar un canal de CL para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés y para planificar una secuencia de introducción en canales de CL para introducir las muestras preparadas que permita que los analitos de interés de diferentes canales de CL eluyan en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento en base a los tiempos de elución previstos. El controlador se programa además para establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras que genera una secuencia de salida de muestras preparadas que coincide con la secuencia de introducción en canales de CL.

Un "sistema de diagnóstico clínico" es un aparato automatizado de laboratorio especializado en el análisis de muestras para diagnóstico *in vitro*. El sistema de diagnóstico clínico puede tener diferentes configuraciones de acuerdo con la necesidad y/o de acuerdo con el flujo de trabajo de laboratorio deseado. Se pueden obtener configuraciones adicionales acoplando una pluralidad de aparatos y/o módulos conjuntamente. Un "módulo" es una celda de trabajo, típicamente de tamaño más pequeño que el sistema de diagnóstico clínico entero, que tiene una función especializada. Esta función puede ser analítica, pero también puede ser preanalítica o posanalítica o puede ser una función auxiliar de cualquiera de la función preanalítica, función analítica o función posanalítica. En particular, un módulo se puede configurar para que coopere con uno o más de otros módulos para llevar a cabo tareas especializadas de un flujo de trabajo de procesamiento de muestras, por ejemplo, realizando una o más etapas preanalíticas y/o analíticas y/o posanalíticas. En particular, el sistema de diagnóstico clínico puede comprender uno o más aparatos analíticos, diseñados para ejecutar flujos de trabajo respectivos que estén optimizados para determinados tipos de análisis, por ejemplo, bioquímica clínica, inmunoquímica, coagulación, hematología, separación por cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, etc. Por tanto, el sistema de diagnóstico clínico puede comprender un aparato analítico o una combinación de cualquiera de dichos aparatos analíticos con flujos de trabajo respectivos, donde los módulos preanalíticos y/o posanalíticos se pueden acoplar a aparatos analíticos individuales o pueden estar compartidos por una pluralidad de aparatos analíticos. Como alternativa, las funciones preanalíticas y/o posanalíticas se pueden realizar por unidades integradas en un aparato analítico. El sistema de diagnóstico clínico puede comprender unidades funcionales tales como unidades de manipulación de líquidos para pipeteo y/o bombeo y/o mezcla de muestras y/o reactivos y/o líquidos del sistema, y también unidades funcionales para clasificación, almacenamiento, transporte, identificación, separación, detección.

El término "muestra" se refiere a un material biológico sospechoso de contener uno o más analitos de interés y cuya detección, cualitativa y/o cuantitativa, se puede asociar a una afección clínica. La muestra se puede derivar de cualquier fuente biológica, tal como un líquido fisiológico, incluyendo sangre, saliva, líquido del cristalino, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, células o similares. La muestra se puede pretratar antes de su uso, tal como preparar plasma a partir de sangre, diluir líquidos viscosos, lisis o similares; los procedimientos de tratamiento pueden implicar filtración, centrifugación, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes y la adición de reactivos. Una muestra se puede usar directamente como se obtiene de la fuente en algunos casos o después de un flujo de trabajo de pretratamiento y/o preparación de la muestra para modificar el carácter de la muestra, por ejemplo, después de añadir un patrón interno, después de diluirla con otra solución o después de haberla mezclado con reactivos, por ejemplo, para permitir llevar a cabo una o más pruebas de diagnóstico *in vitro*, o para enriquecer (extraer/separar/concentrar) analitos de interés y/o retirar componentes de la matriz que potencialmente interfieren en la detección del(de los) analito(s) de interés. El término "muestra" se usa tendencialmente para indicar una muestra antes de la preparación de la muestra, mientras que el término "muestra preparada" se usa para referirse a muestras después de la preparación de la muestra. En casos no especificados, el término "muestra" puede indicar en general una muestra antes de la preparación de la muestra o una muestra después de la preparación de la muestra o ambas. Ejemplos de analitos de interés son vitamina D, drogas, fármacos, hormonas y metabolitos en general. Sin embargo, la lista no es exhaustiva.

En particular, el sistema de diagnóstico clínico comprende una estación de preparación de muestras para la preparación automatizada de muestras. Una "estación de preparación de muestras" es un módulo preanalítico acoplado a uno o más aparatos analíticos o una unidad en un aparato analítico diseñado para ejecutar una serie de etapas de procesamiento de muestras destinadas a retirar o al menos reducir los componentes de la matriz interferentes en una muestra y/o enriquecer analitos de interés en una muestra. Dichas etapas de procesamiento pueden incluir una o más de las siguientes operaciones de procesamiento llevadas a cabo en una muestra o una pluralidad de muestras, secuencialmente, en paralelo o de manera escalonada: pipeteo (aspiración y/o dispensación) de líquidos, bombeo de líquidos, mezcla con reactivos, incubación a determinada temperatura, calentamiento o enfriamiento, centrifugación, separación, filtración, tamizado, secado, lavado, resuspensión, división en alícuotas, transferencia, almacenamiento...).

De acuerdo con un modo de realización, la estación de preparación de muestras comprende una unidad de manipulación de microesferas magnéticas para tratar muestras con reactivos, que comprende microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de analitos y/o matrices para extraer/enriquecer analitos de interés y retirar o al menos reducir los componentes de la matriz. En particular, la unidad de manipulación de microesferas magnéticas comprende al menos una estación de trabajo magnética o electromagnética para contener al menos un recipiente de reacción y para manipular microesferas magnéticas añadidas a una muestra o muestras contenidas en el mismo. La unidad de manipulación de microesferas magnéticas puede comprender además un mecanismo de mezcla para mezclar líquidos y/o resuspender las microesferas magnéticas en el(los) recipiente(s) de reacción, por ejemplo, removiendo o agitando el(los) recipiente(s) de reacción, por ejemplo, mediante un mecanismo de rotación excéntrica. De forma alternativa, la unidad de manipulación de microesferas puede ser un sistema de flujo continuo donde las microesferas magnéticas se capturan en un canal o un dispositivo de flujo continuo capilar. De acuerdo con este modo realización, la captura, el lavado y la liberación de analitos se pueden hacer capturando y liberando repetidamente las microesferas magnéticamente en un canal de flujo continuo.

El término "microesfera" no necesariamente se refiere a una conformación esférica sino a una partícula que tiene un tamaño promedio en el intervalo nanométrico o micrométrico y que tiene cualquier conformación posible.

5 También se pueden usar microesferas no magnéticas. En ese caso, la captura y liberación se pueden basar en la filtración. La estación de preparación de muestras puede comprender además uno o más dispositivos de pipeteo o dispositivos de transporte de líquidos para añadir/retirar líquidos, tales como muestras, reactivos, líquidos de lavado, líquidos en suspensión, a/desde el(los) recipiente(s) de reacción.

10 La estación de preparación de muestras puede comprender además un mecanismo de transporte del recipiente de reacción.

15 Como alternativa o además de la manipulación de microesferas magnéticas, se pueden usar otras técnicas, tales como precipitación de proteínas seguida de centrifugación, extracción en fase sólida basada en cartucho, extracción en fase sólida basada en punta de pipeta, extracción de líquido-líquido, extracción basada en afinidad (inmunoabsorción, impresiones moleculares, aptámeros, etc.).

20 Un "reactivo" es una sustancia usada para el tratamiento de una muestra para, por ejemplo, preparar una muestra para su análisis, para permitir que se produzca una reacción, o para permitir la detección de un parámetro físico de la muestra o el analito contenido en la muestra. En particular, un reactivo puede ser una sustancia que es o comprende un reactante, típicamente un compuesto o agente que, por ejemplo, se puede unir a o puede transformar químicamente uno o más analitos presentes en una muestra o un componente de la matriz no deseado de la muestra. Ejemplos de reactantes son enzimas, sustratos enzimáticos, tintes conjugados, moléculas de unión a proteínas, ligandos, moléculas de unión a ácidos nucleicos, anticuerpos, agentes quelantes, promotores, inhibidores, epítomos, antígenos y similares. Sin embargo, el término reactivo se usa para incluir cualquier líquido que se pueda añadir a una muestra, incluyendo un líquido de dilución, que incluye agua u otro disolvente o una solución tampón, o una sustancia que se usa para la ruptura de la unión específica o no específica de un analito a una proteína, proteínas de unión o superficies.

30 La muestra se puede proporcionar, por ejemplo, en recipientes de muestra tales como tubos de muestra, incluyendo tubos principales y tubos secundarios, o placas de múltiples pocillos, o cualquier otro soporte para portar muestras. Los reactivos pueden estar dispuestos, por ejemplo, en forma de recipientes o casetes que contienen reactivos individuales o un grupo de reactivos, y colocados en receptáculos o posiciones apropiados dentro de un compartimento de almacenamiento o transportador. Se pueden proporcionar otros tipos de reactivos o líquidos del sistema en recipientes a granel o por medio de un suministro de línea.

40 Una "estación de separación por cromatografía de líquidos (CL)" es un aparato o módulo analítico o una unidad en un aparato analítico diseñado para someter las muestras preparadas a separación cromatográfica para, por ejemplo, separar analitos de interés de los componentes de la matriz, por ejemplo, los componentes restantes de la matriz después de la preparación de muestras que todavía pueden interferir en una detección posterior, por ejemplo, una detección por espectrometría de masas, y/o para separar analitos de interés entre sí para permitir su detección individual. De acuerdo con un modo de realización, la estación de separación por CL es un aparato o módulo analítico intermedio o una unidad en un aparato analítico diseñado para preparar una muestra para espectrometría de masas y/o transferir la muestra preparada a un espectrómetro de masas. En particular, la estación de separación por CL es una estación de CL multicanal que comprende una pluralidad de canales de CL dispuestos en paralelo.

50 Un "canal de CL" es una línea fluidica que comprende al menos un tubo capilar y/o una columna de CL que comprende una fase estacionaria seleccionada de acuerdo con el tipo de muestra(s) y analitos y a través de la que se bombea una fase móvil para capturar y/o separar y eluir y/o transferir analitos de interés en condiciones seleccionadas, por ejemplo, de acuerdo con su polaridad o valor logarítmico de p, tamaño o afinidad, como se conoce en general. La al menos una columna de CL en el al menos un canal de CL puede ser intercambiable. En particular, la estación de separación por CL puede comprender más columnas de CL que canales de CL, donde una pluralidad de columnas de CL se puede acoplar de manera intercambiable al mismo canal de CL. Un tubo capilar puede soslayar una columna de CL o puede permitir el ajuste de volúmenes muertos para afinar los márgenes del tiempo de elución.

60 De acuerdo con determinados modos de realización, la estación de separación por CL comprende al menos un canal de CL más rápido con un tiempo de ciclo más corto y al menos un canal de CL más lento con un tiempo de ciclo más largo. Sin embargo, la estación de separación por CL puede comprender de forma alternativa al menos dos canales de CL más rápidos sin canales de CL más lentos o al menos dos canales de CL más lentos sin canales de CL más rápidos.

65 Un "tiempo de ciclo" es el tiempo que se tarda desde la introducción de una muestra (inyección) en un canal de CL hasta que el mismo canal de CL está listo para la introducción de otra muestra. En otras palabras, un tiempo de ciclo es el tiempo mínimo que transcurre entre dos introducciones de muestras consecutivas en el mismo

canal de CL en condiciones predeterminadas y se puede medir en segundos. El tiempo de ciclo incluye el tiempo de inyección, el tiempo de separación hasta la elución del último analito de interés y el tiempo de reequilibrado para preparar la columna para una nueva inyección.

5 Los términos "más rápido" y "más lento" con referencia a un canal de CL son solo términos relativos usados para comparar diferentes canales de CL entre ellos en la misma estación de separación por CL. En particular, los términos están relacionados con la duración del tiempo de ciclo y no necesariamente con las capacidades de resolución de los canales de CL. Sin embargo, típicamente, un canal de CL más lento tiene una resolución mayor que un canal de CL más rápido y un canal de CL más rápido tiene una resolución menor que un canal de CL más lento, donde la resolución del canal de CL más rápido se puede ver comprometida a favor de la velocidad. Típicamente, un canal de CL más rápido tiene un tiempo de ciclo menor que 60 segundos, por ejemplo, de 5 segundos hasta 60 segundos, más típicamente en el intervalo de 20 - 40 segundos, mientras que un canal de CL más lento como un tiempo de ciclo mayor que 60 segundos, típicamente tiene un tiempo de ciclo en el intervalo entre 60 segundos y 600 segundos, más típicamente 60 - 400 segundos.

15 De acuerdo con un modo de realización, la estación de separación por CL comprende al menos dos canales de CL más rápidos o al menos un canal de CL más rápido con al menos dos columnas de CL intercambiables y al menos dos canales de CL más lentos, por ejemplo, 2 canales de CL más rápidos y 4 canales de CL más lentos. Los canales de CL más lentos pueden ser iguales o diferentes entre ellos, por ejemplo, uno que comprende una columna de CLHI y otro que comprende una columna de fase inversa (FI) o una columna de pentafluorofenilo (PFP), donde las condiciones se seleccionan de modo que el tiempo de ciclo pueda ser el mismo para diferentes columnas, respectivamente. Los canales de CL más rápidos pueden ser iguales o diferentes entre ellos, respectivamente, por ejemplo, uno que comprende una columna de CLHI y otro que comprende una columna de fase inversa (FI) o una columna de pentafluorofenilo (PFP), donde las condiciones se seleccionan de modo que el tiempo de ciclo pueda ser el mismo para diferentes columnas, respectivamente.

20 De acuerdo con un modo de realización, el al menos un canal de CL más rápido es un canal de análisis de inyección en flujo capilar (AIF) o un canal de cromatografía de líquidos en línea de captura y elución rápida y el al menos un canal de CL más lento es un canal de cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento (UHPLC).

30 En particular, dependiendo de los analitos de interés, cada muestra preparada se puede introducir en un canal de CL más rápido o en un canal de CL más lento. Por ejemplo, si una muestra requiere solo purificación y concentración de analito, como se puede obtener una separación suficiente, por ejemplo, en un análisis de espectrometría de masas posterior y/u otra técnica de separación, la muestra se introduce en un canal de CL más rápido, por ejemplo, un canal de AIF o de cromatografía de líquidos en línea de captura y elución rápida. En tal caso, se elige una fase estacionaria que retiene los analitos de interés, mientras que cualquier sal, tampón, detergente y otros componentes de la matriz no se retienen y se eliminan por lavado. Típicamente, este procedimiento va seguido por la elución de los analitos, por ejemplo, en modo de retrolavado, con una fase móvil diferente o un gradiente de disolvente. Dependiendo de los analitos, se puede prever la separación de algunos analitos en algunos casos. Por otra parte, en el caso de analitos que tienen masas idénticas (isobáricas) y/o espectros de iones derivados con solapamiento en monitorización de reacciones múltiples (MRM), cuando se trata de espectrometría de masas, podría ser preferente una separación cromatográfica más extensa. En ese caso, la muestra se atribuye a un canal de CL más lento, por ejemplo, un canal de UHPLC.

45 La estación de separación por CL típicamente comprende además un número suficiente de bombas, por ejemplo, bombas binarias en caso de condiciones que requieren el uso de gradientes de elución, y varias válvulas de conmutación.

50 El sistema de diagnóstico clínico comprende además una interfaz de preparación de muestras/CL para introducir muestras preparadas en cualquiera de los canales de CL. Una "interfaz de preparación de muestras/CL" es un módulo entre la estación de preparación de muestras y la estación de separación por CL o una unidad integrada en la estación de preparación de muestras o en la estación de separación por CL o que comparte componentes entre la estación de preparación de muestras y la estación de separación por CL. La interfaz de preparación de muestras/CL puede comprender una unidad de manipulación de recipientes o una unidad de recepción de muestras preparadas con una o más de una función de retención, una función de agarre, una función de transferencia. De acuerdo con un modo de realización, la unidad receptora de muestras preparadas es un rebajo reutilizable en el que las muestras preparadas se reciben una después de otra de acuerdo con la secuencia de salida de muestras preparadas justo antes de que se introduzcan en un canal de CL, donde el rebajo se puede lavar entre muestras consecutivas.

60 La interfaz de preparación de muestras/CL comprende una unidad de manipulación de líquidos para introducir muestras preparadas a cualquiera de los canales de CL. La unidad de manipulación de líquidos puede comprender cualquiera de uno o más de un dispositivo de pipeteo, una bomba, un tomamuestras automático, un dispositivo de inyección en flujo, una o más válvulas de conmutación, en particular al menos una válvula de conmutación para conmutar entre canales de CL. En particular, la unidad de manipulación de recipientes y la

65

unidad de manipulación de líquidos se pueden diseñar para permitir el acceso aleatorio de cualquier canal de CL disponible a cualquier muestra preparada.

5 El sistema de diagnóstico clínico comprende además un controlador. Un "controlador" es un controlador lógico programable que ejecuta un programa legible por ordenador provisto de instrucciones para realizar operaciones de acuerdo con un plan de operaciones y, en particular, asociado con la preparación de muestras y la introducción en un canal de CL.

10 En particular, el controlador puede cooperar con un programador para tener en cuenta los pedidos de análisis recibidos y un número de operaciones de procedimiento programadas asociadas con la ejecución de los pedidos de análisis para decidir cuándo y qué muestra se tiene que preparar y, para cada muestra, cuándo y qué etapa de preparación se tiene que ejecutar. Como diferentes tipos de muestras y/o diferentes analitos de interés contenidos en los mismos o diferentes tipos de muestras pueden requerir diferentes condiciones de preparación, por ejemplo, diferentes reactivos, o diferente número de reactivos, diferentes volúmenes, diferentes tiempos de incubación, diferentes condiciones de lavado, etc., la preparación de diferentes muestras puede requerir diferentes flujos de trabajo de preparación de muestras. Por tanto, el controlador está programado para asignar muestras a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras, que incluye, por ejemplo, diferentes etapas y/o un número diferente de etapas, y que requiere un tiempo predefinido para su finalización, por ejemplo, de unos minutos a varios minutos.

20 Por tanto, el controlador puede programar la preparación de muestras para que se realice en paralelo o de manera escalonada para diferentes muestras. Al hacerlo de una manera lógica, el controlador programa el uso de recursos funcionales de la estación de preparación de muestras para incrementar la eficacia evitando al mismo tiempo conflictos y maximiza el rendimiento preparando las muestras a un ritmo al que las muestras preparadas se puedan introducir en la estación de separación por CL. Esto significa que, en lugar de preparar un lote de muestras con antelación, lo que por supuesto también es posible, el controlador puede indicar a la estación de preparación de muestras que prepare las muestras según sea necesario o según se puedan tomar desde la estación de separación por CL, en particular por los canales de CL individuales, teniendo en cuenta al mismo tiempo los pedidos entrantes, por ejemplo, pedidos prioritarios, tiempo de preparación, uso requerido de recursos funcionales y, especialmente, disponibilidad del canal de CL para el que se destina esa muestra para cuando se complete la preparación de la muestra.

35 Los flujos de trabajo de preparación de muestras pueden ser específicos de un analito y se puede asignar una muestra a un flujo de trabajo de preparación de muestras predefinido dependiendo del analito o analitos de interés en la muestra. Una muestra también se puede someter a un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras que típicamente es específico del tipo de muestra antes de someterla a un flujo de trabajo de preparación de muestra específico de analito predefinido. Por ejemplo, puede haber al menos un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras para sangre completa, al menos un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras para plasma y/o suero, al menos un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras para orina, y así sucesivamente, donde diferentes flujos de trabajo de pretratamiento de muestras pueden incluir diferentes etapas o un número diferente de etapas que pueden requerir un tiempo diferente para su finalización.

45 Un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras puede incluir etapas de procesamiento tales como la adición de un patrón interno, la adición de un reactivo hemolizante, la adición de un reactivo enzimático, la incubación a una temperatura predefinida, la adición de un líquido diluyente, etc.

50 Por tanto, el controlador se puede programar para asignar también un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras predefinido a cada muestra. Por supuesto, cualquiera o la totalidad de las etapas de un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras se pueden incluir también en un flujo de trabajo de preparación de muestras de modo que el controlador pueda asignar solo un flujo de trabajo a cada muestra y, a menos que se especifique de otro modo, el término "flujo de trabajo de preparación de muestras predefinido" puede incluir también un flujo de trabajo de pretratamiento de muestras. La separación del pretratamiento de muestras y la preparación de muestras en dos flujos de trabajo, cada uno de los cuales se puede iniciar individualmente, puede tener la ventaja de dar más flexibilidad al controlador al establecer la secuencia de inicio de la preparación de muestras.

60 Además, como la estación de separación por CL incluye una pluralidad de canales de CL, es ventajoso que los eluidos de CL de diferentes canales de CL salgan de forma escalonada y no simultáneamente, de modo que las salidas de eluido de CL se puedan detectar secuencialmente, por ejemplo, por un único detector común, y se distinguen mejor entre sí siguiendo un enfoque multiplexado.

El término "eluido de CL" se usa en el presente documento para indicar una fracción del eluido que comprende al menos un analito de interés.

65 Por tanto, el controlador se programa además para asignar (reservar con antelación) un canal de CL para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés y para planificar una secuencia de introducción en

canales de CL de las muestras preparadas que permita que los analitos de interés de diferentes canales de CL eluyan en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento en base a los tiempos de elución previstos.

5 El controlador se programa además para establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras, que incluye la programación de las etapas de preparación de muestras para cada muestra, que genera una secuencia de salida de muestras preparadas que coincide con la secuencia de introducción en canales de CL.

10 Una "secuencia de inicio de preparación de muestras" se refiere al orden en el que las muestras se comienzan a preparar una después de otra.

Una "secuencia de salida de muestras preparadas" se refiere al orden en el que se completa la preparación de muestras que han comenzado la preparación de muestras.

15 Puesto que diferentes muestras en una secuencia de inicio de preparación de muestras se pueden someter a diferentes flujos de trabajo de preparación de muestras que pueden requerir diferentes tiempos para su finalización, el orden en el que las muestras se comienzan a preparar puede ser diferente del orden en el que las muestras se terminan de preparar. En otras palabras, la secuencia de inicio de preparación de muestras puede ser diferente de la secuencia de salida de muestras preparadas.

20 Una "secuencia de introducción en canales de CL" se refiere al orden de los canales de CL en el que las muestras preparadas en la secuencia de salida de muestras preparadas se introducen una después de otra.

25 El controlador se programa para establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras que genera una secuencia de salida de muestras preparadas que coincide con la secuencia de introducción en el canal de CL. Esto significa programar el inicio y el final de la preparación de muestras para cada muestra, de modo que, cuando se complete la preparación de una muestra, el canal de CL asignado también esté disponible y la muestra preparada se pueda introducir en el canal de CL asignado, antes de que se complete la preparación de otra muestra o antes de que la siguiente muestra preparada llegue a la interfaz de preparación de muestras/CL. De esta manera, el sistema de diagnóstico clínico se puede hacer funcionar continuamente y se puede obtener el tiempo de respuesta más corto desde el pedido de análisis recibido hasta el resultado del análisis.

35 Una "secuencia de salida de eluidos de CL" se refiere al orden de los canales de CL desde los que salen los eluidos uno después de otro. Especialmente en el caso de canales de CL más rápidos y más lentos con diferentes tiempos de ciclo, respectivamente, la secuencia de salida de eluidos de CL puede ser diferente de la secuencia de introducción en canales de CL.

40 Al ejecutar una separación por cromatografía de líquidos multiplexada que combina el uso de canales de CL más lentos y canales de CL más rápidos, con tiempos de ciclo más largos y más cortos, respectivamente, y al controlar la preparación de muestras y la introducción en los canales de CL de una manera lógica que sigue un ritmo dictado por un período de referencia, se puede obtener mayor flexibilidad, en términos de número de analitos diferentes que se pueden analizar, y un mayor rendimiento del análisis de muestras, en comparación con la ejecución, por ejemplo, de una separación secuencial solo en canales de CL más rápidos o una separación multiplexada solo en canales de CL más lentos.

50 Un "período de referencia" es un marco de tiempo, cuya duración puede ser fija, que establece un ritmo al que se produce uno cualquiera o más de los posibles eventos y que establece un delimitador de tiempo dentro del que se pueden producir dichos uno o más eventos. En particular, puede ser ventajoso establecer que el período de referencia sea tan largo como el tiempo de ciclo más corto de un canal de CL más rápido.

55 Por ejemplo, el período de referencia establece los delimitadores para el margen del tiempo de elución del al menos un canal de CL más lento para la elución de analitos de interés. En particular, las condiciones de ejecución, incluyendo el tipo y tamaño de la columna, la fase móvil, las condiciones de elución y reequilibrado, del al menos un canal de CL más lento se seleccionan de modo que el margen del tiempo de elución de los analitos de interés sea tan largo como o más corto que el período de referencia.

60 Al asignar canales de CL y planificar la secuencia de introducción en canales de CL, el controlador tiene en cuenta los tiempos de ciclo más cortos y más largos de los canales de CL más rápidos y más lentos, respectivamente. De acuerdo con un modo de realización, el tiempo de ciclo más largo del al menos un canal de CL más lento es  $n$  veces el tiempo de ciclo más corto y, de ahí,  $n$  veces el período de referencia, donde  $n$  es un número entero igual a o mayor que 2. Típicamente,  $n$  está comprendido entre 2 y 10 ( $n = 2-10$ ). En otras palabras, el tiempo de ciclo más largo se define en múltiplos del período de referencia.

65 De acuerdo con determinados modos de realización, también se programan etapas de preparación de muestras o grupos de etapas de preparación de muestras de los flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos

para que se produzcan en márgenes de tiempo tan largos como un período de referencia o múltiplos del período de referencia. En este caso, se puede completar un flujo de trabajo de muestras predefinido en un tiempo correspondiente a un múltiplo de períodos de referencia, es decir,  $n$  veces el período de referencia, donde  $n$  es un número entero igual a o mayor que 2, y donde  $n$  puede ser diferente para diferentes flujos de trabajo de preparación de muestras.

Al expresar la duración de los flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos y/o los tiempos de ciclo en términos de períodos de referencia, y en particular en múltiplos de períodos de referencia, donde el período de referencia es una unidad de tiempo con una duración constante, se hace más fácil que el controlador planifique la secuencia de introducción en canales de CL y la secuencia de inicio de preparación de muestras para maximizar la eficacia y el rendimiento.

De acuerdo con un modo de realización, la preparación de una nueva muestra en la secuencia de inicio de preparación de muestras se inicia con una frecuencia de una muestra por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia. Esto significa que puede haber períodos de referencia vacíos sin que se inicie una preparación de muestras, en una línea de tiempo que consiste en una secuencia de períodos de referencia, entre períodos de referencia en los que se inicia la preparación de una nueva muestra.

De acuerdo con un modo realización, la preparación de muestras en la secuencia de salida de muestras preparadas se completa con una frecuencia de una muestra preparada por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia. En consecuencia, la introducción de muestras preparadas en la estación de separación por CL se puede producir con una frecuencia de una introducción de una muestra por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia. Esto significa que puede haber períodos de referencia vacíos sin que se complete una preparación de muestras o que no se introduzca una muestra preparada en un canal de CL, en una línea de tiempo que consiste en una secuencia de períodos de referencia, entre períodos de referencia en los que se completa la preparación de una muestra y se introduce una muestra preparada en un canal de CL.

La finalización de la preparación de una muestra y la introducción de la misma muestra preparada no se tienen que producir necesariamente en el mismo período de referencia, sino que se pueden producir en períodos de referencia contiguos o en períodos de referencia separados por uno o más períodos de referencia.

Esto permite que el controlador tenga aún más flexibilidad al planificar la secuencia de introducción en canales de CL.

De acuerdo con un modo de realización, los eluidos de CL en la secuencia de salida de eluidos de CL salen con una frecuencia de un eluido de CL por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia. Esto significa que puede haber períodos de referencia vacíos sin un eluido de CL, en la misma línea de tiempo que consiste en una secuencia de períodos de referencia, entre períodos de referencia en los que hay un eluido de CL.

En particular, el controlador se programa para establecer cada vez la secuencia de inicio de preparación de muestras y la secuencia de introducción en canales de CL más conveniente tratando al mismo tiempo de minimizar el número de períodos de referencia vacíos para maximizar el rendimiento. En particular, siempre que sea posible, el controlador trata de obtener una salida de eluidos de CL por período de referencia.

En la práctica habitual, dependiendo del número y tipo de muestras entrantes y los pedidos de análisis respectivos, se podría requerir un canal de CL en lugar de otro, por ejemplo, un canal de CL más lento en lugar de un canal de CL más rápido o viceversa, un tipo de columna en un canal de CL en lugar de otro tipo de columna en otro canal de CL. Por tanto, es posible que el uso de algunos canales de CL sea más frecuente que el uso de otros canales de CL.

Son posibles diferentes modos de realización o grados de flexibilidad en base también al número y tipo de canales de CL, por ejemplo, al número y tipo de los canales de CL más rápidos y más lentos, respectivamente.

De acuerdo con uno de varios modos de realización posibles, para explicar el concepto con un ejemplo, la estación de separación por CL puede comprender dos canales de CL más rápidos y cuatro canales de CL más lentos. El tiempo de ciclo más corto y, de ahí, el período de referencia puede ser, por ejemplo, 36 s, mientras que el tiempo de ciclo más largo puede ser, por ejemplo, 288 s, es decir, ocho veces el período de referencia (8 x 36 s). Las condiciones de ejecución de los canales de CL más lentos se seleccionan de modo que el margen del tiempo de elución para los canales de CL más lentos sea igual a o menor que 36 s en este caso. Los dos canales de CL más rápidos se pueden ejecutar secuencialmente con un rendimiento de una muestra por período de referencia (36 s/muestra). Los cuatro canales de CL más lentos se pueden ejecutar de manera escalonada con un rendimiento de una muestra cada dos períodos de referencia (72 s/muestra).

Puesto que el margen del tiempo de elución de los canales de CL más lentos es igual a o menor que un período de referencia y los eluidos de CL de los canales de CL más rápidos vienen en intervalos de dos períodos de referencia, es posible introducir una nueva muestra cada período de referencia y ejecutar un canal de CL más rápido entre dos márgenes de elución consecutivos de los canales de CL más lentos y, de este modo, obtener una salida de eluidos de CL desde un canal de CL más rápido o un canal de CL más lento por período de referencia, en este caso cada 36 s. En este ejemplo, se puede obtener un rendimiento de una muestra/36 s, es decir, 100 muestras/hora.

El tiempo de ciclo más corto y, de este modo, el período de referencia es ajustable de acuerdo con el rendimiento deseado del sistema de diagnóstico clínico y/o de acuerdo con el número y tipo de canales de CL más rápidos y más lentos, respectivamente, y/o de acuerdo con los flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos.

En el ejemplo anterior, la introducción de muestras en un canal de CL más rápido se alternaría con la introducción de muestras en un canal de CL más lento si todos los canales de CL se usaran continuamente.

El rendimiento real puede cambiar cada vez que se programe el análisis de una nueva serie de muestras, dependiendo del número y tipo de muestras entrantes y pedidos de análisis respectivos, de una priorización permanente de muestras y de la configuración de los canales de CL. Es posible, por ejemplo, que dos o más canales de CL más rápidos se ejecuten entre dos canales de CL más lentos consecutivos o viceversa. También es posible, por ejemplo, que para una serie de muestras solo se usen canales de CL más lentos. Con la configuración del ejemplo anterior, entonces solo se puede obtener un rendimiento de una muestra cada dos períodos de referencia. Por supuesto, al cambiar el número de canales de CL, por ejemplo, al tener un número suficientemente alto de canales de CL, y/o los tiempos de ciclo respectivos, se puede obtener finalmente un rendimiento de una muestra por período de referencia en cualquier escenario o al menos en la mayoría de los casos. Como continuación del ejemplo anterior, esto se podría obtener, por ejemplo, con una configuración de los canales de CL que comprende 8 canales de CL más lentos o con el mismo número de canales de CL más lentos que tienen un tiempo de ciclo 4 veces el período de referencia en lugar de 8 veces el período de referencia.

En la planificación de una nueva secuencia de introducción en canales de CL y el establecimiento de una nueva secuencia de inicio de preparación de muestras, el controlador puede tener en cuenta información sobre una serie de pruebas de diagnóstico clínico que se llevarán a cabo. Por ejemplo, el usuario puede seleccionar el tipo y el número de pruebas que se van a llevar a cabo en base a los pedidos de pruebas recibidos o los pedidos de pruebas previstos, por ejemplo, manualmente o escaneando códigos de barras o leyendo cualquier otra etiqueta que lleve información específica de la muestra. También, por ejemplo, el sistema de diagnóstico clínico puede registrar automáticamente pedidos cuando las muestras entran en el sistema, por ejemplo, leyendo códigos de barras o cualquier otra etiqueta que lleve información específica de la muestra. También, por ejemplo, el controlador se puede conectar a un sistema de información de laboratorio (SIL) o a un sistema de información de hospital (SIH) para rastrear automáticamente pedidos de pruebas entrantes y prepararlo para los pedidos de pruebas entrantes, planificando de este modo la secuencia de introducción en canales de CL y la secuencia de inicio de preparación de muestras antes de que la muestra llegue realmente o cuando llegue.

En particular, el controlador se puede programar para planificar una nueva secuencia de introducción en canales de CL y establecer una nueva secuencia de inicio de preparación de muestras en base también al orden en que las muestras se transportan o se insertan en el sistema de diagnóstico clínico. De forma alternativa o, además, el controlador puede sugerir el orden en que las muestras, por ejemplo, muestras individuales transportadas en un único portarrecipientes, tales como discos, se deben transportar al sistema de diagnóstico clínico para optimizar la secuencia de introducción en canales de CL y la secuencia de inicio de preparación de muestras. De acuerdo con un modo de realización, la secuencia de introducción en canales de CL y la secuencia de inicio de preparación de muestras se pueden actualizar continua y dinámicamente a medida que se proporcionan nuevas muestras. Esto puede tener en cuenta la llegada de muestras urgentes con mayor prioridad en comparación con otras muestras. El sistema de diagnóstico clínico, por ejemplo, la estación de preparación de muestras, también puede comprender una unidad intermedia para recibir una pluralidad de muestras antes de que se inicie una nueva secuencia de inicio de preparación de muestras, donde las muestras pueden ser aleatoriamente accesibles individualmente y su preparación individual se puede iniciar de acuerdo con la secuencia de inicio de preparación de muestras.

De acuerdo con determinados modos de realización, el sistema de diagnóstico clínico comprende además un espectrómetro de masas (EM) y una interfaz de CL/EM para conectar la estación de separación por CL al espectrómetro de masas.

De acuerdo con un modo de realización, la interfaz de CL/EM comprende una fuente de ionización, para la generación de moléculas de analito cargadas (iones moleculares) y la transferencia de las moléculas de analito cargadas a la fase gaseosa. De acuerdo con determinados modos de realización, la fuente de ionización es una fuente de ionización por electropulverización (IEN) o una fuente de ionización por electropulverización calentada (IENC) o una fuente de ionización química a presión atmosférica (IQPA) o una fotoionización a presión

atmosférica (FIPA) o una fuente de ionización por láser a presión atmosférica (ILPA). Sin embargo, la interfaz de CL/EM puede comprender una fuente de ionización doble, por ejemplo, una fuente de IEN y una de IQPA o una fuente de ionización intercambiable modular.

5 Dichas fuentes de ionización son conocidas en la técnica y no se aclaran más aquí.

Para optimizar las condiciones de ionización, puede ser preferente ajustar la composición del disolvente añadiendo un flujo auxiliar directamente antes de la fuente de iones para ajustar el pH, las sales, los tampones o el contenido orgánico.

10 De acuerdo con un modo de realización, todos los canales de CL se pueden conectar de forma alternativa a la fuente de ionización y el controlador controla una conmutación de válvulas de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL.

15 De acuerdo con un modo de realización, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de barrido rápido. De acuerdo con un modo de realización, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas en tándem que puede seleccionar iones moleculares originales, generar fragmentos por fragmentación inducida por colisión y separar los fragmentos o iones derivados de acuerdo con su proporción de masa a carga ( $m/z$ ). De acuerdo con un modo de realización, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, como es conocido en la técnica.

20 De acuerdo con un modo de realización, la interfaz de CL/EM comprende además un módulo de movilidad de iones entre la fuente de ionización y el espectrómetro de masas. De acuerdo con un modo de realización, el módulo de movilidad de iones es un módulo de espectrometría de movilidad de iones de forma de onda asimétrica de alto campo (EMIAC), como también es conocido en la técnica, y que puede lograr la separación de iones moleculares en la fase gaseosa, incluyendo iones isobáricos, en milisegundos. Una separación en fase gaseosa con movilidad de iones antes de la espectrometría de masas podría compensar una separación cromatográfica insuficiente, por ejemplo, de interferencias isobáricas, especialmente para eluidos de CL del al menos un canal de CL más rápido. Además, las interfaces de movilidad de iones para espectrómetros de masas pueden reducir la señal de fondo general evitando que el fondo y otros iones no específicos entren en el espectrómetro de masas.

25 De acuerdo con un modo de realización, el controlador se programa además para establecer una secuencia de introducción de fuente de ionización. El término "secuencia de introducción de fuente de ionización" se refiere al orden en el que los eluidos de CL se introducen en la fuente de ionización. Típicamente, la secuencia de introducción de fuente de ionización corresponde a la secuencia de salida de eluidos de CL. Sin embargo, usando, por ejemplo, canales de derivación o canales de diferente longitud o cambiando la velocidad del flujo, también se puede cambiar la secuencia de introducción de fuente de ionización. Esto permite que el controlador tenga aún más flexibilidad al planificar la secuencia de introducción en canales de CL.

40 De acuerdo con un modo de realización, los eluidos de CL en la secuencia de salida de eluidos de CL se introducen en la fuente de ionización con una frecuencia de un eluido de CL por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia. Esto significa que puede haber períodos de referencia vacíos sin que se introduzca un eluido de CL en la fuente de ionización, en la misma línea de tiempo que consiste en una secuencia de períodos de referencia, entre períodos de referencia en los que hay una introducción de fuente de ionización.

50 El controlador se puede programar para asegurarse de que solo se introduzca un eluido de CL por período de referencia en la fuente de ionización teniendo en cuenta la secuencia de introducción en canales de CL y la secuencia de salida de eluidos de CL y controlando la conmutación de válvulas en consecuencia.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de diagnóstico clínico. El procedimiento comprende preparar automáticamente muestras que comprenden analitos de interés.

55 El procedimiento comprende además introducir las muestras preparadas en una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) que comprende una pluralidad de canales de CL.

60 El procedimiento comprende además asignar muestras a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización, dependiendo de los analitos de interés.

El procedimiento comprende además asignar un canal de CL para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés.

El procedimiento comprende además planificar una secuencia de introducción en canales de CL para las muestras preparadas que permita que los analitos de interés de diferentes canales de CL eluyan en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento en base a los tiempos de elución previstos.

5 El procedimiento comprende además establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras que genera una secuencia de salida de muestras preparadas que coincide con la secuencia de introducción en el canal de CL.

10 De acuerdo con un modo de realización del procedimiento de diagnóstico clínico, la pluralidad de canales de CL comprende al menos un canal de CL más rápido con un tiempo de ciclo más corto y al menos un canal de CL más lento con un tiempo de ciclo más largo.

15 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento comprende establecer un período de referencia. De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento comprende establecer el período de referencia para que sea tan largo como el tiempo de ciclo más corto, en el que el al menos un canal de CL más lento tiene un margen del tiempo de elución para la elución de analitos de interés que es tan largo como o más corto que el período de referencia.

20 De acuerdo con un modo de realización, el tiempo de ciclo más corto es menor que 60 segundos y el tiempo de ciclo más largo es mayor que 60 segundos. De acuerdo con un modo de realización, el tiempo de ciclo más largo es  $n$  veces el período de referencia, donde  $n$  es un número entero igual a o mayor que 2.

25 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además comenzar la preparación de una nueva muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia (vacíos) posibles entre muestras consecutivas en la secuencia de inicio de preparación de muestras.

30 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además completar la preparación de una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia (vacíos) posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de salida de muestras preparadas.

35 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento comprende además programar etapas de preparación de muestras o grupos de etapas de preparación de muestras de los flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos para que se produzcan en márgenes de tiempo tan largos como un período de referencia o múltiplos del período de referencia. En este caso, el procedimiento puede comprender completar flujos de trabajo de muestras predefinidos en tiempos respectivos correspondientes a un múltiplo de períodos de referencia, es decir,  $n$  veces el período de referencia, donde  $n$  es un número entero igual a o mayor que 2, y donde  $n$  puede ser diferente para diferentes flujos de trabajo de preparación de muestras.

40 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además introducir una muestra preparada en cualquiera de los canales de CL por período de referencia con uno o más períodos de referencia (vacíos) posibles entre introducciones consecutivas de muestras en canales de CL a partir de la secuencia de salida de muestras preparadas.

45 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además la salida de un eluido de CL por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre eluidos de CL consecutivos de la secuencia de salida de eluidos de CL.

50 Para que el al menos un canal de CL más lento tenga un margen del tiempo de elución para la elución de analitos de interés que sea tan largo como o más corto que el período de referencia, el procedimiento comprende establecer condiciones cromatográficas apropiadas del al menos un canal de CL más lento. Establecer las condiciones cromatográficas apropiadas puede comprender cualquiera de uno o más de ajustar la composición de la fase móvil, ajustar la forma del gradiente, elegir una fase estacionaria óptima, así como adaptar la longitud y el diámetro de la columna cromatográfica. La duración del margen del tiempo de elución se puede ajustar además ajustando el caudal de la fase móvil y/o interrumpiendo temporalmente el flujo. Además, se pueden usar efectos de columna adicionales como volúmenes muertos incrementados en el canal de CL. Por lo tanto, el experto en la técnica puede elegir cualquiera de los procedimientos anteriores o combinaciones de los mismos de acuerdo con los procedimientos de desarrollo de procedimientos estándar (tales como, por ejemplo, los descritos en "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline", c62-A, Vol. 34. n.º 16, por el Clinical and Laboratory Standards Institute) para obtener el grado deseado de separación y la duración deseada del margen del tiempo de elución, dependiendo también de los analitos de interés. Como puede haber diferentes condiciones cromatográficas óptimas para diferentes analitos, la mejor solución intermedia que sea adecuada para tantos analitos como sea posible o al menos para clases de analitos se puede determinar empíricamente, al menos en parte, por ejemplo, sometiendo a prueba diferentes condiciones con una muestra que comprenda una mezcla de analitos de interés.

65

De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además conectar de forma alternativa los canales de CL a una interfaz de CL/EM que conecta la estación de separación por CL a un espectrómetro de masas de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL.

5 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de diagnóstico clínico comprende además separar analitos de interés en un módulo de movilidad de iones entre una fuente de ionización y el espectrómetro de masas.

10 El procedimiento puede comprender optimizar el procedimiento de ionización, así como ajustar y calibrar el espectrómetro de masas. El rendimiento óptimo se obtiene típicamente mediante el ajuste para cada analito de interés usando patrones puros. Por lo tanto, el procedimiento puede comprender encontrar las condiciones más adecuadas que sean la mejor solución intermedia para tantos analitos de interés como sea posible tanto para la fuente de iones como para el espectrómetro de masas, aunque no sea óptimo para cada analito, para evitar finalmente un equilibrado lento durante la conmutación en el procedimiento, por ejemplo, cambiar la temperatura de la fuente de ionización.

15 De acuerdo con un modo de realización, la preparación automática de muestras comprende tratar muestras con microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de analitos o matrices o en primer lugar con microesferas que portan grupos selectivos de matrices y a continuación con microesferas que portan grupos selectivos de analitos o en primer lugar con microesferas que portan grupos selectivos de analitos y a continuación con microesferas que portan grupos selectivos de matrices.

20 El tratamiento de muestras con microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de analitos tiene la función de enriquecer analitos capturando los analitos de interés, eliminando por lavado los componentes de la matriz libres y a continuación liberando los analitos capturados de las microesferas en una solución sin matriz más concentrada. Este procedimiento se puede usar para enriquecer compuestos de bajo peso molecular a partir de muestras biológicas líquidas complejas tales como plasma, suero, sangre completa o sangre hemolizada como se describe, por ejemplo, en el documento US7815803. En particular, comprende poner en contacto una muestra con partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrófoba (selectiva y no específica para compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo, compuestos de menos de 1500 Da), incubar la muestra con las partículas, adsorbiendo de este modo los analitos a la superficie hidrófoba, separar las partículas mediante aplicación de un campo magnético y retirando el líquido, opcionalmente lavar las partículas, eluyendo el compuesto de las partículas.

25 El procedimiento de tratamiento de muestras con microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de matriz, por otra parte, está destinado principalmente a disminuir en la muestra las proteínas, fosfolípidos y otros componentes de matriz altamente abundantes con un valor límite de peso molecular de aproximadamente 1500-2000 Da uniéndolos a las microesferas, mientras que los analitos de interés permanecen en el sobrenadante, que a continuación se usa para un análisis posterior. Se describe un procedimiento similar, por ejemplo, en la revista Clinical Biochemistry, 46(7), 652-655.

30 Una combinación tanto de la técnica de enriquecimiento de analitos como de la técnica de disminución de la matriz, al menos para algunas muestras, puede tener la ventaja de ampliar el número de analitos diferentes que se pueden extraer de una muestra, para evitar diluciones innecesarias y para ser más eficaces en la retirada de la matriz.

35 Otros y objetivos, rasgos característicos y ventajas adicionales aparecerán a partir de la siguiente descripción de los modos de realización ejemplares y los dibujos adjuntos, que sirven para explicar los principios más detalladamente.

#### 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una representación esquemática de un sistema de diagnóstico clínico y un procedimiento de diagnóstico clínico.

55 La FIG. 2 representa esquemáticamente elementos de un procedimiento de diagnóstico clínico.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que representa una primera parte del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle.

60 La FIG. 4 es un diagrama de flujo que representa una segunda parte del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 3.

65 La FIG. 5 es un diagrama de flujo que representa una tercera parte del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 4.

La FIG. 6 es un diagrama de flujo que representa una cuarta parte del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 5.

La FIG. 7 proporciona tres ejemplos de flujos de trabajo específicos de analitos.

5

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Con referencia a la FIG. 1, se describe un ejemplo de sistema de diagnóstico clínico 100. El sistema de diagnóstico clínico 100 comprende una estación de preparación de muestras 50 para el pretratamiento automatizado y la preparación de muestras 10 que comprenden analitos de interés. La estación de preparación de muestras 50 comprende una unidad de manipulación de microesferas magnéticas 51 para tratar las muestras con microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de analitos y/o matriz. El sistema de diagnóstico clínico 100 comprende además una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) 60 que comprende una pluralidad de canales de CL C1-n, C'1-n, donde C1-n son canales de CL más rápidos con un tiempo de ciclo más corto y C'1-n son canales de CL más lentos con un tiempo de ciclo más largo y donde n puede ser cualquier número entero igual a o mayor que 1. Por tanto, la estación de separación por CL 60 puede comprender al menos un canal de CL más rápido C1 con un tiempo de ciclo más corto y al menos un canal de CL más lento C'1 con un tiempo de ciclo más largo. Sin embargo, la estación de separación por CL 60 puede comprender una pluralidad solo de canales de CL más rápidos C1-n, donde n es al menos 2, o una pluralidad solo de canales de CL más lentos C'1-n, donde n es al menos 2.

En este ejemplo, la estación de separación por CL 60 comprende dos canales de CL más rápidos C1-n, donde  $n = 2$ , con un tiempo de ciclo más corto y cuatro canales de CL más lentos C'1-n, donde  $n = 4$ , con un tiempo de ciclo más largo, donde la duración relativa de los respectivos tiempos de ciclo más cortos y más largos se indica esquemáticamente (no a escala) por la diferente longitud de las barras que representan los canales de CL C1-n y C'1-n respectivamente en la FIG. 1. El tiempo de ciclo más corto es, por ejemplo, 36 segundos y este tiempo define un período de referencia. El tiempo de ciclo más largo es n veces el período de referencia, donde n es un número entero igual a o mayor que 2, por ejemplo 8, que es 288 segundos. Además, los márgenes del tiempo de elución de los canales de CL más lentos para la elución de analitos de interés son tan largos como o más cortas que el período de referencia eligiendo las columnas de CL y configurando las condiciones cromatográficas en consecuencia.

Los dos canales de CL más rápidos C1-n son canales de cromatografía de líquidos en línea de captura y elución rápida, comprendiendo uno de ellos, por ejemplo, una columna de fase inversa y comprendiendo el otro, por ejemplo, una columna de CLIH. Los canales de CL más lentos C'1-n son canales de cromatografía líquida de ultraalto rendimiento (UHPLC) que comprenden, por ejemplo, dos columnas de fase inversa y dos columnas de CLIH, respectivamente.

El sistema de diagnóstico clínico 100 comprende además una interfaz de preparación de muestras/CL 70 para introducir muestras preparadas en cualquiera de los canales de CL C1-n, C'1-n.

El sistema de diagnóstico clínico 100 comprende además un controlador 80 programado para asignar muestras 10 a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización, dependiendo de los analitos de interés. El controlador 80 se programa además para asignar (reservar con antelación) un canal de CL C1-n, C'1-n para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés y para planificar una secuencia de introducción en canales de CL I1-n para introducir las muestras preparadas que permita que los analitos de interés de diferentes canales de CL C1-n, C'1-n eluyan en una secuencia de salida de eluidos de CL E1-n sin solapamiento en base a los tiempos de elución previstos. El controlador 80 se programa además para establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n que genera una secuencia de salida de muestras preparadas P1-n que coincide con la secuencia de introducción en canales de CL I1-n.

En la FIG. 1, cada muestra de la secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n, cada muestra preparada de la secuencia de salida de muestras preparadas P1-n y la secuencia de introducción en canales de CL I1-n, cada eluido de CL de la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n se indica en un segmento de una secuencia que comprende segmentos contiguos sin solapamiento, representando esquemáticamente cada segmento un período de referencia. Cada secuencia es, por tanto, una secuencia de períodos de referencia o unidades de tiempo, cuya duración se puede fijar y permanecer constante a través de las diferentes secuencias. En particular, el tiempo de ciclo más corto del canal de CL más rápido se puede tomar como período de referencia, en este ejemplo 36 segundos.

La preparación de nuevas muestras en la secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n se inicia con una frecuencia de una muestra por período de referencia, es decir, cada 36 segundos en este ejemplo, o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia, indicados por segmentos vacíos en la secuencia, en los que no se inicia ninguna preparación de muestras.

65

Además, la preparación de muestras en la secuencia de salida de muestras preparadas P1-n se completa con una frecuencia de una muestra preparada por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia, indicados por segmentos vacíos en la secuencia, en los que no se completa ninguna preparación de muestras.

Además, las muestras preparadas se introducen en los respectivos canales de CL asignados de acuerdo con la secuencia de introducción en canales de CL I1-n con una frecuencia de una introducción en un canal de CL por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia, indicados por segmentos vacíos en la secuencia, en los que no tiene lugar ninguna introducción en un canal de CL.

Además, los eluidos de CL en la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n salen con una frecuencia de un eluido de CL por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia, indicados por segmentos vacíos en la secuencia, en los que no sale ningún eluido de CL.

El sistema de diagnóstico clínico 100 comprende además un espectrómetro de masas (EM) 90 y una interfaz de CL/EM 91 para conectar la estación de separación por CL 60 al espectrómetro de masas 90. La interfaz de CL/EM 91 comprende una fuente de ionización 92 y un módulo de movilidad de iones 95 entre la fuente de ionización 92 y el espectrómetro de masas 95. El módulo de movilidad de iones 95 es un módulo de espectrometría de movilidad de iones de forma de onda asimétrica de alto campo (EMIAC). El espectrómetro de masas 90 es un espectrómetro de masas en tándem y, en particular, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, que puede hacer una monitorización de reacciones múltiples (MRM).

Los canales de CL C1-n, C'1-n se pueden conectar de forma alternativa a la interfaz de CL/EM 91 y el controlador 80 controla una conmutación de válvulas 61 de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n para introducir un eluido de CL cada vez en la fuente de ionización 92. En particular, los eluidos de CL en la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n se introducen en la fuente de ionización 92 con una frecuencia de un eluido de CL por período de referencia o en intervalos separados por uno o más períodos de referencia de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n.

La fuente de ionización 92 es una fuente de ionización doble, que incluye una fuente de IEN 93 y una fuente de IQPA 94, donde, dependiendo del eluido de CL en la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n y del(de los) analito(s) de interés contenido(s) en el mismo, el controlador 80 puede seleccionar una de las dos fuentes de ionización 93, 94 que sea más apropiada. Al establecer la secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n, el controlador 80 puede agrupar conjuntamente (colocar contiguas entre sí en la secuencia) muestras también de acuerdo con la fuente de ionización 93, 94, de modo que se evite una conmutación frecuente entre las fuentes de ionización 93, 94. El cambio de fuente de ionización se puede planificar durante uno o más períodos de referencia vacíos, por ejemplo.

Con referencia continua a la FIG. 1 también se ilustra un procedimiento de diagnóstico clínico. El procedimiento comprende preparar automáticamente muestras 10 que comprenden analitos de interés e introducir muestras preparadas en una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) 60 que comprende una pluralidad de canales de CL C1-n, C'1-n. El procedimiento comprende además asignar muestras a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos (explicados con más detalle en la FIG. 2 a la FIG. 4), comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización dependiendo de los analitos de interés y posibles en el tipo de muestra. El procedimiento comprende además asignar un canal de CL C1-n, C'1-n para cada muestra preparada (explicada con más detalle en la FIG. 5) dependiendo de los analitos de interés. El procedimiento comprende además planificar una secuencia de introducción en canales de CL I1-n para las muestras preparadas que permita a los analitos de interés de diferentes canales de CL C1-n, C'1-n eluir en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento E1-n en base a los tiempos de elución previstos. El procedimiento comprende además establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n que genere una secuencia de salida de muestras preparadas P1-n que coincida con la secuencia de introducción en canales de CL I1-n.

El procedimiento de diagnóstico clínico comprende además comenzar la preparación de una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n.

El procedimiento de diagnóstico clínico comprende además completar la preparación de una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de salida de muestras preparadas P1-n.

El procedimiento de diagnóstico clínico comprende además producir un eluido de CL por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre eluidos de CL consecutivos de la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n.

El procedimiento de diagnóstico clínico comprende además conectar de forma alternativa los canales de CL C1-n, C'1-n de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL E1-n a una interfaz de CL/EM 91 que conecta la estación de separación por CL 60 a un espectrómetro de masas 90.

- 5 El procedimiento de diagnóstico clínico comprende además separar analitos de interés en un módulo de movilidad de iones 95 entre la fuente de ionización 92 y el espectrómetro de masas 90.

10 La FIG. 2 representa esquemáticamente elementos de un procedimiento de diagnóstico clínico y, en particular, una combinación de posibles rutas de flujo de trabajo que, dependiendo del tipo de muestra y/o los analitos de interés en una muestra, puede seguir una muestra según se determine por el controlador.

15 Por ejemplo, dependiendo del tipo de muestra, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, orina, se puede asignar una muestra a uno de algunos flujos de trabajo de pretratamiento dependientes del tipo de muestra predefinidos (parte I) que sea más apropiado para ese tipo de muestra.

20 Además, dependiendo de los analitos de interés, por ejemplo, analitos individuales o clases de analitos que tienen estructura química o propiedades similares, después del pretratamiento dependiente del tipo de muestra en la parte I, se puede asignar una muestra a uno de algunos flujos de trabajo de preparación de muestras dependientes de analito predefinidos, por ejemplo, basados en un procedimiento de disminución de matriz, un procedimiento de enriquecimiento de analito, o una combinación de ambos, que sea más apropiado para ese tipo de analito(s) (parte II).

25 Además, dependiendo de los analitos de interés, se puede asignar una muestra preparada a un canal de CL particular que sea más apropiado para separar o transferir ese tipo de analito(s) al espectrómetro de masas y, en particular, se puede asignar a uno de un canal de CL más rápido o un canal de CL más lento (parte III).

30 Además, dependiendo de los analitos de interés, se puede introducir un eluido de CL en una de las fuentes de ionización que sea más apropiada, por ejemplo, una fuente de IEN o IQPA, y se puede someter a separación en el módulo de EMAC o no (parte IV). Además, se puede predefinir la ruta en el espectrómetro de masas y, en particular, se puede decidir si se someterá a monitorización de reacciones múltiples (MRM) o no (sin MRM).

Finalmente, después de la espectrometría de masas, se puede realizar la evaluación de los datos, es decir, la identificación y posiblemente la cuantificación de cada analito de interés para cada muestra.

35 La FIG. 3 es un diagrama de flujo que representa la parte I del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y, en particular, la parte de pretratamiento de muestras. El controlador determina en primer lugar si se debe asignar un flujo de trabajo predefinido a una muestra S o si se debe llevar a cabo un control de calidad (CC) o una calibración (Cal.). Un flujo de trabajo de CC y/o de calibración puede seguir al menos algunas de las mismas etapas que uno de los flujos de trabajo de las muestras con la posible adición o eliminación de algunas de las etapas. Para el propósito de este ejemplo, solo se describen los flujos de trabajo de pretratamiento (PT) dependientes del tipo de muestra.

45 Por ejemplo, si la muestra es una muestra de sangre completa, se asigna a uno de los dos flujos de trabajo de PT de muestras predefinidos, que comprenden ambos la adición de un patrón interno (PI) y un reactivo de hemólisis (RH) seguido de un período predefinido de incubación (Inc.), donde la diferencia entre los dos flujos de trabajo es el orden en que se añaden el patrón interno (PI) y un reactivo de hemólisis (RH). Un patrón interno (PI) es típicamente una cantidad conocida del(de los) mismo(es) analito(s) de interés que puede(n) estar, por ejemplo, marcado(s) isotópicamente. Esto permite una comparación relativa, y puede permitir una identificación y cuantificación inequívocas del(de los) analito(s) de interés presente(s) en la muestra cuando el(los) analito(s) alcanzan el espectrómetro de masas.

50 Si la muestra es una muestra de orina, se asigna a uno de otros dos flujos de trabajo de PT de muestras predefinidos, que comprenden ambos la adición de un patrón interno (PI) y un reactivo enzimático (E) seguido de un período predefinido de incubación (Inc.), donde la diferencia entre los dos flujos de trabajo es el orden en que se añaden el patrón interno (PI) y un reactivo enzimático (RH). Un reactivo enzimático es típicamente un reactivo usado para la escisión de glucurónidos o la escisión de proteínas o cualquier procesamiento previo de analito o matriz.

55 Si la muestra es plasma o suero, se asigna a otro flujo de trabajo de PT predefinido que incluye solo la adición de un patrón interno (PI) seguido de un tiempo de incubación predefinido (Inc.). Opcionalmente, puede incluir además la adición de un reactivo de lisis (no mostrado).

60 Todos los flujos de trabajo de PT dependientes del tipo de muestra anteriores pueden comprender la adición de un líquido de dilución (Dil.). Sin embargo, la adición de un líquido de dilución (Dil.) también puede estar específicamente vinculada a uno o más de los flujos de trabajo de PT dependientes del tipo de muestra anteriores.

65

La FIG. 4 es un diagrama de flujo que representa la parte II del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 3. En particular, el controlador asigna cada muestra pretratada a uno de los flujos de trabajo de preparación de muestras dependientes de analito predefinidos dependiendo del(de los) analito(s) de interés en la muestra pretratada.

Por ejemplo, una muestra pretratada se puede someter a un flujo de trabajo de enriquecimiento de analito, un flujo de trabajo de disminución de matriz o un flujo de trabajo de disminución de matriz seguido de un flujo de trabajo de enriquecimiento de analito.

El flujo de trabajo de enriquecimiento de analito comprende la adición de microesferas magnéticas (MM) que portan grupos selectivos de analito a la muestra pretratada, seguido de un período de incubación predefinido (Inc.) para capturar el(los) analito(s) de interés, donde la adición de las microesferas magnéticas (MM) pueden incluir agitación o mezcla. La adición de las microesferas magnéticas (MM), dependiendo del(de los) analito(s) de interés, puede estar precedida por la adición de un reactivo de lisis (RL) seguido de un período de incubación predefinido (Inc.). Un reactivo de lisis (RL) puede ser un reactivo para la lisis de eritrocitos o la liberación de una proteína de unión o la liberación de una unión no específica. Después de la incubación con las microesferas magnéticas (MM), el flujo de trabajo comprende una etapa de lavado (L1) y, dependiendo del(de los) analito(s), posiblemente una o más etapas de lavado adicionales (L2). Una etapa de lavado (L1, L2) comprende una serie de etapas que incluyen la separación de las microesferas magnéticas (Sep. M) por una unidad de manipulación de microesferas magnéticas que comprende imanes o electroimanes, aspiración de líquido (Asp.), adición de un tampón de lavado (Tampón L.), resuspensión de las microesferas magnéticas (Res.), otra etapa de separación de las microesferas magnéticas (Sep. B) y otra aspiración del líquido (Asp.). Además, las etapas de lavado pueden diferir en términos de tipo de disolvente (agua/orgánico/sal/pH), además del volumen y el número o la combinación de ciclos de lavado.

La última etapa de lavado (L1, L2) va seguida por la adición de un reactivo de elución (RE) seguido de la resuspensión (Res.) de las microesferas magnéticas y un período de incubación predefinido (Inc.) para liberar el(los) analito(s) de interés de las microesferas magnéticas. Las microesferas magnéticas no unidas se separan a continuación (Sep. B) y el sobrenadante que contiene el(los) analito(s) de interés se puede transferir directamente a la estación de CL o después de una etapa de dilución mediante la adición de un líquido de dilución (Dil.). También se pueden usar diferentes procedimientos de elución/reactivos, cambiando, por ejemplo, el tipo de disolventes (agua/orgánico/sal/pH) y el volumen.

El flujo de trabajo de disminución de la matriz comprende la adición de microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de matriz (MM) y un reactivo de precipitación (RP) a la muestra pretratada, seguido de un período de incubación predefinido (Inc.), para capturar los componentes de la matriz mientras se deja el(los) analito(s) de interés en el sobrenadante, seguido de la separación de las microesferas (Sep. B) y la transferencia del sobrenadante que contiene el(los) analito(s) de interés a la estación de CL directamente o después de la dilución (Dil.).

Dependiendo del(de los) analito(s) de interés, el sobrenadante derivado del flujo de trabajo de disminución de la matriz se puede someter al flujo de trabajo de enriquecimiento de analito, siguiendo de este modo un flujo de trabajo de preparación de muestras combinado.

La FIG. 5 es un diagrama de flujo que representa la parte III del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 4. En particular, el controlador asigna a cada muestra preparada un canal de CL. El canal de CL puede ser un canal de CL más rápido C1-n o un canal de CL más lento C'1-n, dependiendo del(de los) analito(s) de interés en la muestra preparada. De forma alternativa, la muestra preparada puede soslayar cualquiera de los canales de CL más rápidos y más lentos C1-n, C'1-n y pasar por un capilar de inyección en flujo. El controlador envía a continuación los eluidos de CL secuencialmente de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL a la interfaz de CL/EM después de decidir si se requiere un modificador líquido o no.

La FIG. 6 es un diagrama de flujo que representa la parte IV del procedimiento de diagnóstico clínico de la FIG. 2 con más detalle y es una continuación del diagrama de flujo de la FIG. 5. En particular, el controlador asigna cada eluido de CL a una de dos fuentes de ionización, ya sea una fuente de IEN o IQPA, dependiendo del(de los) analito(s) de interés en el eluido de CL. El controlador decide a continuación si se requiere una separación por movilidad de iones (M. iones) y en particular una EMIAC antes de la espectrometría de masas. En ese caso, también se decide si se requiere un modificador gaseoso (Mod. G.). En una decisión final, se decide la ruta en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Q1, Q2, Q3) y, en particular, si se requiere monitorización de reacciones múltiples (MRM). La detección va seguida a continuación por la evaluación de datos.

En resumen, para cada muestra y, en particular, para cada analito o cada grupo de analitos de interés, se puede predefinir una ruta de flujo de trabajo específica en una tabla maestra o memoria. Como las diferentes rutas de flujo de trabajo pueden incluir un número diferente de etapas y/o etapas diferentes que pueden requerir un

tiempo diferente para su finalización, al planificar la secuencia de introducción en canales de CL I1-n y al configurar la secuencia de inicio de preparación de muestras S1-n, el controlador tiene en cuenta, por tanto, las diferentes rutas de flujo del flujo de trabajo predefinido y su duración respectiva, incluyendo el tiempo para cada etapa, y elige la secuencia más conveniente que evite conflictos y maximice el rendimiento, por ejemplo, una secuencia con el menor número de períodos de referencia vacíos.

La FIG. 7 proporciona tres ejemplos genéricos de rutas de flujo de trabajo específicas de analitos que se pueden predefinir en una tabla maestra o memoria, incluyendo cada una de ellas una selección de opciones entre opciones en general seleccionables (solo se indican las opciones más relevantes por motivos de simplicidad). Estas opciones seleccionables generales son, por ejemplo, la adición de un patrón interno (PI) o la no adición de PI (sin PI); la adición de un reactivo enzimático (E) o uno de dos reactivos de lisis (RL n.º 1, RL n.º 2); el flujo de trabajo de enriquecimiento o disminución; un tipo de microesferas magnéticas (MM A, MM B, MM C, MM D) donde los diferentes tipos de microesferas magnéticas son selectivos para grupos de analitos (por ejemplo, polares, no polares, cargados, no cargados) o específicos para analitos seleccionados (aglutinantes específicos); uno de diferentes procedimientos de lavado predefinidos (L n.º 1, L n.º 2, L n.º 3, L n.º 4) que incluye diferentes tipos de líquido de lavado (agua/orgánico/sal/pH), volumen, número o combinación de ciclos de lavado; tipo de canal de CL (CL más lento, CL más rápido o análisis de inyección en flujo (AIF)); uno de diferentes procedimientos de elución predefinidos (elución n.º 1, elución n.º 2, elución n.º 3, elución n.º 4), que incluyen diferentes tipos de líquido de elución (agua/orgánico/sal/pH) o volumen; tipo de fuente de ionización (IEN, IQPA); la opción de EMIAC o no EMIAC; y uno de diferentes procedimientos de adquisición de espectrometría de masas predefinidos (configuraciones para ionización, transferencia de iones, selección y fragmentación de iones, detección y adquisición de datos) y resumidos brevemente como EM MRM n.º 1, EM MRM n.º 2, EM MRM n.º 3, EM MRM n.º 4, EM MRM n.º 5.

Si el analito de interés es, por ejemplo, testosterona, el flujo de trabajo específico de testosterona incluye la adición de un patrón interno (PI), la adición de un reactivo de lisis (RL n.º 1), un flujo de trabajo de enriquecimiento, la adición de microesferas magnéticas selectivas de testosterona (MM C), uno del procedimiento de lavado predefinido (L n.º 2), uno del procedimiento de elución predefinido (elución n.º 1), inyección en un canal de CL más lento, el uso de IEN y EMIAC, y uno de los procedimientos de adquisición de espectrometría de masas predefinidos (EM MRM n.º 4).

Si los analitos de interés son, por ejemplo, benzodiazepinas, el flujo de trabajo específico de benzodiazepinas incluye la adición de un patrón interno (PI), la adición de un reactivo enzimático (E), un flujo de trabajo de enriquecimiento, la adición de microesferas magnéticas selectivas de benzodiazepinas (MM B), uno del procedimiento de lavado predefinido (L n.º 1), uno del procedimiento de elución predefinido (elución n.º 2), inyección en un canal de CL más rápido, el uso de IEN y EMIAC, y uno de los procedimientos de adquisición de espectrometría de masas predefinidos (EM MRM n.º 1).

Si el analito de interés es, por ejemplo, rapamicina, el flujo de trabajo específico de rapamicina incluye la adición de un patrón interno (PI), la adición de un reactivo de lisis (RL n.º 2), un flujo de trabajo de disminución, la adición de microesferas magnéticas selectivas de matriz (MM A), uno del procedimiento de lavado predefinido (L n.º 3), uno del procedimiento de elución predefinido (elución n.º 3), inyección en un canal de CL más rápido, el uso de IEN y EMIAC, y uno de los procedimientos de adquisición de espectrometría de masas predefinidos (EM MRM n.º 1).

Del mismo modo, se pueden predefinir rutas de flujos de trabajo para cualquier muestra/analito de interés o grupos de analitos de interés.

Las modificaciones y variaciones de los modos de realización divulgados son ciertamente posibles a la luz de la descripción anterior. Por lo tanto, se debe entender que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede poner en práctica de otro modo que la específicamente concebida en los ejemplos anteriores.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de diagnóstico clínico (100) que comprende
  - 5 - una estación de preparación de muestras (50) para la preparación automatizada de muestras (10) que comprende analitos de interés,
  - una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) (60) que comprende una pluralidad de canales de CL (C1-n, C'1-n) dispuestos en paralelo,
  - 10 - una interfaz de preparación de muestra/CL (70) para introducir muestras preparadas en cualquiera de los canales de CL (C1-n, C'1-n),
  - un controlador (80) programado para
    - 15 ○ asignar muestras (10) a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización, dependiendo de los analitos de interés,
    - 20 ○ asignar un canal de CL (C1-n, C'1-n) para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés,
    - 25 ○ planificar una secuencia de introducción en canales de CL (I1-n) para introducir las muestras preparadas que permita a los analitos de interés de diferentes canales de CL (C1-n, C'1-n) eluir en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento (E1-n) en base a los tiempos de elución previstos,
    - 30 ○ establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras (S1-n) que genera una secuencia de salida de muestras preparadas (P1-n) a partir de la estación de preparación de muestras (50) que coincide con la secuencia de introducción en canales de CL (I1-n), de modo que cuando se completa la preparación de una muestra, el canal de CL asignado (C1-n, C'1-n) también está disponible y la muestra preparada se puede introducir en el canal de CL asignado (C1-n, C'1-n), antes de que se complete la preparación de otra muestra o antes de que la siguiente muestra preparada llegue a la interfaz de preparación de muestras/CL (70),
    - 35 ○ establecer un período de referencia e
      - iniciar la preparación de como máximo una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras consecutivas en la secuencia de inicio de preparación de muestras (S1-n); y/o
      - 40 - completar la preparación de como máximo una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de salida de muestras preparadas (P1-n); y/o
      - 45 - introducir una muestra preparada por período de referencia en uno de los canales de CL (C1-n, C'1-n) con uno o más períodos de referencia posibles entre las introducciones en canales de CL consecutivas de la secuencia de introducción en canales de CL (I1-n); y/o
      - 50 - producir un eluido de CL por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre eluidos de CL consecutivos de la secuencia de salida de eluidos de CL (E1-n).
2. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estación de separación por CL (70) comprende al menos un canal de CL más rápido (C1-n) con un tiempo de ciclo más corto y al menos un canal de CL más lento (C'1-n) con un tiempo de ciclo más largo.
- 55 3. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el controlador (80) está programado para establecer que el período de referencia sea tan largo como el tiempo de ciclo más corto, y en el que el al menos un canal de CL más lento (C'1-n) tiene un margen del tiempo de elución para la elución de analitos de interés que es tan largo como o más corto que el período de referencia.
- 60 4. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el tiempo de ciclo más corto es menor que 60 segundos y el tiempo de ciclo más largo es mayor que 60 segundos.
- 65 5. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el tiempo de ciclo más largo es n veces el período de referencia, en el que n es un número entero igual a o mayor que 2.

- 5 6. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el al menos un canal de CL más rápido (C1-n) es un canal de análisis de inyección en flujo capilar o un canal de cromatografía de líquidos en línea de captura y elución rápida y el al menos un canal de CL más lento (C'1-n) es un canal de cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento.
- 10 7. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la estación de preparación de muestras (50) comprende una unidad de manipulación de microesferas magnéticas (51) para el tratamiento de muestras con microesferas magnéticas que portan grupos selectivos de analitos y/o matriz.
- 15 8. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además un espectrómetro de masas (90) y una interfaz de CL/EM (91) para conectar la estación de separación por CL (60) al espectrómetro de masas (90).
- 20 9. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la interfaz de CL/EM (91) comprende un módulo de movilidad de iones (95) entre una fuente de ionización (92) y el espectrómetro de masas (90).
- 25 10. El sistema de diagnóstico clínico (100) de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que todos los canales de CL (C1-n, C'1-n) se pueden conectar de forma alternativa a la interfaz de CL/EM (92) y el controlador (80) controla una conmutación de válvulas (61) de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL (E1-n).
- 30 11. Un procedimiento de diagnóstico clínico que comprende preparar automáticamente muestras (10) que comprenden analitos de interés por una estación de preparación de muestras (50) e introducir muestras preparadas por medio de una interfaz de preparación de muestras/CL (70) en una estación de separación por cromatografía de líquidos (CL) (60) que comprende una pluralidad de canales de CL (C1-n, C'1-n) dispuestos en paralelo, comprendiendo además el procedimiento
- 35 - asignar muestras (10) a flujos de trabajo de preparación de muestras predefinidos, comprendiendo cada uno de ellos una secuencia predefinida de etapas de preparación de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización, dependiendo de los analitos de interés,
- asignar un canal de CL (C1-n, C'1-n) para cada muestra preparada dependiendo de los analitos de interés,
- 40 - planificar una secuencia de introducción en canales de CL (I1-n) para las muestras preparadas que permita a los analitos de interés de diferentes canales de CL (C1-n, C'1-n) eluir en una secuencia de salida de eluidos de CL sin solapamiento (E1-n) en base a los tiempos de elución previstos,
- 45 - establecer e iniciar una secuencia de inicio de preparación de muestras (S1-n) que genera una secuencia de salida de muestras preparadas (P1-n) a partir de la estación de preparación de muestras (50) que coincide con la secuencia de introducción en canales de CL (I1-n), de modo que cuando se completa la preparación de una muestra, el canal de CL asignado (C1-n, C'1-n) también está disponible y la muestra preparada se puede introducir en el canal de CL asignado (C1-n, C'1-n), antes de que se complete la preparación de otra muestra o antes de que la siguiente muestra preparada llegue a la interfaz de preparación de muestras/CL (70),
- establecer un período de referencia e
- 50 - iniciar la preparación de como máximo una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras consecutivas en la secuencia de inicio de preparación de muestras (S1-n); y/o
- 55 - completar la preparación de como máximo una muestra por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de salida de muestras preparadas (P1-n); y/o
- 60 - introducir una muestra preparada por período de referencia en uno de los canales de CL (C1-n, C'1-n) con uno o más períodos de referencia posibles entre las introducciones en canales de CL consecutivas de la secuencia de introducción en canales de CL (I1-n); y/o
- 65 - producir un eluido de CL por período de referencia con uno o más períodos de referencia posibles entre eluidos de CL consecutivos de la secuencia de salida de eluidos de CL (E1-n).
12. El procedimiento de diagnóstico clínico de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende conectar de forma alternativa los canales de CL (C1-n, C'1-n) a una interfaz de CL/EM (91) que conecta la estación de

separación por CL (60) a un espectrómetro de masas (90) de acuerdo con la secuencia de salida de eluidos de CL (E1-n).

5 13. El procedimiento de diagnóstico clínico de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que la pluralidad de canales de CL (C1-n, C'1-n) comprende al menos un canal de CL más rápido (C1-n) con un tiempo de ciclo más corto y al menos un canal de CL más lento (C'1-n) con un tiempo de ciclo más largo.

10 14. El procedimiento de diagnóstico clínico de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende establecer que el período de referencia sea tan largo como el tiempo de ciclo más corto, y en el que el al menos un canal de CL más lento (C'1-n) tiene un margen del tiempo de elución para la elución de analitos de interés que es tan largo como o más corto que el período de referencia.

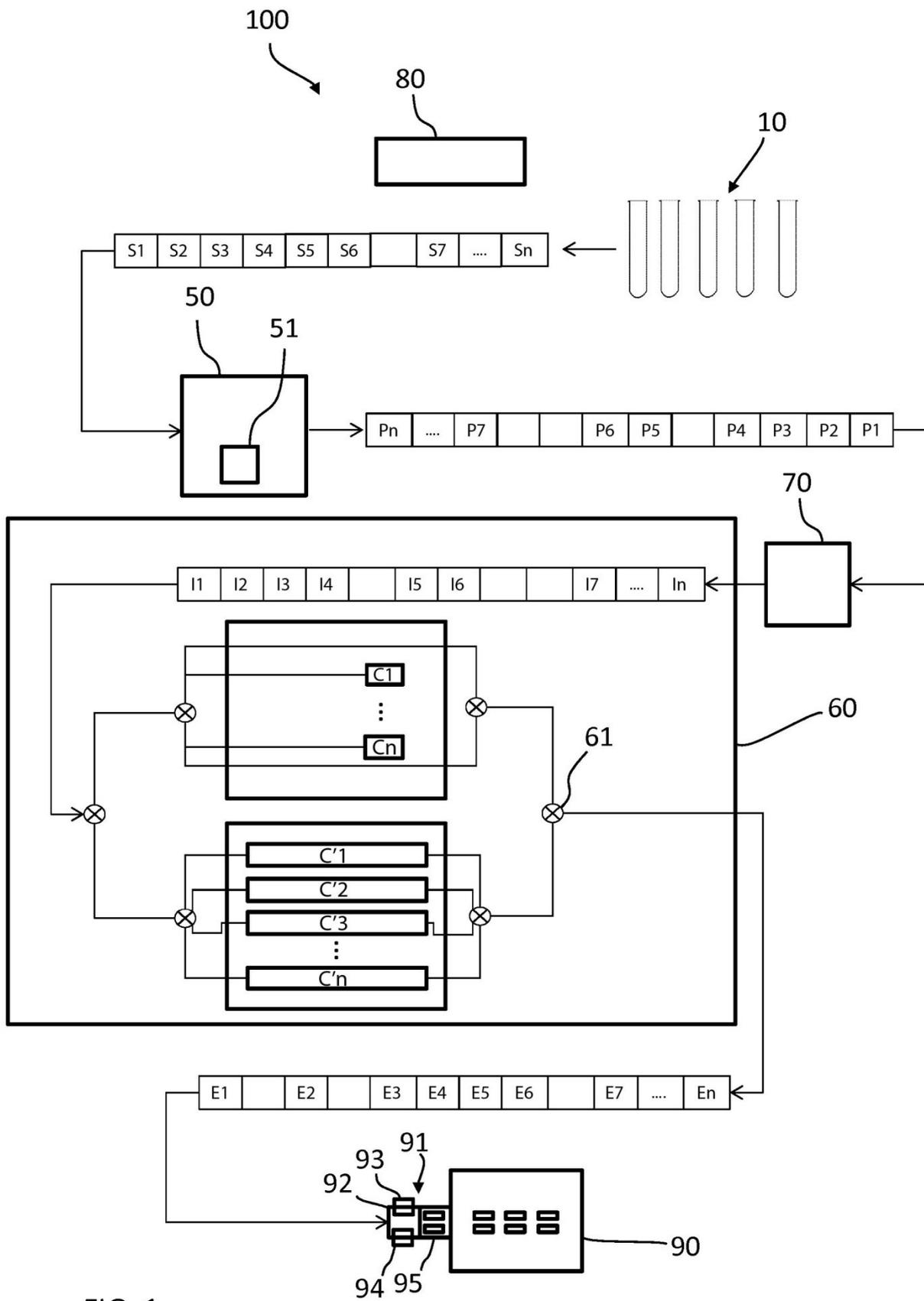


FIG. 1

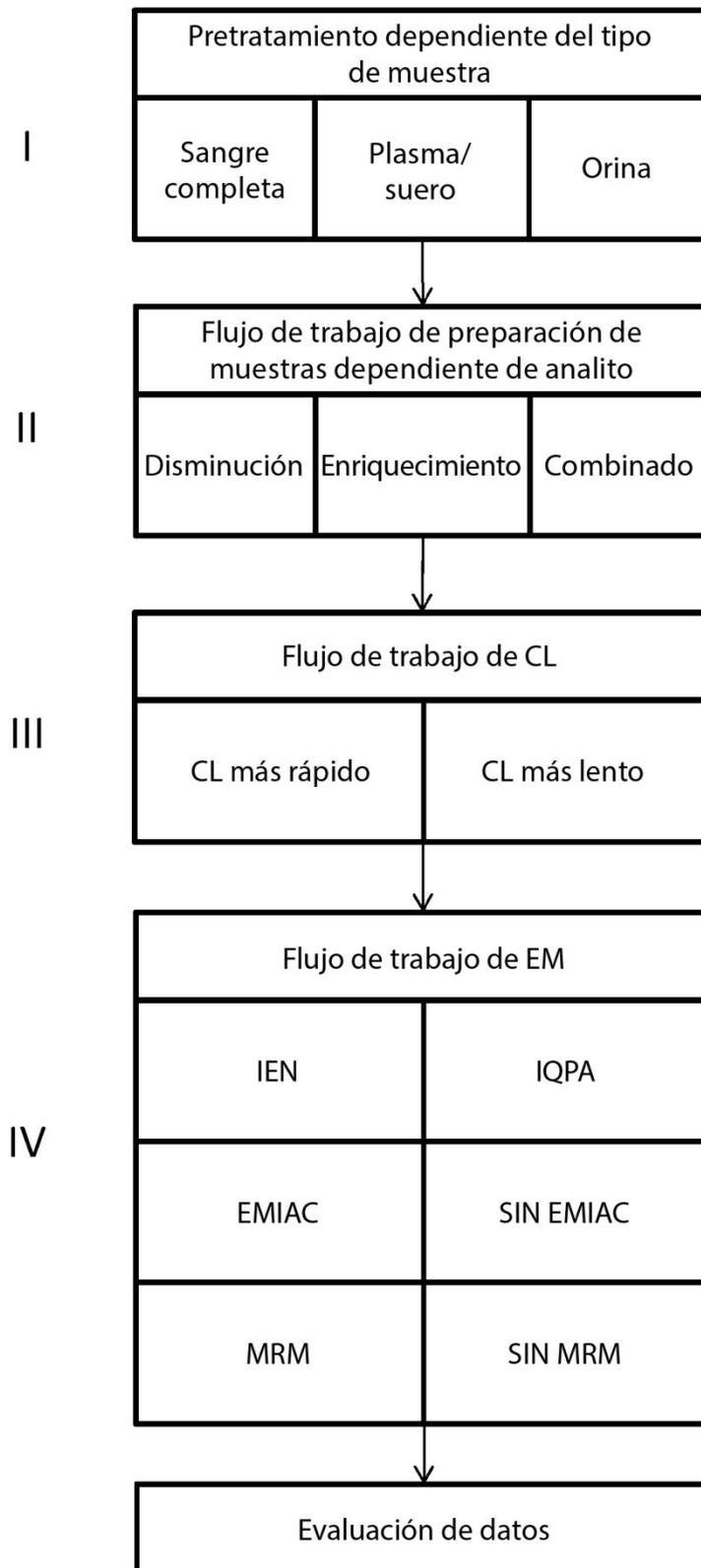


FIG. 2

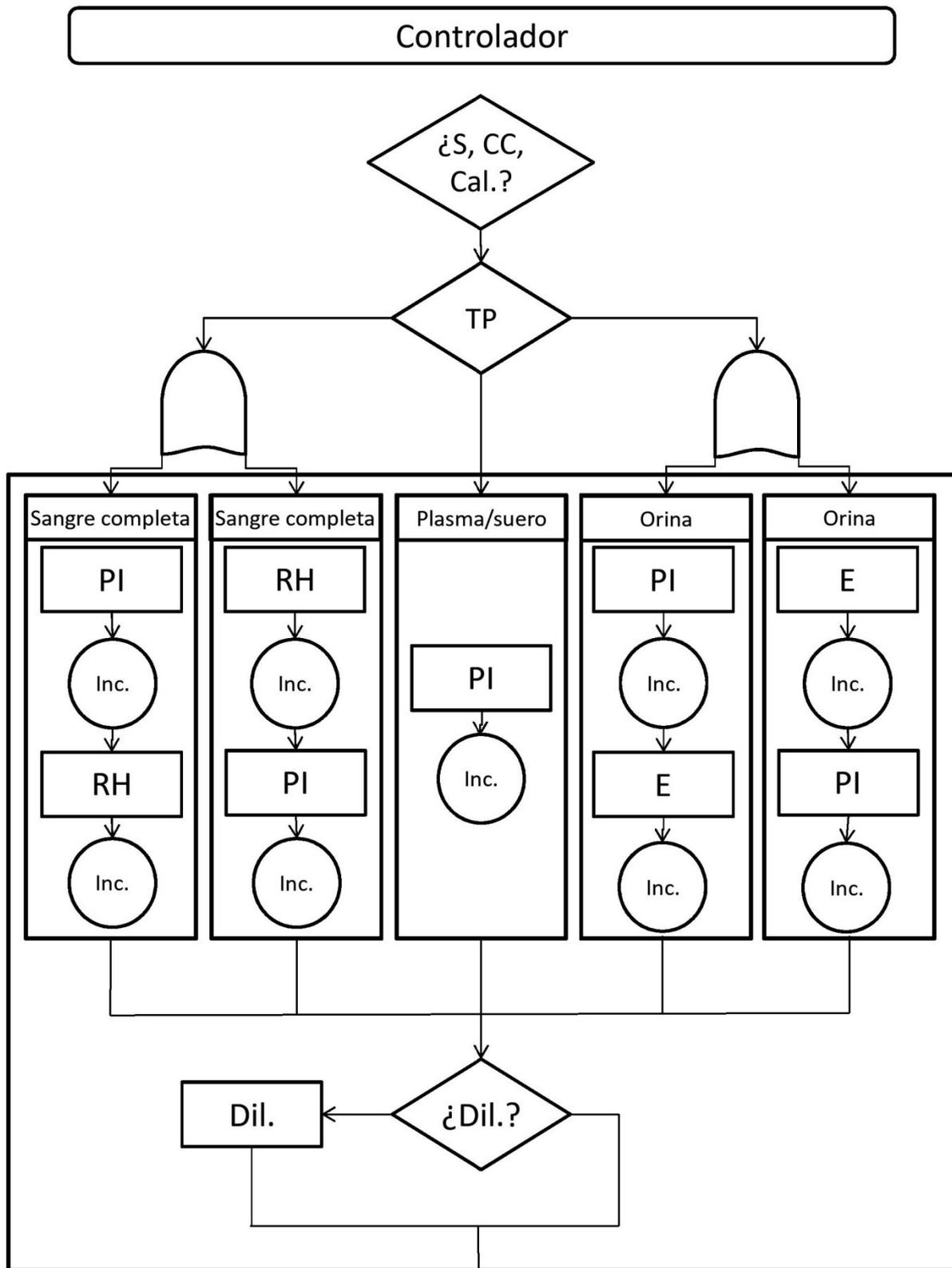


FIG. 3

a preparación de muestras

del pretratamiento de muestras

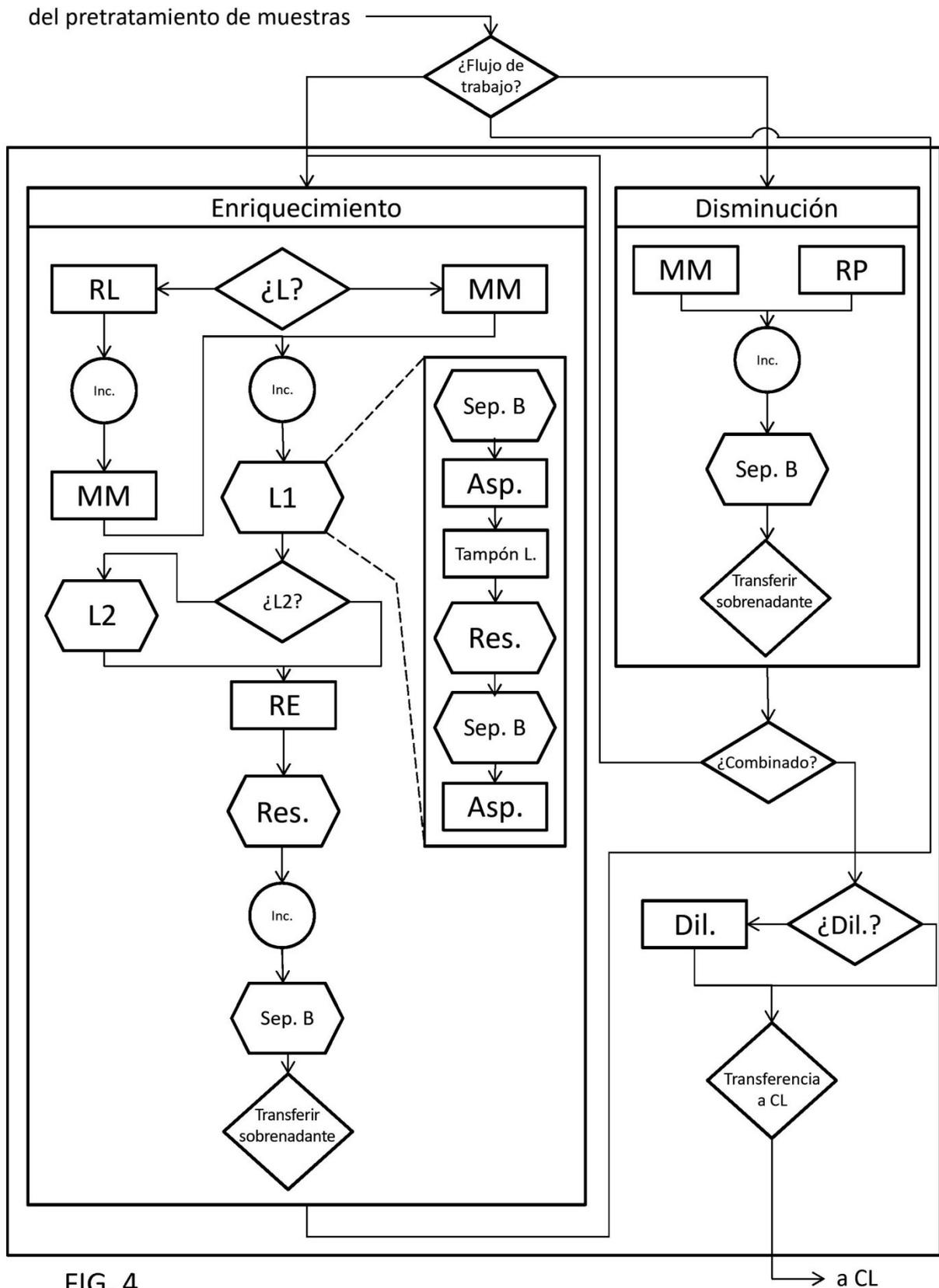


FIG. 4

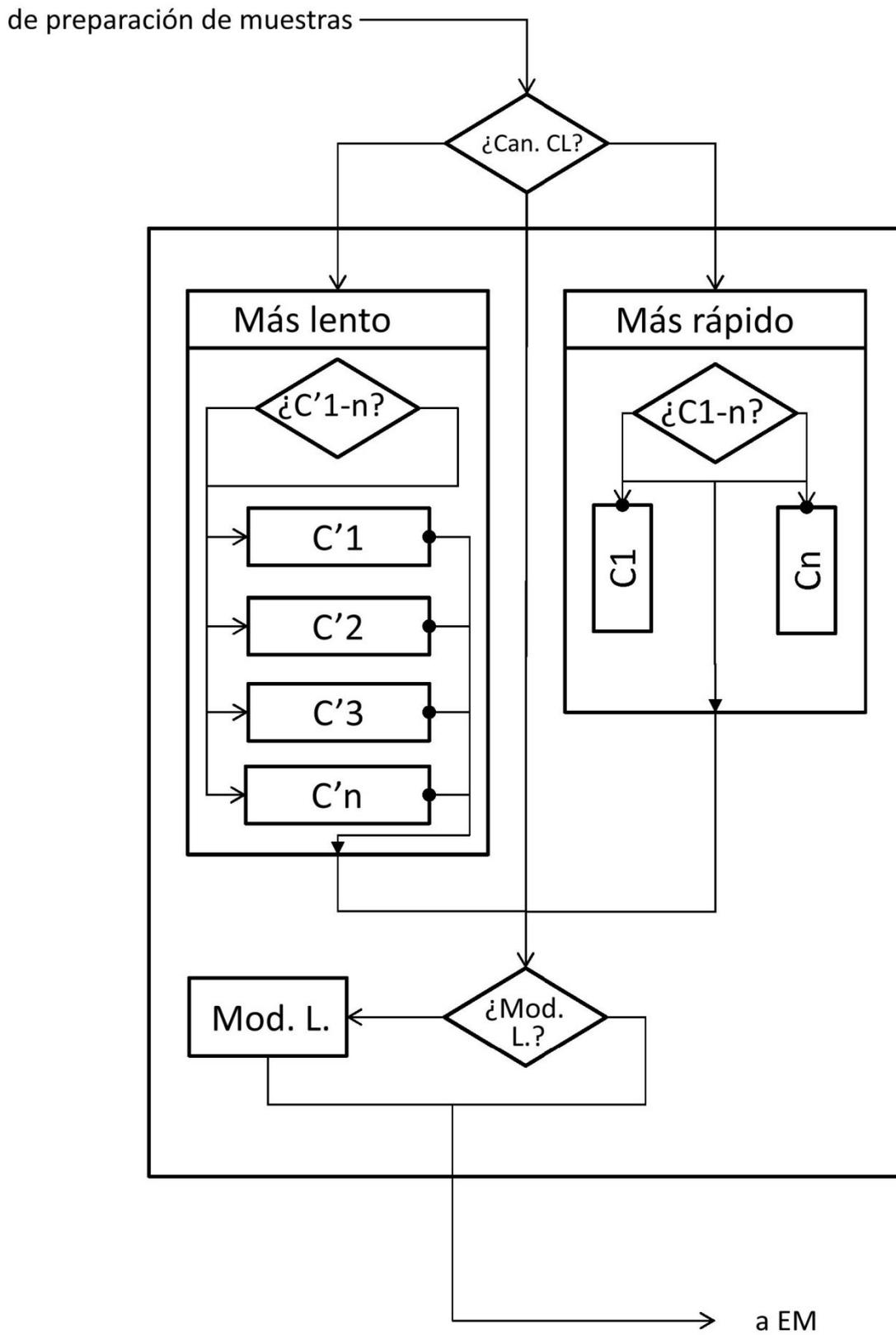


FIG. 5

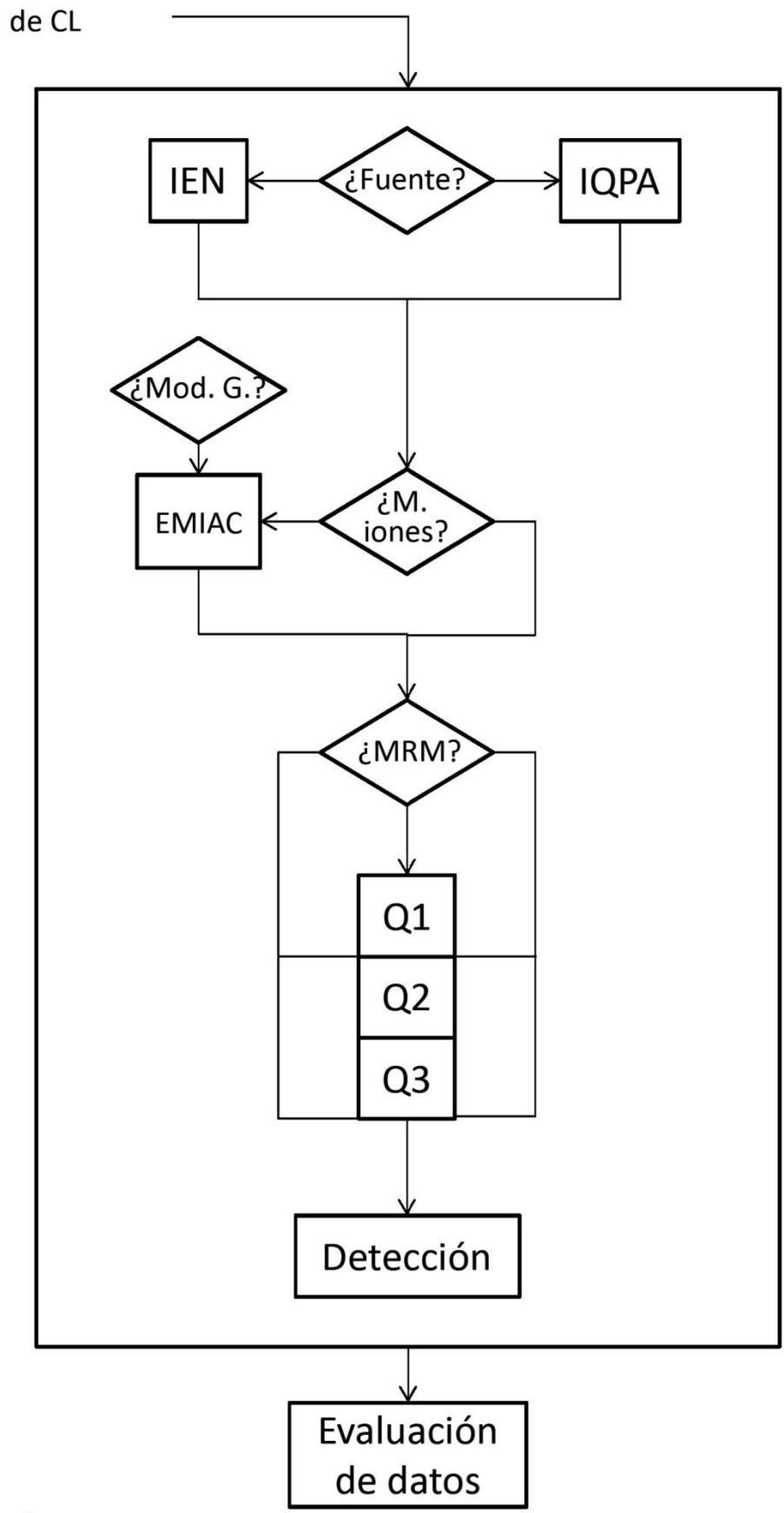
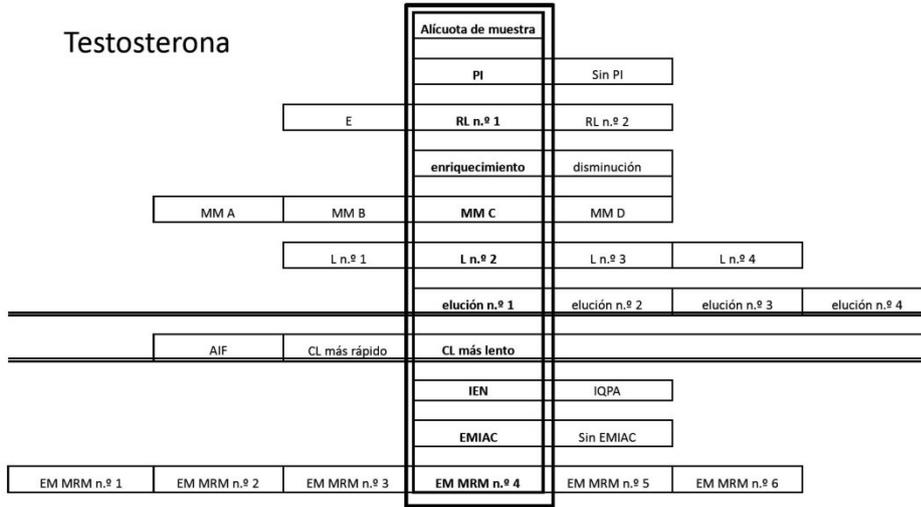
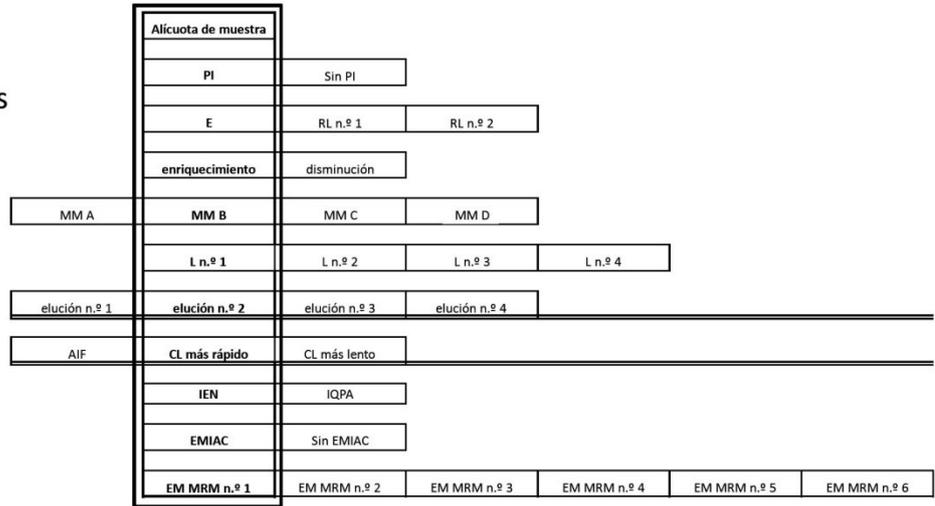


FIG. 6

Testosterona



Benzodiazepinas



Rapamicina

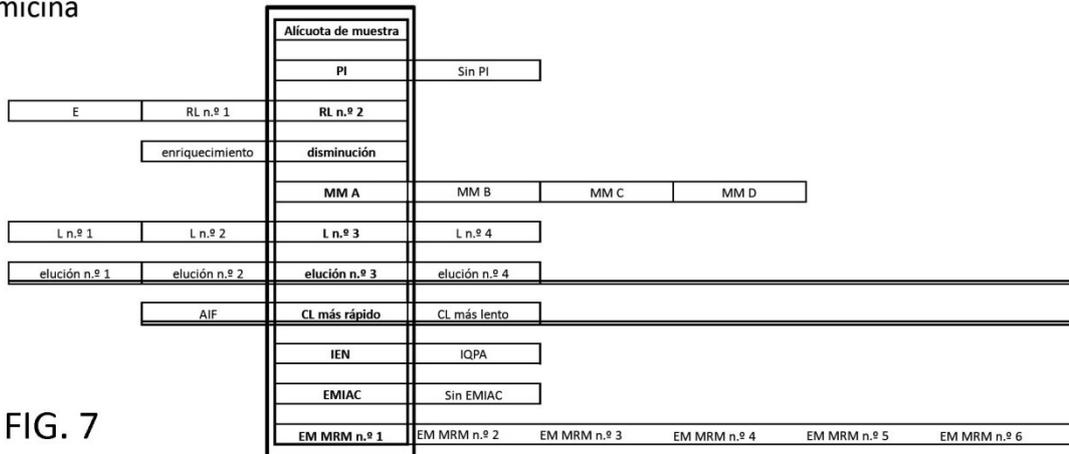


FIG. 7