(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 987 091**

(51) Int. CI.:

B01D 15/24 (2006.01)
G01N 30/84 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2020 PCT/US2020/018225**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2020 WO20168156**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2020 E 20714331 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3924083**

(54) Título: **Sistemas y métodos para preparar una muestra y realizar un ensayo en tiempo real de la muestra**

(30) Prioridad:

14.02.2019 US 201962805902 P
20.12.2019 US 201962951346 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2024

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

WU, CHAO-HSIANG;
XUE, GANG;
SARICH, BRANDON, ZACHARY;
BERKE, MICHAEL, R.;
SEBASTAIN, JACOB y
CHAN, PIK

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Sistemas y métodos para preparar una muestra y realizar un ensayo en tiempo real de la muestra

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción se refiere en general a ensayos y, más específicamente, a sistemas y métodos para preparar una muestra y realizar un ensayo en tiempo real de la muestra.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporcionó como un archivo titulado "53661_Seqlisting.txt" creado el 11 de febrero de 2020 y tiene un tamaño de 263.959 bytes.

ANTECEDENTES

Los ensayos se realizan habitualmente para cuantificar uno o más atributos de un analito, como un fármaco, una sustancia bioquímica o una célula. Un ejemplo de un ensayo de este tipo es el ensayo del método de atributos múltiples (MAM), que puede detectar y cuantificar los atributos de calidad críticos (CQA), identificados por el perfil de producto diana de calidad (QTPP), de una muestra (Desarrollo de una espectrometría de masas cuantitativa). Método de atributos múltiples para la caracterización, pruebas de control de calidad y disposición de productos biológicos. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. MAbs. 2015, 7(5): 881-90). El ensayo MAM es un proceso operado manualmente que se realiza, por ejemplo, en un laboratorio de pruebas de liberación de moléculas grandes (LMRT). MAM es un método de mapeo de péptidos basado en cromatografía líquida (LC) - espectrometría de masas (MS), que consiste en tres etapas: (1) preparación de muestras (que puede incluir, por ejemplo, desnaturalización, reducción, alquilación y digestión de polipéptidos); (2) separar los polipéptidos digeridos por LC y detectarlos por MS; y (3) análisis de los datos para CQA diana y detección de nueva señal *(es decir,* máximos) cuando se compara con un estándar de referencia.

Las CQA son propiedades químicas, físicas o biológicas que están presentes dentro de un valor o rango de valores específico. Por ejemplo, para las moléculas terapéuticas polipeptídicas grandes, los atributos físicos y las modificaciones de los aminoácidos (los componentes básicos de los polipéptidos) son CQA importantes que se monitorean durante y después de la fabricación, así como durante el desarrollo de fármacos. A diferencia de los ensayos analíticos convencionales que rastrean los cambios en el tamaño máximo y la forma máxima de polipéptidos completos o parciales, MAM detecta CQA específicas a nivel de aminoácidos. Los documentos WO 2019/028187 y WO 2019/028191 describen varios sistemas y métodos para analizar moléculas polipeptídicas: ambos documentos describen un método para mover automáticamente una muestra a un bucle de muestra y a una primera válvula multipuerto. Las moléculas de muestra se capturan en una columna de captura y se separan.

El análisis del perfil de glicanos de un polipéptido terapéutico suele ser una CQA. Esto es especialmente cierto en el caso de productos biosimilares, donde el perfil de glicosilación del producto biosimilar debe ser comparable al del producto innovador. Los procesos conocidos para realizar ensayos de glicanos requieren que se recolecte manualmente una muestra de un producto, se entregue a un laboratorio de pruebas y se concentre, purifique y prepare manualmente para el análisis. El tiempo de respuesta típico para estos procesos conocidos, operados manualmente, es de aproximadamente cinco días. Este paso del tiempo genera costes y retrasos en el desarrollo de medicamentos (innovadores y biosimilares) y su eventual lanzamiento. Por ejemplo, se acumulan retrasos de cinco días durante el desarrollo de fármacos, por ejemplo, cuando se optimizan las condiciones de cultivo para una glicosilación óptima, lo que impide la entrega de polipéptidos nuevos e importantes a los pacientes. Además, dichos retrasos dan lugar a perfiles determinados después de la fabricación, lo que da lugar a la refabricación de productos que no cumplen con las especificaciones en lugar de ajustar los parámetros de fabricación en tiempo real. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos eficientes y más rápidos para facilitar el análisis de CQA, incluida la preparación de muestras para dichos análisis.

SUMARIO

La invención se define en el en la reivindicación 1 independiente del método y en la reivindicación 7 independiente del sistema. Un aspecto de la presente descripción proporciona un método que incluye las etapas de (a) mover automáticamente una muestra que comprende moléculas de un primer vial a un bucle de muestra; (b) mover un volumen de la muestra del bucle de muestra a una primera válvula multipuerto; (c) mover el volumen de la muestra de la primera válvula multipuerto a una segunda válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto; (d) cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición, mover el volumen de la muestra de la segunda válvula multipuerto a una columna de captura; (e) capturar las moléculas de la muestra en la columna de captura, separando así las moléculas de la muestra de una matriz de la muestra; (f) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la columna de captura, eluyendo así las moléculas capturadas por la columna de captura y mover una mezcla de elución/molécula que comprende la solución tampón de elución y

las moléculas eluidas a un segundo vial dispuesto aguas abajo de la captura columna, comprendiendo el segundo vial un vial de flujo continuo; y (g) mover automáticamente las moléculas en el segundo vial a un dispositivo analítico para el análisis de las moléculas.

Cabe señalar que un "vial" o "primer vial" desde el cual se mueve inicialmente la muestra, como se usa en el presente documento, puede comprender o consistir en cualquier vial adecuado, tal como un vial de flujo continuo o un vial de flujo discontinuo. Además, se pueden usar viales de flujo discontinuo (así como viales de flujo continuo) en los métodos y sistemas descritos en el presente documento como recipientes temporales o de transición para muestras intermedias/parcialmente procesadas antes de que pasen a la siguiente etapa de procesamiento en el sistema.

Otro aspecto de la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un primer vial adaptado para contener una muestra que comprende moléculas, uno o más agentes de cambio, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un primer puerto de la primera válvula multipuerto, y una segunda válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto. El sistema cerrado incluye una columna de captura dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición. La columna de captura está configurada para capturar las moléculas del volumen de la muestra. El sistema cerrado incluye también una columna de desalación dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición diferente de la primera posición. La columna de desalación está configurada para reducir la concentración de sal de las moléculas. El sistema cerrado incluye además un primer serpentín de reacción dispuesto para acoplarse selectivamente fluidamente a la primera válvula multipuerto. El primer serpentín de reacción está dispuesto para recibir uno o más de los agentes de cambio y configurado para incubar las moléculas y uno o más de los agentes de cambio para cambiar las moléculas. El sistema cerrado incluye además un segundo vial dispuesto aguas abajo y acoplado fluidamente a la segunda válvula multipuerto. El segundo vial está dispuesto para recibir una mezcla que comprende las moléculas de la columna de captura, la columna de desalación o el primer serpentín de reacción. El segundo vial incluye una válvula de flujo. En algunos ejemplos, el vial de flujo continuo está configurado para separar las moléculas del resto de la mezcla, de modo que las moléculas puedan analizarse.

Además, la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un primer vial adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, uno o más agentes de cambio, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un primer puerto de la primera válvula multipuerto, una segunda válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto, y una columna de captura dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición. La columna de captura está configurada para capturar los polipéptidos del volumen de la muestra. El sistema cerrado incluye también una columna de desalación dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición diferente de la primera posición. La columna de desalación está configurada para reducir la concentración de sal de los polipéptidos. El sistema cerrado incluye además un primer serpentín de reacción dispuesto para acoplarse selectivamente fluidamente a la primera válvula multipuerto. El primer serpentín de reacción está dispuesto para recibir uno o más de los agentes de cambio y configurado para incuba los polipéptidos y uno o más de los agentes de cambio para cambiar los polipéptidos. El sistema cerrado incluye además un segundo vial dispuesto aguas abajo y acoplado fluidamente a la segunda válvula multipuerto. El segundo vial está dispuesto para recibir una mezcla que comprende los polipéptidos de la columna de captura, la columna de desalación o el primer serpentín de reacción. El segundo vial incluye una válvula de flujo continuo configurada para separar los polipéptidos del resto de la mezcla, de modo que los polipéptidos puedan analizarse.

Además, la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un primer vial adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener una volumen de la muestra a través de un primer puerto de la primera válvula multipuerto, una segunda válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto, y una columna de unión a polipéptidos dispuesta para acoplarse fluidamente a los segundos polipéptidos de la muestra. El sistema cerrado incluye también un segundo vial dispuesto aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, y una fuente de tampón acoplada fluidamente a la primera válvula multipuerto y dispuesta para suministrar solución tampón de elución al segundo vial a través de la segunda válvula multipuerto y la columna de unión a polipéptidos cuando la segunda válvula multipuerto está en la primera posición, de modo que la solución tampón de elución esté adaptada para eluir sustancialmente todos los polipéptidos de la columna de unión a polipéptidos. En algunos ejemplos, el segundo vial incluye una válvula de flujo configurada para filtrar la solución tampón de elución de la mezcla de elución/polipéptido fuera del segundo vial, dejando así solo los polipéptidos eluidos en el segundo vial.

Además, la presente descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un primer vial adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un primer puerto de la primera válvula multipuerto, una segunda válvula multipuerto acoplada

fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto, y una columna de unión a polipéptidos dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición. La columna de unión a polipéptidos está configurada para unir los polipéptidos de la muestra. El sistema cerrado incluye también un segundo vial dispuesto aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, comprendiendo el segundo vial un vial de flujo continuo y comprendiendo un reactivo marcador de glicanos, y una fuente de glicosidasa dispuesta para suministrar glicosidasas (tal como glucanasa) a la columna de unión a polipéptidos a través de la segunda válvula multipuerto, de modo que las glicosidasas se infunden con los polipéptidos unidos a la columna de unión a polipéptidos. El sistema cerrado incluye también una fuente de solución vehículo dispuesta para suministrar una solución vehículo a la columna de unión a polipéptidos a través de la segunda válvula multipuerto. La solución vehículo está adaptada para liberar y transportar los glicanos desde la columna de unión a polipéptidos hasta el segundo vial. El sistema cerrado incluye además un serpentín de reacción dispuesto para recibir una mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos del segundo vial a través de la primera válvula multipuerto. El serpentín de reacción está configurado para incubar la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos para marcar los glicanos. El sistema cerrado incluye además un tercer vial dispuesto aguas abajo del serpentín de reacción para recibir los glicanos marcados y el reactivo marcador de glicanos. En algunos ejemplos, el tercer vial comprende también una válvula de flujo continuo configurada para filtrar sustancialmente el reactivo marcador de glicanos fuera del tercer vial, dejando así sustancialmente solo los glicanos marcados en el tercer vial.

Además, la presente descripción proporciona un método que incluye las etapas de (a) mover una muestra que comprende moléculas de un vial de muestra a un bucle de muestra; (b) mover un volumen de la muestra desde el bucle de muestra a una válvula de inyección; (c) mover el volumen de la muestra de la válvula de inyección a una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección; (d) cuando la primera válvula multipuerto está en una segunda posición, mover el volumen de la muestra de la primera válvula multipuerto a una columna de captura en la segunda válvula multipuerto; (e) capturar las moléculas de la muestra en la columna de captura, separando así las moléculas de la muestra de una matriz de la muestra; (f) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la columna de captura, eluyendo así las moléculas capturadas por la columna de captura y mover una mezcla de elución/molécula que comprende la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un vial receptor en la tercera válvula multipuerto dispuesta aguas abajo de la columna de captura en la segunda válvula multipuerto, comprendiendo el vial receptor un vial de flujo continuo; y (g) mover las moléculas en el vial de flujo continuo a un dispositivo analítico (por ejemplo, un compartimento de columna) para el análisis de las moléculas.

Además, la presente descripción proporciona un método que incluye las etapas de: (a) mover una muestra que comprende polipéptidos de un vial de muestra a un bucle de muestra; (b) mover un volumen de la muestra desde el bucle de muestra a una válvula de inyección; (c) mover el volumen de la muestra de la válvula de inyección a una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección; (d) cuando la primera válvula multipuerto está en una segunda posición, mover el volumen de la muestra de la primera válvula multipuerto a una columna de unión a polipéptidos en la segunda válvula multipuerto; (e) capturar los polipéptidos de la muestra en la columna de unión a polipéptidos, separando así los polipéptidos de la muestra de una matriz de la muestra; (f) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la columna de captura, eluyendo así los polipéptidos capturados por la columna de captura y mover una mezcla de elución/molécula que comprende la solución tampón de elución y los polipéptidos eluidos a un vial receptor dispuesto aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, comprendiendo el vial receptor un vial de flujo continuo; y (g) mover los polipéptidos en el vial de flujo continuo a un dispositivo analítico (por ejemplo, un compartimento de columna) para el análisis de las moléculas.

Además, la presente descripción proporciona un método que incluye las etapas de: (a) mover una muestra que comprende polipéptidos de un vial de muestra a un bucle de muestra; (b) mover un volumen de la muestra del bucle de muestra a una válvula de inyección; (c) mover el volumen de la muestra de la válvula de inyección a una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección; (d) mover el volumen de la muestra de la primera válvula multipuerto a una columna de unión a polipéptidos en la segunda válvula multiposición; (e) unir los polipéptidos en el volumen de la muestra a la columna de unión a polipéptidos, separando así los polipéptidos en la muestra de una matriz de la muestra; (f) mover las glicosidasas (tales como glucanasa) a la columna de unión a polipéptidos a través de la segunda válvula multipuerto para liberar glicanos de los polipéptidos unidos; (g) mover los glicanos liberados fuera de la columna de unión a polipéptidos y a un vial receptor dispuesto aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, siendo el vial receptor un vial de flujo continuo; (h) mezclar los glicanos liberados con un reactivo marcador de glicanos en el vial de flujo continuo; (i) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos a un serpentín de reacción en la segunda válvula multipuerto a través de la primera válvula multipuerto; (j) incubar la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos en el serpentín de reacción, marcando así los glicanos; (k) mover la mezcla del serpentín de reacción al vial de flujo continuo; y (l) mover los glicanos marcados en el vial de flujo continuo a un dispositivo analítico para el análisis de los glicanos marcados.

Además, la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un vial de muestra adaptado para contener una muestra que comprende moléculas, uno o más agentes de cambio, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del vial de muestra, una válvula de inyección acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para

obtener un volumen de la muestra a través de un segundo puerto de la válvula de inyección, y una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección. El sistema cerrado incluye una columna de captura dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición. La columna de captura está configurada para capturar las moléculas del volumen de la muestra. El sistema cerrado incluye también una columna de desalación dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una tercera posición diferente de la segunda posición. La columna de desalación está configurada para reducir la concentración de sal de las moléculas. El sistema cerrado incluye además un serpentín de reacción dispuesto para acoplarse selectivamente fluidamente a la segunda válvula multipuerto. El serpentín de reacción está dispuesto para recibir uno o más de los agentes de cambio y configurado para incubar las moléculas y uno o más de los agentes de cambio para cambiar las moléculas. El vial receptor está dispuesto para recibir una mezcla que comprende las moléculas de la columna de captura, la columna de desalación o el serpentín de reacción. El vial receptor incluye una válvula de flujo continuo configurada para separar las moléculas del resto de la mezcla, de modo que las moléculas puedan analizarse.

Además, la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un vial de muestra adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, uno o más agentes de cambio, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una válvula de inyección acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un segundo puerto de la válvula de inyección, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente a y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección, y una columna de captura dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición. La columna de captura está configurada para capturar los polipéptidos del volumen de la muestra. El sistema cerrado incluye también una columna de desalación dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una tercera posición diferente de la segunda posición. La columna de desalación está configurada para reducir la concentración de sal de los polipéptidos. El sistema cerrado incluye además un serpentín de reacción dispuesto para acoplarse selectivamente fluidamente a la segunda válvula multipuerto. El serpentín de reacción está dispuesto para recibir uno o más de los agentes de cambio y configurado para incuba los polipéptidos y uno o más de los agentes de cambio para cambiar los polipéptidos. El sistema cerrado incluye además un vial receptor dispuesto aguas abajo y acoplado fluidamente a la tercera válvula multipuerto. El vial receptor está dispuesto para recibir una mezcla que comprende los polipéptidos de la columna de captura, la columna de desalación o el primer serpentín de reacción. El vial receptor incluye una válvula de flujo continuo configurada para separar los polipéptidos del resto de la mezcla, de modo que los polipéptidos puedan analizarse.

Además, la descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un vial de muestra adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del vial de muestra, una válvula de inyección acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un segundo puerto de la válvula de inyección, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección, y una columna de unión a polipéptidos dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición. La columna de unión a polipéptidos está configurada para unir los polipéptidos de la muestra. El sistema cerrado incluye también un vial receptor en la tercera válvula multipuerto dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos en la segunda válvula multipuerto. Una fuente de tampón acoplada fluidamente a la primera válvula multipuerto y dispuesta para suministrar solución tampón de elución a la segunda válvula multipuerto y a la columna de unión a polipéptidos cuando la segunda válvula multipuerto está en la segunda posición, de modo que la solución tampón de elución está adaptada para eluir sustancialmente todos los polipéptidos de la columna de unión a polipéptidos al vial receptor en la tercera válvula multiposición. El vial receptor incluye una válvula de flujo continuo configurada en combinación con la tercera válvula multipuerto, para desviar la solución tampón de elución de la mezcla de elución/polipéptidos fuera de la columna de unión a polipéptidos, dejando así solo los polipéptidos eluidos en el vial de flujo continuo.

Además, la presente descripción proporciona un sistema cerrado que incluye un vial de muestra adaptado para contener una muestra que comprende polipéptidos, un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial, una válvula de inyección acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un segundo puerto de la válvula de inyección, una primera válvula multipuerto acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la válvula de inyección, y una columna de unión a polipéptidos dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en la segunda posición. La columna de unión a polipéptidos está configurada para unir los polipéptidos de la muestra. El sistema cerrado incluye también un vial receptor en la tercera válvula multipuerto dispuesta aguas abajo de la columna de unión a polipéptidos, siendo el vial receptor un vial de flujo continuo que comprende un reactivo marcador de glicanos y una fuente de glicosidasa dispuesta para suministrar glicosidasas (tal como glucanasa) a la columna de unión a polipéptidos a través de la segunda válvula multipuerto, de modo que las glicosidasas se infunden con los polipéptidos unidos a la columna de unión a polipéptidos. El sistema cerrado incluye también una fuente de solución vehículo dispuesta para suministrar una solución vehículo a la columna de unión a polipéptidos a través de la segunda válvula multipuerto. La solución vehículo está adaptada para liberar y transportar los glicanos desde la columna de unión a polipéptidos hasta el vial receptor. El sistema cerrado incluye además un serpentín de reacción dispuesto para recibir una mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos del vial de flujo continuo a través de la primera válvula multipuerto. El serpentín de reacción está configurado para incubar la mezcla de los glicanos liberados y el

reactivo marcador de glicanos para marcar los glicanos. El sistema cerrado usa el mismo vial de flujo en la tercera válvula multipuerto dispuesta aguas abajo del serpentín de reacción en la segunda válvula multipuerto para desviar el reactivo marcador de glicanos pero para recibir los glicanos marcados en el vial de flujo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un sistema para realizar un ensayo en línea en tiempo real ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de un controlador del sistema ilustrado en la Figura 1.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 5 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 7 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 8 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 9 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 10 es un diagrama esquemático de otro ejemplo de un sistema para realizar un ensayo en línea en tiempo real ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción.

La Figura 11 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 10.

La Figura 12 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 10.

La Figura 13 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 10.

La Figura 14 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 10.

La Figura 15 es un diagrama esquemático que ilustra otro ejemplo de un método para realizar un ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema de la Figura 10.

La Figura 16 es una vista en perspectiva de un ejemplo de un vial de flujo continuo que se construye según las enseñanzas de la presente descripción y se puede usar en el sistema de la Figura 1 o en el sistema de la Figura 10.

La Figura 17 es una vista parcial en sección transversal del vial de flujo continuo de la Figura 16.

La Figura 18 es una vista en perspectiva de un ejemplo de un portaviales que se construye según las enseñanzas de la presente descripción y se puede usar en el sistema de la Figura 1 o en el sistema de la Figura 10 para contener una pluralidad de viales de flujo continuo de la Figura 16.

La Figura 19 ilustra el portaviales acoplado a un sistema de muestreo automatizado del sistema de la Figura 1 o en el sistema de la Figura 10 y recibir uno de los viales de flujo continuo de la Figura 16.

La Figura 20 es una tabla que representa los resultados de un estudio que valida la eficacia del sistema de la Figura 1 usando tres ensayos diferentes y nueve moléculas diferentes.

La Figura 21 es un gráfico que representa los resultados de uno de los tres ensayos diferentes realizados con una de las nueve moléculas diferentes usando el sistema de la Figura 1.

La Figura 22 es similar a la Figura 21, pero muestra los resultados usando una técnica convencional.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La Figura 1 ilustra un diagrama esquemático de un ejemplo de un sistema 100 ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción. El sistema 100, que puede estar ubicado en o dentro de un laboratorio (por ejemplo, un laboratorio de pruebas) o en una instalación de fabricación (por ejemplo, en la planta de fabricación), es un sistema cerrado para preparar automática o sustancialmente automáticamente una muestra de un producto que contiene moléculas para el análisis y realizar automáticamente un ensayo de esa muestra, como se describe con mayor detalle a continuación. Al automatizar (o sustancialmente automatizar) este proceso usando el sistema 100, el ensayo se puede realizar en tiempo real (o sustancialmente en tiempo real) y en la planta de fabricación (cuando se usa en la instalación de fabricación), de modo que todo el proceso se puede realizar y obtener el resultado deseado en cuestión de horas (*por ejemplo*, 2 a 3 horas), una mejora significativa con respecto a los 5 días que normalmente requieren los procesos operados manualmente, conocidos convencionalmente. Además, la naturaleza cerrada del proceso que utiliza el sistema 100 mantiene condiciones estériles. Además, el sistema 100 es un sistema flexible que puede usarse para preparar cualquier número de muestras (iguales o diferentes) para diferentes análisis y puede realizar automáticamente varios ensayos diferentes en estas muestras, obviando así la necesidad de múltiples sistemas diferentes para preparar diferentes muestras para diferentes análisis. Al realizar múltiples ensayos dentro del mismo sistema 100, puede requerirse menos volumen de muestra que si los mismos ensayos se realizaran en múltiples sistemas (lo que normalmente daría como resultado la pérdida de parte de la muestra como volumen muerto). Por tanto, se contempla que los sistemas 100 descritos en el presente documento puedan conservar muestras minimizando o evitando el volumen muerto. Además, los sistemas 100 como se describen en el presente documento pueden ser capaces de realizar múltiples ensayos manteniendo una huella más pequeña que los sistemas individuales configurados para realizar cada ensayo individualmente. Por ejemplo, un sistema como se describe en el presente documento equipado con una columna de captura (tal como una columna de proteína A) en la válvula 112 puede lograr la funcionalidad de una purificación a mayor escala pero ocupa un espacio más pequeño.

El sistema 100 ilustrado en la Figura 1 incluye por lo general uno o más viales de muestra, una aguja, un bucle de muestra, un dispositivo dosificador, un puerto de asiento de aguja, una primera columna, una segunda columna, una o más fuentes de tampón, una o más fuentes de reactivos de cambio, una o más fuentes de solución(es) vehículo(s), un primer serpentín de reacción (Serpentín A en la Figura 1), un segundo serpentín de reacción (Serpentín B en la Figura 1), y uno o más viales receptores, así como cuatro válvulas multipuerto 104, 108, 112, 116 y un conducto (por ejemplo, un conducto de acero inoxidable) que se extiende entre cada uno de los componentes del sistema 100 para facilitar la comunicación fluida. entre componentes del sistema 100 cuando se desee. El sistema 100 ilustrado en la Figura 1 incluye también un dispositivo analítico, una primera bomba 120 y una segunda bomba 124. No obstante, se apreciará que el sistema 100 no necesita incluir uno o más de los componentes enumerados anteriormente y/o puede incluir componentes adicionales. Opcionalmente, el segundo serpentín de reacción (por ejemplo, el serpentín B en la Figura 1) puede omitirse del sistema 100.

Cada uno de los uno o más viales de muestra está adaptado para contener una muestra que incluye moléculas de interés. La muestra se obtiene preferiblemente (*por ejemplo*, suministra) automáticamente mediante un sistema de muestreo automático (*por ejemplo*, el muestreador automático empleado en el producto Agilent 1290 Infinity II), aunque la muestra se puede obtener manualmente. En algunos ejemplos, las moléculas son polipéptidos, tales como, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos (que se analizan con más detalle a continuación) y polinucleótidos. En otros ejemplos, las moléculas son moléculas pequeñas *(es decir,* tienen un peso molecular de aproximadamente 900 Daltons (unidades de masa atómica unificada, u) o menos y puede difundirse a través de las membranas celulares en un período de tiempo razonable). Las moléculas pequeñas pueden, por ejemplo, comprender, consistir esencialmente en, o consistir en metabolitos. Cada uno de uno o más viales de muestra está alojado preferiblemente en el propio sistema de muestreo automático y por lo general toma la forma de un vial de flujo continuo, cuyos detalles se describen con mayor detalle en el presente documento, aunque los viales de muestra pueden ser otros viales *(por ejemplo,* viales de flujo discontinuo) también. En cualquier caso, cuando se desee, la aguja se puede mover para recuperar automáticamente una muestra de uno de los viales de muestra y depositar la muestra en el bucle de muestra. El bucle de muestra sirve como depósito temporal o zona de amortiguamiento para la muestra depositada y, al mismo tiempo, evita que la muestra entre en el dispositivo dosificador. El dispositivo dosificador, que en este ejemplo toma la forma de un cabezal analítico, está dispuesto para controlar el volumen de la muestra obtenida por la aguja y depositada en el bucle de muestra. Finalmente, la muestra se empuja desde el bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja.

La válvula multipuerto 104 en este ejemplo toma la forma de una válvula de inyección de 6 puertos. Cuando se desee, la válvula multipuerto 104 se puede mover para establecer comunicación fluida con el puerto de asiento de aguja. A su vez, la muestra fluirá desde el puerto de asiento de aguja a través de la válvula multipuerto 104 y hacia otro componente aguas abajo del sistema 100 (el componente específico dependerá del ensayo que se esté realizando). En algunos casos, la muestra fluirá desde el puerto de asiento de aguja a través de la válvula multipuerto 104 y hacia

el dispositivo analítico. En algunos casos, la muestra fluirá desde el puerto de asiento de aguja a través de la válvula multipuerto 104 y hacia la válvula multipuerto 108.

La válvula multipuerto 108 en este ejemplo toma la forma de una válvula de inyección de 6 puertos. La válvula multipuerto 108 está en comunicación fluida selectiva con la válvula multipuerto 104, de modo que la muestra (y/o el(los) tampón(es) de la(s) fuente(s) de tampón o el(los) reactivo(s) de cambio de la fuente(s) de reactivo de cambio) puede fluir desde el puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104.

La válvula multipuerto 112 en este ejemplo es una válvula de 10 puertos y 4 posiciones, cuya posición determina si la válvula multipuerto 108 está acoplada fluidamente a la primera columna o a la segunda columna (ambas están aguas abajo de la válvula multipuerto 108). Cuando la válvula multipuerto 112 está en una primera posición, la primera columna está acoplada fluidamente a la válvula multipuerto 108 (y a su vez a la válvula multipuerto 104) y la segunda columna está aislada fluidamente de la válvula multipuerto 108, de modo que la primera columna pueda recibir la muestra, el(los) tampón(es), el(los) reactivo(s) de cambio, la(s) solución(es) vehículo(s) o combinaciones de los mismos. A la inversa, cuando la válvula multipuerto 112 está en una segunda posición diferente de la primera posición, la segunda columna está acoplada fluidamente a la válvula multipuerto 108 (y a su vez a la válvula multipuerto 104) y la primera columna está acoplada fluidamente. aislado de la válvula multipuerto 108, de modo que la segunda columna pueda recibir la muestra, el (los) tampón(es), el (los) reactivo(s) de cambio y/o la(s) solución(es) vehículo(s). Se contempla que la válvula multipuerto 112 de los sistemas y métodos descritos en el presente documento pueda configurarse para realizar un ensayo analítico, tal como un ensayo basado en columna. En los sistemas y métodos descritos en el presente documento, la primera columna puede comprender o consistir en una columna analítica. Por ejemplo, la columna analítica puede ser una columna de un dispositivo de cromatografía como se describe en el presente documento, o una columna de incubación. La columna de incubación puede configurarse para la digestión de proteínas según una MAM como se describe en el presente documento.

La primera columna en este ejemplo es una columna de captura configurada para capturar las moléculas de interés de la muestra, separando así sustancialmente las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra (que a su vez puede desecharse). En algunos casos, la columna de captura también puede servir para preconcentrar las moléculas. *(por ejemplo,* agrupándolas en la columna de captura), aunque esta etapa no es necesaria. En los casos en los que las moléculas son polipéptidos, la columna de captura toma la forma de una columna de unión a polipéptidos seleccionada de un grupo que consiste en una columna de proteína A, una columna de proteína G, una columna de proteína A/G, una columna de proteína L, una columna de aminoácidos, una columna de avidina, una columna de estreptavidina, una columna de enlaces de carbohidratos, una columna de carbohidratos, una columna de glutatión, una columna de heparina, una columna de interacción hidrófoba, una columna de inmunoafinidad, una columna de nucleótidos/coenzima, una columna de especialidad y una Columna de cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC). Por ejemplo, en el caso de polipéptidos que son IgG humanas de las subclases 1, 2 o 4, IgM, IgA o IgE (y que comprenden una porción Fc humana y/o una región Fab de la familia VH3 humana), las columnas de proteína A son útiles. La proteína G se puede utilizar para purificar IgG humanas de las subclases 1-4. La proteína de fusión recombinante A/G se puede usar también para purificar todas estas clases de anticuerpos humanos, ya que la proteína de fusión proporciona sitios de unión a la proteína A y a la proteína G. Por tanto, las proteínas de fusión de proteína A/G pueden usarse para purificar IgG, IgA, IgE e IgM humanas. Además, la proteína L se puede usar para purificar IgG, IgM, IgA, IgE e IgD humanas, siempre que los anticuerpos diana tengan una cadena ligera de subtipo kappa (κ) apropiada (*es decir.*, subtipos VκI, YκIII y VκIV); la proteína L se puede usar también para purificar fragmentos Fab y scFv que también tienen el subtipo de cadena κ apropiado, ya que la proteína L se une a la cadena variable (V) de anticuerpos. Sin embargo, en los casos en los que las moléculas son moléculas pequeñas, la columna de captura puede tomar la forma de una columna de fase inversa, una columna de exclusión por tamaño, una columna de intercambio iónico, una columna de fase normal, una columna de separación quiral, una columna de modo mixto, o una columna de interacción hidrófoba. Por ejemplo, en los casos en los que las moléculas son moléculas pequeñas como metabolitos, la columna de captura puede tomar la forma de una columna de cromatografía trimodal (o trifásica) que incluye fase inversa, catiónica (intercambio catiónico) y aniónica (intercambio aniónico). Los analitos pueden eluir mediante gradientes de pH, fuerza iónica y/o fuerza orgánica. El tampón de elución para el análisis de moléculas pequeñas (tales como metabolitos) puede comprender un tampón volátil acuoso bajo en sal. En algunos ejemplos, el tampón volátil bajo en sal comprende además un disolvente orgánico. Los niveles de solvente orgánico pueden ser más bajos que los niveles de solvente orgánico usados en HILIC. A modo de ejemplo, un disolvente de partida típico para HILIC típico puede tener una concentración orgánica de ≥ 50 % (v/v).

Mientras tanto, la segunda columna en este ejemplo es una columna de desalación equilibrada con un tampón (por ejemplo, un tampón de proteólisis), de modo que la segunda columna está configurada para reducir la concentración de sal de las moléculas. Por tanto, cuando, por ejemplo, las moléculas son polipéptidos, la columna de desalación está configurada para reducir la concentración de sal de los polipéptidos (es decir, desalar los polipéptidos). La segunda columna toma preferiblemente la forma de una columna de cromatografía de exclusión molecular, aunque en su lugar se pueden usar otras columnas de cromatografía.

La aguja también es móvil para obtener solución(es) tampón de una o más fuentes de tampón y depositar la(s) solución(es) tampón en el bucle de muestra. A su vez, la(s) solución(es) tampón pueden fluir hacia la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104 de una manera similar a la descrita anteriormente (en relación

con el flujo de la muestra). La(s) solución(es) tampón pueden dirigirse posteriormente al componente apropiado en el sistema 100. En un ejemplo, la solución tampón puede ser una solución tampón de elución (por ejemplo, un tampón volátil (por ejemplo, un tampón volátil bajo en sal, tal como agua + ácido fórmico; agua y acetato de acetonitrilo + amonio; o agua y bicarbonato de acetonitrilo + amonio)), en el caso de anticuerpos unidos a proteína A, un tampón ácido, o en el caso de anticuerpos unidos a proteína G, un tampón muy ácido (pH 3 o menos) que finalmente se suministra a la primera columna cuando la válvula multipuerto 112 está en la primera posición. A medida que la solución tampón de elución fluye hacia y a través de la primera columna, la solución tampón de elución eluye sustancialmente todas las moléculas (por ejemplo, los polipéptidos) capturadas en la primera columna.

La aguja también es móvil para obtener reactivo(s) de cambio de una o más fuentes de reactivos de cambio y depositar los reactivo(s) de cambio en el bucle de muestra. A su vez, los reactivo(s) de cambio pueden fluir hacia la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104 de una manera similar a la descrita anteriormente (en relación con el flujo de la muestra). Los reactivo(s) de cambio pueden dirigirse posteriormente al componente apropiado en el sistema 100 para cambiar las moléculas de la manera deseada.

En términos generales, los reactivo(s) de cambio se seleccionan del grupo que consiste en un reactivo desnaturalizante, un reactivo reductor, un reactivo alquilante, una solución que contiene *(por ejemplo,* que consiste en) glicosidasas (tales como glucanasa), un reactivo marcador de glicanos, un reactivo de extinción, una enzima y combinaciones de los mismos.

Se puede utilizar un reactivo desnaturalizante para desnaturalizar las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos) en la muestra. En ejemplos en los que los reactivo(s) de cambio es o incluye un reactivo desnaturalizante, el reactivo desnaturalizante puede ser o incluir un detergente desnaturalizante o un caotropo. En aquellos ejemplos en los que el reactivo desnaturalizante es o incluye un detergente desnaturalizante, el detergente desnaturalizante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en dodecilsulfato de sodio (SDS), colato de sodio, desoxicolato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, N- lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y bromuro de trimetil(tetradecil)amonio (TTAB). Más preferiblemente, el detergente desnaturalizante es SDS. En aquellas versiones en las que el reactivo desnaturalizante es o incluye un caotropo, el caotropo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en urea, n-butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio, fenol, 2-propanol, y tiourea. Alternativa o adicionalmente, el reactivo desnaturalizante puede ser o incluir un fluido calentado que tiene una temperatura adecuada para alcanzar, si no mantener, una temperatura predeterminada. *(por ejemplo,* aproximadamente 22 °C a aproximadamente 120 °C).

Se puede utilizar un reactivo reductor para romper los enlaces cruzados de enlaces disulfuro, reduciendo así las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos). El reactivo reductor se puede seleccionar del grupo que consiste en ditiotreitol (DTT), glutatión, β-mercaptoetanol (β-ME) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Aunque no se ilustra en el presente documento, el reactivo reductor puede suministrarse mediante un recipiente de enfriamiento *(por ejemplo,* un enfriador que tiene una temperatura de 4 °C). Mientras tanto, cuando se utiliza, un agente alquilante alquila sulfhidrilos, alquilando así las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos). El agente alquilante es preferiblemente un reactivo alquilante tal como ácido indol-3-acético (IAA), aunque se pueden usar otros agentes alquilantes.

Se puede utilizar una solución que contenga glicosidasas para dirigir las glicosidasas a las moléculas e infundirlas con las mismas *(por ejemplo,* los polipéptidos) capturados por la primera columna, que a su vez libera glicanos en las moléculas capturadas *(por ejemplo,* los polipéptidos) de las moléculas capturadas *(por ejemplo,* los polipéptidos) en la solución. Las glicosidasas en la solución se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en glucanasas, endoglicosidasas, glicosamidasas y O-glicanasas, y combinaciones de las mismas (por ejemplo, endoglicosidasas, glicosamidasas y O-glicanasas, y combinaciones de las mismas). Cuando las glicosidasas son o incluyen endoglicosidasas, las endoglicosidasas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en endoglicosidasa D, endoglicosidasa F (endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2 y endoglicosidasa F3 y combinaciones de las mismas), endoglicosidasa H, endoglicosidasa S, endoglicosidasa M y endoglicosidasa B. Cuando las glicosidasas son o incluyen glicosamidasas, las glicosamidasas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en glicopeptidasas, péptidos N-glicosidasas, PNGasas, N-glicohidrolasas y N-glicanasas. Cuando las glicosidasas son o incluyen PNGasas, las PNGasas incluyen preferiblemente péptido:N-glicosidasa F (PNGF). Cuando las glicosidasas son o incluyen O-glicanasas, las O-glicanasas son preferiblemente endo-GalNAc-asa D o endoGalNAc-asa A.

Cuando los glicanos se liberan en la solución de esta manera, la aguja se puede mover aún más para obtener una solución vehículo *(por ejemplo,* agua desionizada (DI)) de una o más fuentes de soluciones vehículos y depositar la solución vehículo en el bucle de muestra. A su vez, la solución vehículo pueden fluir hacia la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104 de una manera similar a la descrita anteriormente (en relación con el flujo de la muestra). La solución vehículo puede, por ejemplo, suministrarse posteriormente a la primera columna y a través de ella para transportar los glicanos liberados desde la primera columna.

A su vez, se puede utilizar un reactivo marcador de glicanos para marcar *(por ejemplo,* marca fluorescente) glicanos que han sido liberados de las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos) y que se llevan lejos de la primera columna. El reactivo marcador de glicanos toma preferiblemente la forma de, por ejemplo, un fluoróforo *(por ejemplo,* seleccionado

del grupo que consiste en ácido 2-aminobenzoico, sal disódica del ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico, sal trisódica del ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico y antranilamida, 4-metoxibenzamidina) o un cromóforo *(por ejemplo,* 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona o fenilhidrazina).

Se puede utilizar una enzima para digerir las moléculas (por ejemplo, los polipéptidos). La enzima toma preferiblemente la forma de una proteasa, celulasa, lipasa, amilasa, glucoamilasa, glucosa isomerasa, xilanasa, fitasa, arabinanasa, poligalacturonanasa, hidrolasa, quimosina, ureasa, pectinasa o beta-glucanasa. Mientras tanto, se puede utilizar un reactivo de extinción para detener una reacción (por ejemplo, una reacción enzimática) alterando la condición de pH de la muestra. El reactivo de extinción toma preferiblemente la forma de ácido trifluoroacético (TFA), aunque en su lugar se pueden utilizar otros reactivos de extinción.

La válvula multipuerto 116 en este ejemplo es una válvula de 10 puertos y 4 posiciones, cuya posición determina si la válvula multipuerto 108 está acoplada fluidamente al primer serpentín de reacción o al segundo serpentín de reacción (ambos están aguas abajo de la válvula multipuerto 108). Cuando la válvula multipuerto 116 está en una primera posición, el primer serpentín de reacción está acoplado fluidamente a la válvula multipuerto 108 (y a su vez a la válvula multipuerto 104) y el segundo serpentín de reacción está aislado fluidamente de la válvula multipuerto 108, de modo que el primer serpentín de reacción pueda recibir la muestra o porciones de la misma (por ejemplo, glicanos liberados de los polipéptidos en la muestra), el(los) tampón(es), el(los) reactivo(s) de cambio, la(s) solución(es) vehículo(s), o combinaciones de los mismos. Por el contrario, cuando la válvula multipuerto 116 está en una segunda posición diferente de la primera posición, el segundo serpentín de reacción está acoplado fluidamente a la válvula multipuerto 108 (y a su vez a la válvula multipuerto 104) y el primer serpentín de reacción está aislado fluidamente de la válvula multipuerto 108, de modo que el segundo serpentín de reacción pueda recibir la muestra o porciones de la misma, el(los) tampón(es) y/o el(los) reactivo(s) de cambio.

Cada uno del primer y segundo serpentines de reacción está configurado para incubar las moléculas (por ejemplo, los polipéptidos) y uno o más de los agentes de cambio para cambiar las moléculas (por ejemplo, los polipéptidos). El primer o segundo serpentines de reacción puede, por ejemplo, recibir un reactivo de extinción y los polipéptidos e incubar el reactivo de extinción y los polipéptidos para facilitar la extinción de los polipéptidos. El primer o segundo serpentines de reacción puede, como otro ejemplo, recibir un reactivo desnaturalizante y los polipéptidos e incubar el reactivo desnaturalizante y los polipéptidos para facilitar la desnaturalización de los polipéptidos. El primer o segundo serpentines de reacción puede, como otro ejemplo, recibir un reactivo reductor y los polipéptidos e incubar el reactivo reductor y los polipéptidos para facilitar la reducción de los polipéptidos. El primer o segundo serpentines de reacción puede, como otro ejemplo más, recibir un reactivo alquilante y los polipéptidos e incubar el reactivo alquilante y los polipéptidos para facilitar la alquilación de los polipéptidos. El primer o segundo serpentines de reacción puede, como ejemplo adicional, recibir una mezcla que incluye glicanos liberados y un reactivo marcador de glicanos e incubar la mezcla para facilitar el marcaje (por ejemplo, marcaje fluorescente) de los glicanos liberados.

Para facilitar la incubación deseada, el sistema 100 puede incluir además un elemento de calentamiento colocado inmediatamente adyacente o acoplado térmicamente de otro modo al primer y/o segundo serpentín de reacción. El elemento de calentamiento puede, por ejemplo, tomar la forma de un serpentín de calentamiento, un calentador de inducción, una bomba de calor, un calentador de cartucho, un cable de resistencia eléctrica u otro elemento adecuado para calentar una o más porciones del primer o segundo serpentín de reacción respectivo. Por lo tanto, cuando el sistema 100 incluye un elemento de calentamiento acoplado térmicamente al primer serpentín de reacción, el elemento de calentamiento está configurado para mantener el primer serpentín de reacción a una primera temperatura de incubación predeterminada, que puede ser, por ejemplo, aproximadamente 30 °C. aproximadamente 40 °C, aproximadamente 80 °C o alguna otra temperatura de incubación, dependiendo de la aplicación. De manera similar, cuando el sistema 100 incluye un elemento de calentamiento acoplado térmicamente al segundo serpentín de reacción, el elemento de calentamiento está configurado para mantener el segundo serpentín de reacción a una segunda temperatura de incubación predeterminada, que puede ser igual o diferente a la primera temperatura de incubación predeterminada.

El uno o más viales receptores están en este ejemplo por lo general dispuestos aguas abajo de todos los demás componentes del sistema 100. Al igual que uno o más viales de muestra, el uno o más viales receptores toman por lo general la forma de uno o más viales de flujo continuo, aunque también se pueden usar otros viales (por ejemplo, viales de flujo discontinuo continuo). El uno o más viales receptores están por lo general acoplados fluidamente a la válvula multipuerto 112 y/o a la válvula multipuerto 116. Por lo tanto, el uno o más viales receptores están por lo general dispuestos para recibir una mezcla que incluye las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos) de una o más de la primera columna, la segunda columna, el primer serpentín de reacción y el segundo serpentín de reacción. En el ejemplo ilustrado, el sistema 100 utiliza dos viales de flujo continuo, uno primero que está acoplado fluidamente a la válvula multipuerto 112 y un segundo que está acoplado fluidamente a la válvula multipuerto 116. Por lo tanto, el primer vial de flujo está dispuesto para recibir una mezcla que incluye las moléculas de la primera columna o de la segunda columna (dependiendo de qué columna se esté usando). La mezcla puede incluir, por ejemplo, la solución tampón de elución y moléculas eluidas por la solución tampón de elución de la primera columna. Por otro lado, el segundo vial de flujo está dispuesto para recibir una mezcla que incluye las moléculas del primer serpentín de reacción o del segundo serpentín de reacción (dependiendo de qué serpentín se esté usando). La mezcla puede incluir, por ejemplo, moléculas que fueron desnaturalizadas y reducidas en el primer serpentín de reacción.

En algunos ejemplos, se apreciará que cada uno de los viales receptores puede tener una pluralidad de orificios que están dispuestos y dimensionados para evitar sustancialmente que las moléculas en la mezcla recibida pasen a través de los mismos pero permiten que el resto de la mezcla pase a través de los mismos y fuera del vial receptor respectivo. Por tanto, los orificios de cada uno de los viales receptores separan eficazmente las moléculas de la mezcla recibida del resto de la mezcla. Las moléculas separadas pueden, a su vez, pasarse al dispositivo analítico (para el análisis de las moléculas) o pueden pasarse a otros componentes del sistema 100 para su posterior preparación. Mientras tanto, el resto de la mezcla puede, a su vez, desecharse. Alternativa o adicionalmente, esta función de separación se puede realizar moviendo oportunamente una o más de la válvula multipuerto 104, la válvula multipuerto 108, la válvula multipuerto 112 y la válvula multipuerto 116.

En algunos ejemplos, como el ilustrado en la Figura 1, el sistema 100 puede incluir también uno o más viales intermedios, cada uno de los que incluye un fluido configurado para diluir la concentración de sal en la muestra. El fluido puede, por ejemplo, tomar la forma de agua, un tampón (por ejemplo, un tampón bajo en sal), un disolvente orgánico *(por ejemplo,* metanol, etanol, propanol, acetona) o una fase móvil que sirve como diluyente. En cualquier caso, cuando es necesario diluir la concentración de sal en la muestra, la aguja se puede mover para (i) obtener la muestra del componente apropiado en el sistema 100 y depositar la muestra en el vial intermedio respectivo para su dilución, o (ii) obtener el fluido del respectivo vial intermedio y depositar el fluido en el componente del sistema 100 que contiene la muestra.

La primera bomba 120 en este ejemplo toma la forma de una bomba binaria o cuaternaria que está acoplada fluidamente a la válvula multipuerto 104. La bomba binaria o cuaternaria está por lo general dispuesta para ayudar a mover materiales a través de la válvula multipuerto 104 y hacia otros componentes en el sistema 100. En este ejemplo, la bomba está dispuesta para impulsar muestras desde el puerto de asiento de aguja e impulsar las fases móviles a la primera columna, la segunda columna u otro componente del sistema 100, según se desee.

La segunda bomba 124 en este ejemplo toma la forma de una bomba cuaternaria que está acoplada fluidamente a la válvula multipuerto 108. La segunda bomba 124 está por lo general dispuesta para ayudar a limpiar varios componentes del sistema 100. En este ejemplo, la segunda bomba 124 está dispuesta para conducir varias soluciones (por ejemplo, tampones) a la primera y segunda columnas con el fin de limpiar y equilibrar estas columnas, y para conducir varias soluciones al primer y segundo serpentines de reacción para lavar los serpentines para evitar el arrastre de una muestra a otra. Por ejemplo, la segunda bomba 124 puede configurarse para lavar el vial de flujo continuo *en su lugar,* de modo que no es necesario retirar el vial de flujo para el lavado, simplificando así el diseño del sistema 100 y minimizando el número de piezas móviles en el sistema 100.

El dispositivo analítico está por lo general configurado para analizar las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos) después de que las moléculas *(por ejemplo,* los polipéptidos) han sido preparados por el sistema 100. El dispositivo analítico puede estar realizado, por ejemplo, como un dispositivo de cromatografía líquida *(por ejemplo,* una columna de cromatografía de intercambio iónico, una columna de cromatografía de intercambio catiónico, una columna de cromatografía de intercambio aniónico), un dispositivo de cromatografía líquida de alto rendimiento, un dispositivo de cromatografía líquida de rendimiento ultra alto, un dispositivo de espectrometría de masas *(por ejemplo,* un espectrómetro de masas de masa precisa de alta resolución (HRAM)), un dispositivo espectrofotométrico *(por ejemplo,* un detector UV), un dispositivo de análisis de glicanos, otro tipo de dispositivo analítico, o una combinación de los mismos. Se contempla que un espectrómetro de masas HRAM puede ser útil para el análisis de moléculas pequeñas tales como metabolitos como se describe en el presente documento. También se apreciará que se pueden emplear múltiples dispositivos analíticos en el sistema 100.

Como se ilustra en la Figura 1, el sistema 100 incluye también un controlador, que en este ejemplo está acoplado o conectado comunicativamente a varios componentes del sistema 100 para monitorear y facilitar o dirigir el funcionamiento anteriormente descrito del sistema 100 mediante la transmisión de señales *(por ejemplo,* señales de control, datos) hacia y recepción de señales *(por ejemplo,* datos) de los diversos componentes del sistema 100. El controlador puede ubicarse inmediatamente adyacente a los otros componentes del sistema 100 *(por ejemplo,* en el mismo entorno que el sistema 100) o puede ubicarse de forma remota desde los otros componentes del sistema 100.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "acoplado comunicativamente" y "conectado" se definen en el sentido de acoplado directamente o conectado a, o indirectamente acoplado o conectado a través de uno o más componentes intermedios. Dichos componentes intermedios pueden incluir componentes basados en hardware y/o software. Se aprecia que el controlador puede acoplarse o conectarse comunicativamente a varios componentes del sistema 100 a través de una o más redes inalámbricas, una o más redes cableadas, una o más combinaciones de una red cableada e inalámbrica *(por ejemplo,* una red de telefonía celular y/o una red compatible con 802.11x), y puede incluir una red de acceso público, como Internet, una red privada o una combinación de las mismas. El tipo y la configuración de las redes dependen de la implementación, y se puede utilizar cualquier tipo de red de comunicaciones que facilite las comunicaciones descritas entre el controlador y los componentes del sistema 100, disponibles ahora o desarrolladas más adelante.

Como se muestra en la Figura 2, el controlador incluye un procesador 352, una memoria 356, una interfaz de comunicaciones 360 y una lógica informática 364. El procesador 352 puede ser un procesador general, un procesador de señales digitales, ASIC, una matriz de puertas programables en campo, una unidad de procesamiento de gráficos, un circuito analógico, un circuito digital o cualquier otro procesador conocido o desarrollado posteriormente. El procesador 352 funciona según instrucciones en la memoria 356. La memoria 356 puede ser una memoria volátil o una memoria no volátil. La memoria 356 puede incluir una o más de una memoria de sólo lectura (ROM), una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria flash, una memoria de sólo lectura de programa borrable electrónicamente (EEPROM) u otro tipo de memoria. La memoria 356 puede incluir un dispositivo de almacenamiento de datos óptico, magnético (disco duro) o cualquier otra forma.

La interfaz de comunicaciones 360 se proporciona para permitir o facilitar la comunicación electrónica entre el controlador y los componentes del sistema 100 a través de una o más redes utilizadas. La interfaz de comunicaciones 360 puede ser o incluir, por ejemplo, uno o más puertos de bus serie universal (USB), uno o más puertos Ethernet y/o uno o más puertos o interfaces diferentes. La comunicación electrónica puede realizarse a través de cualquier protocolo de comunicaciones conocido, incluyendo, a modo de ejemplo, USB, RS-232, RS-485, WiFi, Bluetooth y/o cualquier otro protocolo de comunicaciones adecuado.

La lógica 364 incluye por lo general una o más rutinas de control y/o una o más subrutinas incorporadas como instrucciones legibles por ordenador almacenadas en la memoria 356. Las rutinas y/o subrutinas de control pueden realizar control PID (proporcional-integral-derivativo), lógica difusa, no lineal o cualquier otro tipo de control adecuado. El procesador 352 ejecuta por lo general la lógica 364 para realizar acciones relacionadas con el funcionamiento del sistema 100.

En términos generales, la lógica 364, cuando se ejecuta, hace que el procesador 352 controle los componentes del sistema 100, particularmente las válvulas multipuerto 104, 108, 112, 116, la aguja, las bombas 120, 124 y el (los) elemento(s) de calentamiento(s), de modo que el sistema 100 funcione de la manera deseada descrita en el presente documento. Como ejemplo, la lógica 364 puede, cuando se ejecuta, hacer que el procesador 352 mueva la válvula multipuerto 112 y/o la válvula multipuerto 116 hacia o entre cualquiera de las posiciones descritas en el presente documento, acoplando así fluidamente varios componentes de la sistema 100 como se describe anteriormente.

En otras versiones, la lógica 364 puede, cuando la ejecuta el procesador 352, hacer que se realice una funcionalidad adicional, menor y/o diferente. Además, en otras versiones, la lógica 364 puede ser ejecutada por el procesador 352 en un orden diferente al descrito en el presente documento. Finalmente, se aprecia que la lógica 364 puede ser ejecutada por el procesador 352 cualquier número de veces diferentes, ya que el sistema 100 puede usarse para realizar análisis en tiempo real de múltiples muestras (del mismo producto y/o de un producto diferente).

La Figura 3 ilustra un ejemplo de un método 300 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un primer ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es una medición del título de producción y el método 300 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de uno de los viales de muestra y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja al dispositivo analítico, que en este ejemplo toma la forma de un detector espectrofotométrico, a través de la válvula multipuerto 104, y (4) determinar el título/concentración de la muestra usando el dispositivo analítico.

La Figura 4 ilustra otro ejemplo de un método 400 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un segundo ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es una evaluación de agregación y el método 400 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, (8) mover las moléculas del segundo vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (9) cuantificar el nivel de agregación en las moléculas usando el dispositivo analítico.

La Figura 5 ilustra otro ejemplo de un método 500 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un tercer ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es un perfil de variante de carga y el método 500 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de

muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, formando así una muestra purificada por afinidad en el segundo vial, (8) mover las moléculas del segundo vial a un tercer vial (uno de los viales intermedios) para diluir la muestra purificada por afinidad, (9) mover el muestra purificada por afinidad del tercer vial de regreso a la válvula multipuerto 108 a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, (10) mover la muestra purificada por afinidad de la válvula multipuerto 108 a la segunda columna a través de la válvula multipuerto 112 (que se ha movido de la primera posición a la segunda posición), (11) aplicar la muestra purificada por afinidad a la segunda columna, reduciendo así aún más la concentración de sal de la muestra, (12) mover la muestra purificada por afinidad diluida adicionalmente de la segunda columna de regreso al segundo vial, (13) mover la muestra purificada por afinidad del segundo vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (14) realizar una evaluación de variante de carga usando el dispositivo analítico (que en este ejemplo toma la forma de una columna de intercambio iónico).

La Figura 6 ilustra otro ejemplo de un método 600 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un cuarto ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo de perfil de glicosilación y el método 600 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución que contiene glicosidasas (en este ejemplo PNGasa-F) de una fuente a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuertos 104, 108 y 112, liberando así glicanos de las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover los glicanos liberados a un segundo vial (uno de los viales receptores), (8) mover un reactivo marcador de glicanos (en este ejemplo 2-AA) de una fuente al segundo vial a través de la aguja, (9) mezclar el reactivo marcador de glicanos y los glicanos liberados en el segundo vial, (10) mover la mezcla de los glicanos liberados y el reactivo marcador de glicanos al segundo serpentín de reacción (serpentín B) a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la cuarta posición), (11) incubar la mezcla en el segundo serpentín de reacción, marcando así de manera fluorescente los glicanos, (12) mover la mezcla del segundo serpentín de reacción a un tercer vial (otro de los viales receptores), lo que separa los glicanos marcados en la mezcla del resto de la mezcla, (13) mover los glicanos marcados del tercer vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (14) realizar la separación cromatográfica en fase normal y la cuantificación usando el dispositivo analítico.

La Figura 7 ilustra otro ejemplo de un método 700 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un quinto ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo MAM y el método 700 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, formando así una muestra purificada por afinidad en el segundo vial, (8) mover, a través de la aguja, la muestra purificada por afinidad del segundo vial a un tercer vial (uno de los viales intermedios) para diluir la muestra purificada por afinidad muestra, (9) mover la muestra diluida purificada por afinidad del tercer vial de regreso al segundo vial mediante la aguja, (10) mover un reactivo desnaturalizante y un reactivo reductor al segundo vial mediante la aguja, (11) mover la muestra purificada por afinidad muestra, el reactivo desnaturalizante y el reactivo reductor del segundo vial al primer serpentín de reacción (serpentín A) a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la tercera posición), (12) incubar la mezcla en el primer serpentín de reacción, desnaturalizando y reduciendo así las moléculas, (13) mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas del primer serpentín de reacción a un cuarto vial (otro de los viales receptores) acoplado fluidamente al

primer serpentín de reacción, (14) mover un reactivo alquilante al cuarto vial a través de la aguja, (15) mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas y el reactivo alquilante del cuarto vial al primer serpentín de reacción (serpentín A) a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la tercera posición), (16) incubar las moléculas desnaturalizadas y reducidas y el reactivo alquilante en el primer serpentín de reacción, alquilando así las moléculas desnaturalizadas y reducidas, (17) mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas del primer serpentín de reacción al cuarto vial, (18) mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas del cuarto vial a la segunda columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que se ha movido de la primera posición a la segunda posición), (19) aplicar las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas a la segunda columna, reduciendo así la concentración de sal de las moléculas, (20) mover las moléculas desaladas de la segunda columna de regreso al segundo vial, (21) mover una enzima al segundo vial a través de la aguja (ya sea antes de la etapa (20) o después de la etapa (20), (22) mover las moléculas desaladas y la enzima del segundo vial al segundo serpentín de reacción (serpentín B) a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que se ha movido a la cuarta posición), (23) incubar las moléculas desaladas y la enzima en el segundo serpentín de reacción, digiriendo así las moléculas, (24) mover las moléculas digeridas del segundo serpentín de reacción de regreso al cuarto vial, (25) mover las moléculas digeridas del cuarto vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (26) analizar las moléculas digeridas usando el dispositivo analítico.

La Figura 8 ilustra parcialmente otro ejemplo de un método 800 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un sexto ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo de producto sintético y el método 800 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, formando así una muestra purificada por afinidad en el segundo vial, (8) mover un reactivo de extinción al segundo vial mediante la aguja, (9) mover la muestra purificada por afinidad y el reactivo de extinción del segundo vial al primer serpentín de reacción (serpentín A) a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la tercera posición), (10) incubar la muestra purificada por afinidad y el reactivo de extinción en el primer serpentín de reacción, inactivando así las moléculas, (11) mover las moléculas inactivas del primer serpentín de reacción a un tercer vial (otro de los viales receptores) acoplado fluidamente al primer serpentín de reacción, (12) mover las moléculas inactivas del tercer vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (13) analizar las moléculas inactivas usando el dispositivo analítico.

La Figura 9 ilustra otro ejemplo de un método 900 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un séptimo ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 100. En este ejemplo, el ensayo es un análisis de metabolitos y el método 900 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener (por ejemplo, automáticamente) una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra en el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna (que en este ejemplo toma la forma de una columna de cromatografía trimodal) a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la primera posición), (5) capturar las moléculas de la muestra en la primera columna, separando así las moléculas de la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha a través de un segundo vial (uno de los viales receptores) acoplado fluidamente al mismo, (6) mover tanto una solución tampón de elución como *(por ejemplo,* una solución tampón volátil baja en sal) de una fuente de tampón y un disolvente orgánico de uno de los viales intermedios a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108 y 112, eluyendo y diluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución, el disolvente orgánico y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, (8) mover las moléculas del segundo vial al dispositivo analítico (que en este ejemplo toma la forma de un dispositivo de espectrometría de masas tal como un espectrómetro de masas HRAM) a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, y (9) analizar los metabolitos en las moléculas usando el dispositivo analítico. Se apreciará que debido a que la primera columna en este ejemplo es una columna de cromatografía trimodal, el método 900 facilita ventajosamente el análisis de metabolitos sin utilizar marcaje diferencial o reactivos de pares iónicos. También se apreciará que el método 900 se puede usar para analizar más de doscientos metabolitos diferentes, incluidos, por ejemplo, aminoácidos (y aminoácidos muy hidrófilos como los isómeros de leucina), vitaminas, azúcares de nucleótidos, análogos de nucleósidos, cetoácidos, carbohidratos, aminoalcoholes, nucleótidos, poliaminas y fosfolípidos.

La Figura 10 ilustra un diagrama esquemático de otro ejemplo de un sistema 1000 ensamblado según las enseñanzas de la presente descripción. El sistema 1000 ilustrado en la Figura 10 es similar al sistema 100 en que el sistema 1000 incluye también por lo general uno o más viales de muestra, una aguja, un bucle de muestra, un dispositivo dosificador, un puerto de asiento de aguja, una primera columna, una segunda columna, una o más fuentes de tampón, una o más fuentes de reactivos de cambio, una o más fuentes de solución(es) vehículo(s), un serpentín de reacción, un elemento de calentamiento acoplado térmicamente al serpentín de reacción, uno o más viales receptores (por ejemplo, uno o más viales de flujo continuo), así como las cuatro válvulas multipuerto 104, 108, 112, 116, el controlador, el dispositivo analítico, la primera bomba 120 y la segunda bomba 124 empleadas en el sistema 100 de la Figura 1, y un conducto (por ejemplo, un conducto de acero inoxidable) que se extiende entre cada uno de los componentes del sistema 1000 para facilitar la comunicación fluida entre los componentes del sistema 1000 cuando se desee. Sin embargo, el sistema 1000 ilustrado en la Figura 10 es diferente del sistema 100 ilustrado en la Figura 1 en dos aspectos principales. En primer lugar, a diferencia del sistema 100, el sistema 1000 no incluye una segundo serpentín de reacción. En segundo lugar, algunos de los componentes descritos anteriormente están dispuestos de forma diferente en el sistema 1000 que en el sistema 100. Como ejemplo, en el sistema 1000, el dispositivo analítico, la primera bomba 120 y la segunda bomba 124 están acoplados fluidamente a puertos de la válvula multipuerto 108 en lugar de a los puertos de la válvula multipuerto 104 (como están en el sistema 100). Como otro ejemplo, en el sistema 1000, el serpentín de reacción (y el elemento de calentamiento acoplado térmicamente al mismo) están acoplados (y entre) fluidamente a los puertos de la válvula multipuerto 112 en lugar de a los puertos de la válvula multipuerto 116 (como están en el sistema 100). Por lo tanto, en el sistema 1000, es la posición de la válvula multipuerto 112 (y no la posición de la válvula multipuerto 116) la que determina si la válvula multipuerto 108 está acoplada fluidamente al serpentín de reacción (y la elemento de calentamiento).

A pesar de estas diferencias, el sistema 1000 es, como el sistema 100, un sistema cerrado para preparar automática o sustancialmente automáticamente una muestra de un producto que contiene moléculas para análisis y realizar automáticamente un ensayo de esa muestra. Al automatizar (o sustancialmente automatizar) este proceso usando el sistema 1000, el ensayo se puede realizar en tiempo real (o sustancialmente en tiempo real) y en la planta de fabricación (cuando se usa en la instalación de fabricación), de modo que todo el proceso se puede realizar y obtener el resultado deseado en cuestión de horas (*por ejemplo*, 2 a 3 horas), una mejora significativa con respecto a los pocos días que normalmente conllevan los procesos operados manualmente, conocidos convencionalmente. Además, la naturaleza cerrada del proceso que utiliza el sistema 1000 mantiene condiciones estériles. Aún más, al igual que el sistema 100, el sistema 1000 es un sistema flexible que puede usarse para preparar cualquier número de muestras (iguales o diferentes) para diferentes análisis y puede realizar automáticamente varios ensayos diferentes en estas muestras, obviando así la necesidad de múltiples sistemas diferentes para preparar diferentes muestras para diferentes análisis.

La Figura 11 ilustra un ejemplo de un método 1100 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un primer ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 1000. En este ejemplo, el ensayo es una medición del título de producción y el método 1100 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de uno de los viales de muestra y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja al dispositivo analítico, que en este ejemplo toma la forma de un dispositivo de cromatografía líquida, a través de la válvula multipuerto 104 y la válvula multipuerto 108, y (4) determinar el título/concentración de la muestra usando el dispositivo analítico.

La Figura 12 ilustra otro ejemplo de un método 1200 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un segundo ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 1000. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y el método 1200 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra que comprende moléculas de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la segunda posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, (8) mover las moléculas del segundo vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108 y (9) cuantificar el nivel de agregación en las moléculas usando el dispositivo analítico.

La Figura 13 ilustra otro ejemplo de un método 1300 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un tercer ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 1000. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo de cromatografía de intercambio iónico (IEX) y el método 1300 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra (cuya muestra comprende moléculas) de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del

bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la segunda posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, formando así una muestra purificada por afinidad en el segundo vial, (8) mover las moléculas del segundo vial a un tercer vial (uno de los viales intermedios) para diluir la muestra purificada por afinidad, (9) mover el muestra purificada por afinidad del tercer vial de regreso a la válvula multipuerto 108 a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y la válvula multipuerto 104, (10) mover la muestra purificada por afinidad de la válvula multipuerto 108 a la segunda columna a través de la válvula multipuerto 112 (que se ha movido a la tercera posición), (11) aplicar la muestra purificada por afinidad a la segunda columna, reduciendo así aún más la concentración de sal de la muestra, (12) mover la muestra purificada por afinidad desalada adicionalmente de la segunda columna de regreso al segundo vial, (13) mover la muestra purificada por afinidad del segundo vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108 y (14) realizar una evaluación de variante de carga usando el dispositivo analítico (que en este ejemplo toma la forma de una columna de intercambio iónico).

La Figura 14 ilustra otro ejemplo de un método 1400 para realizar automáticamente (o sustancialmente automáticamente) un cuarto ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 1000. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo MAM y el método 1400 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a la primera columna a través de la válvula multipuerto 112 (que está en la segunda posición), (5) capturar las moléculas en la muestra en la primera columna, separando así las moléculas en la muestra de una matriz de la muestra, que fluye fuera de la primera columna y se desecha acoplado fluidamente al mismo, (6) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la primera columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108, y 112, eluyendo así las moléculas capturadas por la primera columna, (7) mover una mezcla de elución/molécula que incluye la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial (uno de los viales receptores), lo que separa las moléculas en la mezcla de un resto de la mezcla, formando así una muestra purificada por afinidad en el segundo vial, (8) mover, a través de la aguja, la muestra purificada por afinidad del segundo vial a un tercer vial (uno de los viales intermedios) para diluir la muestra purificada por afinidad muestra, (9) mover la muestra diluida purificada por afinidad del tercer vial de regreso al segundo vial mediante la aguja, (10) mover un reactivo desnaturalizante y un reactivo reductor al segundo vial mediante la aguja, (11) mover la muestra purificada por afinidad muestra, el reactivo desnaturalizante y el reactivo reductor del segundo vial al serpentín de reacción a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la cuarta posición), (12) incubar la mezcla en el serpentín de reacción, desnaturalizando y reduciendo así las moléculas, (13) mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas del serpentín de reacción a un cuarto vial (otro de los viales receptores) acoplado fluidamente al serpentín de reacción, (14) mover un reactivo alquilante al cuarto vial a través de la aguja, (15) mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas y el reactivo alquilante del cuarto vial al serpentín de reacción a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la cuarta posición), (16) incubar las moléculas desnaturalizadas y reducidas y el reactivo alquilante en el serpentín de reacción, alquilando así las moléculas desnaturalizadas y reducidas, (17) mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas del serpentín de reacción al cuarto vial, (18) mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas del cuarto vial a la segunda columna a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que se ha movido a la tercera posición), (19) aplicar las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas a la segunda columna, reduciendo así la concentración de sal de las moléculas, (20) mover las moléculas desaladas de la segunda columna de regreso al segundo vial, (21) mover una enzima al segundo vial a través de la aguja (ya sea antes de la etapa (20) o después de la etapa (20), (22) mover las moléculas desaladas y la enzima del segundo vial al serpentín de reacción a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que se ha movido a la cuarta posición), (23) incubar las moléculas desaladas y la enzima en el serpentín de reacción, digiriendo así las moléculas, (24) mover las moléculas digeridas del serpentín de reacción de regreso al cuarto vial, (25) mover las moléculas digeridas del cuarto vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108 y (26) analizar las moléculas digeridas usando el dispositivo analítico.

La Figura 15 ilustra parcialmente otro ejemplo de un método 1500 para realizar automáticamente un quinto ensayo en tiempo real de una muestra usando el sistema 1000. En este ejemplo, el ensayo es un ensayo no cromatográfico y el método 1500 incluye por lo general: (1) mover (por ejemplo, mover automáticamente) la aguja para obtener una muestra de un primer vial (uno de los viales de muestra) y depositar la muestra en el bucle de muestra, (2) empujar la muestra del bucle de muestra hacia el interior del puerto de asiento de aguja, (3) mover la muestra del puerto de asiento de aguja a la válvula multipuerto 108 a través de la válvula multipuerto 104, (4) mover la muestra de la válvula multipuerto 108 a un segundo vial (uno de los viales receptores) a través de las válvulas multipuerto 108, 112, (5)

mover un reactivo de extinción al segundo vial a través de la aguja, (6) mover la muestra y el reactivo de extinción del segundo vial al serpentín de reacción a través de la aguja, las válvulas multipuerto 104, 108 y la válvula multipuerto 112 (que está en la cuarta posición), (7) incubar la muestra y el reactivo de extinción en el serpentín de reacción, inactivando así las moléculas en la muestra, (8) mover las moléculas inactivas del serpentín de reacción de regreso al segundo vial o a un tercer vial (otro de los viales receptores) acoplado fluidamente al serpentín de reacción, (9) mover las moléculas inactivas del tercer vial al dispositivo analítico a través de la aguja, el puerto de asiento de aguja y las válvulas multipuerto 104, 108 y (10) analizar las moléculas inactivas usando el dispositivo analítico.

Las Figuras 16 y 17 ilustran un ejemplo de un vial de flujo continuo 1600 que se puede emplear en el sistema 100 o el sistema 1000 para permitir el flujo continuo a través del sistema 100 o del sistema 1000. Como se ilustra, el vial de flujo continuo 1600 en este ejemplo incluye por lo general una base 1604, un reborde 1606 acoplado a la base 1604 y un canalón 1608 que está acoplado y se extiende hacia fuera tanto de la base 1604 como del reborde 1606. En este ejemplo, la base 1604 está definida por una primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 y una segunda porción sustancialmente rectangular 1616 acoplada a la primera porción sustancialmente cilíndrica 1612. La primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 se extiende por lo general desde un primer extremo 1620 hasta un segundo extremo 1624 opuesto al primer extremo 1620 a lo largo de un primer eje 1628. La primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 tiene un orificio sustancialmente cilíndrico 1632 formado en ella entre el primer extremo 1620 y el segundo extremo 1624. La segunda porción sustancialmente rectangular 1616 se extiende hacia fuera desde la primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 a lo largo de un segundo eje 1636 que es perpendicular al primer eje 1628. Sin embargo, en otros ejemplos, los componentes del vial de flujo continuo pueden tener formas diferentes. Por ejemplo, el canalón 1608 puede tener una forma cilíndrica u otra forma no rectangular. Como otro ejemplo, la base 1604 puede tener una forma cilíndrica o sustancialmente cilíndrica definida solo por la porción sustancialmente cilíndrica 1612.

En este ejemplo, el reborde 1606 es un reborde sustancialmente cilíndrico que está formado integralmente y se extiende hacia fuera desde la primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 (particularmente el primer extremo 1620 de la misma) a lo largo del primer eje 1628. Dispuesto de esta manera, el reborde 1606 conecta fluidamente el orificio sustancialmente cilíndrico 1632 al canalón 1608. En otros ejemplos, sin embargo, el reborde 1606 puede tener una forma diferente, puede acoplarse de manera fija o separable a la primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 (u otra porción), y/o puede extenderse hacia fuera desde la primera porción sustancialmente cilíndrica 1612 a lo largo un eje que forma un ángulo con respecto al primer eje 1628. En otros ejemplos más, el vial de flujo continuo 1600 puede no incluir el reborde 1606 en absoluto, en cuyo caso el canalón 1608 está directamente conectado fluidamente al orificio sustancialmente cilíndrico 1632.

En este ejemplo, el canalón 1608 está definido por una base sustancialmente rectangular 1640 y un bajante 1644 que está acoplado a la base rectangular 1640. La base sustancialmente rectangular 1640 del canalón 1608 se extiende hacia fuera desde la segunda porción sustancialmente rectangular 1616 de la base 1604 y desde el reborde 1606 a lo largo de un tercer eje 1648 que es perpendicular tanto al primer eje 1628 como al segundo eje 1636 y está inclinado con respecto a la horizontal (véase Figura 17). La base sustancialmente rectangular 1640 define un canal sustancialmente rectangular 1652 que conecta fluidamente el reborde 1606 (y a su vez el orificio sustancialmente cilíndrico 1632) al bajante 1644. El bajante 1644 en este ejemplo es cilíndrico y se extiende hacia fuera (hacia abajo en la Figura 16) desde la base rectangular 1640 a lo largo de un cuarto eje 1652 que es paralelo al primer eje 1628 y perpendicular al segundo eje 1636 y al tercer eje 1648. En otros ejemplos, el canalón 1608 puede tener una base 1640 de forma diferente (por ejemplo, la base 1640 puede tener una forma cilíndrica) y/o el bajante 1644 puede tener una forma diferente. En otros ejemplos, el canalón 1608 no necesita incluir el bajante 1644.

El vial de flujo continuo 1600 incluye también un puerto de entrada 1660 y un puerto de salida 1664. El puerto de entrada 1660 está por lo general dispuesto en la base 1604 del vial de flujo para recibir el fluido entrante desde el sistema de muestreo automatizado, la válvula multipuerto 112, la válvula multipuerto 116 u otros componentes del sistema 100 o del sistema 1000, según se desee. Como se ilustra en las Figuras 16 y 17, el puerto de entrada 1660 en este ejemplo se formó en la segunda porción sustancialmente rectangular 1616 y se extiende a lo largo de un quinto eje 1668 que está inclinado con respecto al alcance del primer eje 1628, el segundo eje 1636, el tercer eje 1648, y el cuarto eje 1652. El quinto eje 1668 puede, por ejemplo, orientarse en un ángulo de aproximadamente 45 grados con respecto al primer eje 1628. Mientras tanto, el puerto de salida 1664 está dispuesto por lo general en el canalón 1608 del vial de flujo continuo para dirigir el fluido que ha fluido hacia la base 1604 a través del puerto de entrada 1660 y ha fluido a través del orificio sustancialmente cilíndrico 1632 y el canal 1652 del canalón 1608 fuera del vial de flujo continuo 1600. En este ejemplo, el puerto de salida 1664 está formado en el bajante 1644, aunque en otros ejemplos (por ejemplo, cuando el vial de flujo continuo 1600 no incluye el bajante 1644), el puerto de salida 1664 puede formarse en una parte diferente del canalón 1608.

Si bien no se ilustra en el presente documento, se apreciará que se puede usar un conducto (no mostrado) para conectar fluidamente el componente deseado del sistema 100 (por ejemplo, el sistema de muestreo automatizado) o el sistema 1000 al puerto de entrada 1660. El fluido, a su vez, fluirá desde ese componente deseado del sistema hacia el vial de flujo continuo 1600 a través del puerto de entrada 1660. A medida que el fluido fluye a través del vial de flujo continuo 1600, el reborde 1606 ayuda a evitar la tensión superficial. En algunos ejemplos, también se puede usar un conducto (no mostrado) para conectar fluidamente el puerto de salida 1664 al destino deseado para el fluido dentro del sistema 100 o el sistema 1000. Como ejemplo, se puede usar un conducto para conectar fluidamente el puerto de

salida 1664 al dispositivo analítico del sistema 100 o el sistema 1000. En otros ejemplos, no se puede usar un conducto para conectar fluidamente el puerto de salida 1664 al destino deseado. Por ejemplo, la aguja del sistema 100 o del sistema 1000 puede recuperar el fluido directamente del vial de flujo continuo 1600 y depositar el fluido en el componente deseado del sistema 100 (por ejemplo, el bucle de muestra) o el sistema 1000. Como otro ejemplo (por ejemplo, cuando es necesario limpiar el vial de flujo continuo 1600), el vial de flujo continuo 1600 se puede colocar de modo que el bajante 1644 se coloque directamente sobre los desechos, de modo que el fluido que fluye a través del canalón 1608 se dirija a los desechos. En cualquier caso, el vial de flujo continuo 1600 está configurado para facilitar el flujo continuo a su través, lo que, por ejemplo, evita la necesidad de cambiar periódicamente los viales de muestra (particularmente cuando se analizan diferentes muestras).

Las Figuras 18 y 19 ilustran un portaviales 1800 que puede emplearse en el sistema 100 o el sistema 1000 para contener una pluralidad de viales de flujo 1600. En este ejemplo, el portaviales 1800 está configurado para colocarse dentro o acoplarse de otro modo al sistema de muestreo automático. Sin embargo, en otros ejemplos, el portaviales 1800 se puede acoplar a otro componente del sistema 100 o del sistema 1000. En cualquier caso, el portaviales 1800 ilustrado en las Figuras 18 y 19 incluye una brida de montaje 1804 y una pluralidad de receptáculos de vial 1808 acoplados a la brida de montaje 1804. Como se ilustra en la Figura 19, la brida de montaje 1804 se puede acoplar a una porción del sistema de muestreo automático para acoplar el portaviales 1800 (y los viales de flujo continuo 1600 transportados por el portaviales 1800) al sistema de muestreo automático. Mientras tanto, cada uno de la pluralidad de receptáculos de viales 1808 está dimensionado para recibir uno de los viales de flujo 1600. Más particularmente, como se ilustra en la Figura 19, cada uno de la pluralidad de receptáculos de viales 1808 está dimensionado para recibir la base 1604 respectiva de uno de los viales de flujo continuo 1600. A su vez, el canal respectivo 1608 de ese vial de flujo continuo 1600 se extiende hacia fuera, alejándose del portaviales 1600.

Polipéptidos terapéuticos

Las proteínas, incluidas aquellas que se unen a uno o más de los siguientes, pueden ser útiles en los sistemas y métodos descritos. Estas incluyen proteínas CD, incluyendo CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 y CD34; incluyendo las que interfieren con la unión al receptor. Proteínas de la familia de receptores HER, que incluyen, HER2, HER3, HER4 y el receptor de EGF. Moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-I, Mol, pI50, 95, VLA-4, ICAM-I, VCAM e integrina alfa v/beta 3. Factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento del endotelio vascular ("VEGF"), hormona del crecimiento, hormona estimulante del tiroides, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, factor liberador de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, hormona antimuleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-I-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF), incluyendo, entre otros, TGF-α y TGF-β, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5, factores de crecimiento similares a insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II), des(I-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), y factores osteoinductores. Las insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, incluyendo la insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina. Proteínas de coagulación y relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno ("t-PA"), bombesina, trombina y trombopoyetina; (vii) otras proteínas sanguíneas y séricas, incluyendo, aunque sin limitación, albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneos. Factores estimulantes de colonias y receptores de los mismos, incluyendo los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF, y receptores de los mismos, tales como el receptor de CSF-1 (c-fms). Receptores y proteínas asociadas a receptor, incluyendo, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor de LDL, receptores de la hormona del crecimiento, receptores de trombopoyetina ("TPO-R", "c-mpl"), receptores de glucagón, receptores de interleucina, receptores de interferón, receptores de linfocitos T, receptores del factor de células madre, tales como c-Kit, y otros receptores. Ligandos de receptor, incluyendo, por ejemplo, OX40L, el ligando para el receptor OX40. Factores neurotróficos, incluyendo factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6). Cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorelaxina; interferones y receptores de interferón, que incluyen, por ejemplo, interferón-alfa, - β y -y, y sus receptores. Interleucinas y receptores de interleucinas, incluyendo IL-1 a IL-33 y receptores de IL-1 a IL-33, tal como el receptor de IL-8, entre otros. Antígenos víricos, incluyendo un antígeno vírico de la envoltura del virus del SIDA. Lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalinasa, RANTES (regulado después de la activación de linfocitos T normales, expresados y secretados), péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNasa, inhibina y activina. Integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de la membrana superficial, factor acelerador de descomposición (DAF), envoltura del virus del SIDA, proteínas de transporte, receptores de migración dirigida, adresinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos. Miostatinas, proteínas TALL, que incluyen TALL-1, proteínas amiloides, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de amiloide-beta, linfopoyetinas del estroma tímico ("TSLP"), ligando RANK ("OPGL"), c-kit, receptores de TNF, que incluyen receptor de TNF tipo 1, TRAIL-R2, angiopoyetinas, y fragmentos biológicamente activos o análogos o variantes de cualquiera de los anteriores.

Polipéptidos y anticuerpos ilustrativos incluyen Activase® (Alteplase); alirocumab, Aranesp® (Darbepoetina-alfa), Epogen® (Epoetina alfa, o eritropoyetina); Avonex® (Interferón β-Ia); Bexxar® (Tositumomab); Betaseron® (Interferón-

β); bococizumab (anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 denominado L1L3, véase el documento US8080243); Campath® (Alemtuzumab); Dynepo® (Epoetina delta); Velcade® (bortezomib); MLN0002 (mAb anti-α4β7); MLN1202 (mAb antirreceptor de quimiocina CCR2); Enbrel® (etanorcept); Eprex® (Epoetina alfa); Erbitux® (Cetuximab); evolocumab; Genotropin® (Somatropina); Herceptin® (Trastuzumab); Humatrope® (somatropina [origen de ADNr] para inyección); Humira® (Adalimumab); Infergen® (Interferón Alfacon-1); Natrecor® (nesiritide); Kineret® (Anakinra), Leukine® (Sargamostim); LymphoCide® (Epratuzumab); BenlystaTM (Belimumab); Metalyse® (Tenecteplasa); Mircera® (metoxi polietilenglicol-epoetina beta); Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicina); Raptiva® (efalizumab); Cimzia® (certolizumab pegol); SolirisTM (Eculizumab); Pexelizumab (Anticomplemento C5); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (Ranibizumab); Edrecolomab (Panorex®); Trabio® (lerdelimumab); TheraCim hR3 (Nimotuzumab); Omnitarg (Pertuzumab, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (visilizumab); Cantuzumab mertansina (huC242-DMI); NeoRecormon® (Epoetina beta); Neumega® (Oprelvekin); Neulasta® (filgastrim pegilado, G-CSF pegilado, hu-Met-G-CSF pegilado); Neupogen® (Filgrastim); Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3), Procrit® (Epoetina alfa); Remicade® (Infliximab), Reopro® (Abciximab), Actemra® (mAb antirreceptor de IL6), Avastin® (Bevacizumab), HuMax-CD4 (zanolimumab), Rituxan® (Rituximab); Tarceva® (Erlotinib); Roferon-A®-(Interferón alfa-2a); Simulect® (Basiliximab); StelaraTM (Ustekinumab); Prexige® (lumiracoxib); Synagis® (Palivizumab); 146B7-CHO (anticuerpo anti-IL15, véase el documento US7153507), Tysabri® (Natalizumab); Valortim® (MDX-1303, mAb antiantígeno protector de B. antracis); ABthraxTM; Vectibix® (Panitumumab); Xolair® (Omalizumab), ETI211 (mAb anti-MRSA), IL-I Trap (la parte Fc de IgG1 humana y los dominios extracelulares de ambos componentes del receptor de IL-1 (el receptor de tipo I y la proteína accesoria del receptor)), VEGF Trap (dominios de Ig de VEGFR1 fusionados a Fc de IgG1), Zenapax® (Daclizumab); Zenapax® (Daclizumab), Zevalin® (Ibritumomab tiuxetán), Zetia (ezetimibe), Atacicept (TACI-Ig), mAb anti-α4β7 (vedolizumab); galiximab (anticuerpo monoclonal anti-CD80), mAb anti-CD23 (lumiliximab); BR2-Fc (proteína de fusión de huBR3/huFc, antagonista de BAFF soluble); SimponiTM (Golimumab); Mapatumumab (mAb humano antirreceptor-1 de TRAIL); Ocrelizumab (mAb anti-CD20 humana); HuMax-EGFR (zalutumumab); M200 (Volociximab, mAb antiintegrina α5β1); MDX-010 (Ipilimumab, mAb anti-CTLA-4 y VEGFR-1 (IMC-18F1); mAb anti-BR3; mAb antitoxin A y toxin B C de C. difficile MDX-066 (CDA-I) y MDX-1388); conjugados de dsFv anti-CD22 - PE38 (CAT-3888 y CAT-8015); mAb anti-CD25 (HuMax-TAC); anticuerpos anti-TSLP; anticuerpo antirreceptor de TSLP (documento US8101182); anticuerpo anti-TSLP denominado A5 (documento US7982016); (mAb anti-CD3 (NI-0401); Adecatumumab (MT201, mAb anti-EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30, SGN-35 (mAb anti-CD30); MDX-1333 (anti-IFNAR); HuMax CD38 (mAb anti-CD38); mAb anti-CD40L; mAb anti-Cripto; anti-CTGF fibrinógeno de fase I de fibrosis pulmonar idiopática (FG-3019); mAb anti-CTLA4; mAb anti-eotaxinI (CAT-213); mAb anti-FGF8; mAb anti-ganglióside GD2; anticuerpos antiesclerostina (véase el documento US8715663 o US7592429) anticuerpo antiesclerostina denominado Ab-5 (documento US8715663 o US7592429); mAb antiganglióside GM2; mAb anti-GDF-8 humano (MYO-029); mAb antirreceptor de GM-CSF (CAM-3001); mAb anti-HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb anti-IFNa); mAb anti-IGFIR; mAb anti-IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb anti-IL12/IL23p40 (Briakinumab); mAb anti-IL-23p19 (LY2525623); mAb anti-IL13 (CAT-354); mAb anti-IL-17 (AIN457); mAb anti-IL2Ra (HuMax-TAC); mAb antirreceptor de IL5; mAb antirreceptores de integrina (MDX-MDX-OI8, CNTO 95); mAb anti-IPIO colitis ulcerosa (MDX-1100); anticuerpo anti-LLY; BMS-66513; mAb antirreceptor de manosa/hCGβ (MDX-1307); conjugado de dsFv antimesotelina-PE38 (CAT-5001); mAb anti-PDI (MDX-1 106 (ONO-4538)); anticuerpo anti-PDGFRα (IMC-3G3); mAb anti-TGFβ (GC-1008); mAb antirreceptor-2 de TRAIL humano (HGS-ETR2); mAb anti-TWEAK; mAb anti-VEGFR/Flt-1; mAb anti-ZP3 (HuMax-ZP3); anticuerpo NVS n.º 1; anticuerpo NVS n.º 2; y un anticuerpo monoclonal amiloide-beta que comprende secuencias, SEQ ID N.º 8 y SEQ ID N.º 6 (Documento US7906625).

Ejemplos de anticuerpos adecuados para los métodos y formulaciones farmacéuticas incluyen los anticuerpos que se muestran en la Tabla 1. Otros ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen infliximab, bevacizumab, cetuximab, ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, altinumab, atlizumab, atorolimiumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavituximab, bectumomab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatuzumab, mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotín, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, caplacizumab, capromab pendetide, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatuzumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetán, conatumumab, crenezumab, cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, dorlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecromeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, elotuzumab, elsilimomab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab cituxetán, epratuzumab, erenumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimomab, gemtuzumab ozogamicina, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab vedotín, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansina, infliximab, intetumumab, inolimomab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lorvotuzumab mertansine, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab,

nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentán, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimomab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pemtumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponezumab, priliximab, pritumumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, siplizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab tetraxetán, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimomab aritox, tenatumomab, tefibazumab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, tezepelumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07, tregalizumab, tucotuzumab celmoleucina, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab mafodotín, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, zolimomab aritox.

Los anticuerpos también incluyen adalimumab, bevacizumab, blinatumomab, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, erenumab, evolocumab, infliximab, natalizumab, panitumumab, rilotumumab, rituximab, romosozumab, tezepelumab y trastuzumab, y anticuerpos seleccionados de la tabla 1.

Diana (nombre informal)	**Conc. (mg/ml)**	**Viscosidad (cP)**	**Tipo de HC(incluyendo alotipos)**	**Tipo de LC**	**pI**	**LC SEQ ID N.º**	**HC SEQ ID N.º**
antiamiloide	142,2	5,0	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	9,0	1	2
GMCSF (247)	139,7	5,6	IgG2	Kappa	8,7	3	4
CGRPR	136,6	6,3	IgG2	Lambda	8,6	5	6
RANKL	152,7	6,6	IgG2	Kappa	8,6	7	8
Esclerostina (27H6)	145,0	6,7	IgG2	Kappa	6,6	9	10
IL-1R1	153,9	6,7	IgG2	Kappa	7,4	11	12
Miostatina	141,0	6,8	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,7	13	14
B7RP1	137,5	7,7	IgG2	Kappa	7,7	15	16
Amiloide	140,6	8,2	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,7	17	18
GMCSF (3,112)	156,0	8,2	IgG2	Kappa	8,8	19	20
CGRP (32H7)	159,5	8,3	IgG2	Kappa	8,7	21	22
CGRP (3B6.2)	161,1	8,4	IgG2	Lambda	8,6	23	24
PCSK9 (8A3.1)	150,0	9,1	IgG2	Kappa	6,7	25	26
PCSK9 (492)	150,0	9,2	IgG2	Kappa	6,9	27	28
CGRP	155,2	9,6	IgG2	Lambda	8,8	29	30
Hepcidina	147,1	9,9	IgG2	Lambda	7,3	31	32
TNFR (p55)	157,0	10,0	IgG2	Kappa	8,2	33	34
OX40L	144,5	10,0	IgG2	Kappa	8,7	35	36
HGF	155,8	10,6	IgG2	Kappa	8,1	37	38
GMCSF	162,5	11,0	IgG2	Kappa	8,1	39	40
Glucagón R	146,0	12,1	IgG2	Kappa	8,4	41	42
GMCSF (4,381)	144,5	12,1	IgG2	Kappa	8,4	43	44
Esclerostina (13F3)	155,0	12,1	IgG2	Kappa	7,8	45	46
CD-22	143,7	12,2	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	47	48
INFgR	154,2	12,2	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,8	49	50
Ang2	151,5	12,4	IgG2	Kappa	7,4	51	52

Diana (nombre informal)	Conc. (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Tipo de HC(incluyendo alotipos)	Tipo de LC	pI	LC SEQ ID N.º	HC SEQ ID N.º
TRAILR2	158,3	12,5	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,7	53	54
EGFR	141,7	14,0	IgG2	Kappa	6,8	55	56
IL-4R	145,8	15,2	IgG2	Kappa	8,6	57	58
IL-15	149,0	16,3	IgG1 (f) (R;EM)	Kappa	8,8	59	60
IGF1R	159,2	17,3	IgG1 (za) (K;DL)	Kappa	8,6	61	62
IL-17R	150,9	19,1	IgG2	Kappa	8,6	63	64
Dkk1 (6.37.5)	159,4	19,6	IgG2	Kappa	8,2	65	66
Esclerostina	134,8	20,9	IgG2	Kappa	7,4	67	68
TSLP	134,2	21,4	IgG2	Lambda	7,2	69	70
Dkk1 (11H10)	145,3	22,5	IgG2	Kappa	8,2	71	72
PCSK9	145,2	22,8	IgG2	Lambda	8,1	73	74
GIPR (2G10.006)	150,0	23,0	IgG1 (z) (K;EM)	Kappa	8,1	75	76
Activina	133,9	29,4	IgG2	Lambda	7,0	77	78
Esclerostina (2B8)	150,0	30,0	IgG2	Lambda	6,7	79	80
Esclerostina	141,4	30,4	IgG2	Kappa	6,8	81	82
c-fms	146,9	32,1	IgG2	Kappa	6,6	83	84
α4β7	154,9	32,7	IgG2	Kappa	6,5	85	86

* Una concentración de ejemplo adecuada para su administración al paciente; ^cadena pesada del anticuerpo HC; cadena ligera del anticuerpo LC.

Basándose en la descripción anterior, se debe apreciar que los dispositivos, sistemas y métodos descritos en el presente documento facilitan la preparación automática (o sustancialmente automática) de una muestra de un producto que contiene moléculas para análisis y la modalidad automática (o sustancialmente automática) de un ensayo de esa muestra. Como se usa en el presente documento, "automático" tiene su significado ordinario y habitual como lo entendería un experto en la materia en vista de esta descripción. Se refiere a realizar un proceso sin intervención humana durante el proceso. Un proceso automático puede ser realizado por una o más máquinas. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente automático" tiene su significado ordinario y habitual como lo entendería un experto en la materia en vista de esta descripción. Se refiere a realizar un proceso en el que se realizan más etapas activas sin intervención humana que con intervención humana. Si la información numérica adicional es de interés, un proceso en el que al menos el 51 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las etapas del proceso se realizan sin intervención humana puede considerarse "sustancialmente automático". Por ejemplo, un proceso que se ejecuta durante un día e implica entre 0,5 y 1 hora de "tiempo de personal" durante el día puede considerarse sustancialmente automático. Como se usa en el presente documento, "continuo" tiene su significado ordinario y habitual como lo entendería un experto en la materia en vista de esta descripción. Se refiere a realizar al menos dos ciclos de un proceso sin interrupción. Los al menos dos ciclos pueden ser en serie (por ejemplo, realizados uno después del otro), o pueden superponerse. Por tanto, la preparación y el análisis se pueden realizar sustancialmente en tiempo real. En otras palabras, todo el proceso se puede realizar mucho más rápidamente de lo que permiten actualmente los procesos convencionales.

Además, el solicitante ha descubierto que los ensayos realizados utilizando los sistemas y métodos descritos en el presente documento producen resultados que son comparables a los resultados obtenidos mediante ensayos realizados utilizando técnicas convencionales, validando así la eficacia de los sistemas y los métodos descritos en el presente documento. En particular, el solicitante realizó tres ensayos diferentes: un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), un ensayo de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y un ensayo de electroforesis capilar reducida (rCE), con cada una de 9 moléculas diferentes: moléculas mAb1, mAb2, mAb3, BiTE1, BiTE2, Bi-específica 1, Fusion, Bi-específica 2 y xmAb - usando tanto los sistemas como los métodos descritos en el presente documento y una técnica convencional. Si bien existen varias técnicas convencionales para la purificación por afinidad de muestras (por ejemplo, PhyNexus PhyTips, placas GE PreDictor, muestreador automático Hamilton Leap y Tecan-Atoll), en este ejemplo se usó la purificación Tecan-Atoll como técnica convencional. Se cree que es representativo de las técnicas convencionales. Como se ilustra en la Figura 20, el solicitante ha descubierto que los resultados de 25 de los 27 ensayos diferentes eran comparables a los resultados de los mismos 27 ensayos realizados utilizando la técnica convencional, como lo demuestran las 25 marcas de verificación diferentes. Los dos ensayos restantes no se pudieron

comparar porque los resultados de la técnica convencional no estaban disponibles. Como se usa en el presente documento, "comparable" tiene su significado ordinario y habitual como lo entendería un experto en la materia en vista de esta descripción. Por ejemplo, se ha observado en el presente documento que los máximos principales producidos por los diferentes ensayos realizados mediante los sistemas y métodos descritos estaban dentro del 5% de los máximos principales producidos por los diferentes ensayos realizados usando la técnica convencional, lo que se entendería que produce resultados "comparables" con la técnica convencional.

Las Figuras 21 y 22 ilustran gráficamente algunos de los resultados que respaldan las conclusiones del Solicitante. En particular, las Figuras 21 y 22 ilustran gráficamente los resultados del ensayo rCE realizado con la molécula Bi-específica 1 usando los sistemas y métodos descritos en el presente documento y usando la técnica convencional, respectivamente. Como se ilustra, el ensayo de rCE realizado con la molécula Bi-específica 1 usando los sistemas y métodos descritos en el presente documento produjo un valor A máximo igual a 15,450 y un valor B máximo igual a 19,658, mientras que el ensayo de rCE realizado con la molécula Bi-específica 1 usando la técnica convencional produjo un valor A máximo igual a 15,183 y un valor B máximo igual a 19,458.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende las etapas de:

(a) mover automáticamente una muestra que comprende moléculas de un primer vial a un bucle de muestra;
(b) mover un volumen de la muestra del bucle de muestra a una primera válvula multipuerto (104);
(c) mover el volumen de la muestra de la primera válvula multipuerto a una segunda válvula multipuerto (112) acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto;
(d) cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición, mover el volumen de la muestra de la segunda válvula multipuerto a una columna de captura;
(e) capturar las moléculas de la muestra en la columna de captura, separando así las moléculas de la muestra de una matriz de la muestra;
(f) mover una solución tampón de elución de una fuente de tampón a la columna de captura, eluyendo así las moléculas capturadas por la columna de captura y mover una mezcla de elución/molécula que comprende la solución tampón de elución y las moléculas eluidas a un segundo vial dispuesto aguas abajo de la columna de captura, comprendiendo el segundo vial un vial de flujo continuo (1600); y
(g) mover automáticamente las moléculas en el segundo vial a un dispositivo analítico para el análisis de las moléculas.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además, después de (f) y antes de (g), diluir las moléculas eluidas en el segundo vial para reducir la concentración de sal de las moléculas; y/o
después de (f) y antes de (g):

mover la segunda válvula multipuerto a una segunda posición diferente de la primera posición; y
cuando la segunda válvula multipuerto está en la segunda posición, mover las moléculas eluidas a una columna de desalación a través de la primera válvula multipuerto y la segunda válvula multipuerto, y aplicar las moléculas eluidas a la columna de desalación, reduciendo así la concentración de sal.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además, después de (f) y antes de (g),

añadir un reactivo de extinción a las moléculas eluidas en el segundo vial;
mover el reactivo de extinción y las moléculas eluidas desde el segundo vial a un serpentín de reacción;
incubar las moléculas eluidas con el reactivo de extinción en el serpentín de reacción, inactivando así las moléculas; y
mover las moléculas inactivas desde el serpentín de reacción al segundo vial.

4. El método de la reivindicación 1, en donde (g) comprende:

añadir un reactivo desnaturalizante y un reactivo reductor al segundo vial;
mover las moléculas eluidas, el reactivo desnaturalizante y el reactivo reductor desde el segundo vial a un primer serpentín de reacción a través de la primera válvula multipuerto;
incubar las moléculas eluidas con el reactivo desnaturalizante y el reactivo reductor en el serpentín de reacción, lo que da como resultado moléculas desnaturalizadas y reducidas;
mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas a un tercer vial, comprendiendo también el tercer vial un vial de flujo continuo; y
mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas en el tercer vial al dispositivo analítico;
comprendiendo además el método, antes de mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas en el tercer vial al dispositivo analítico:
añadir un reactivo alquilante al tercer vial;
mover las moléculas desnaturalizadas y reducidas y el reactivo alquilante del tercer vial al primer serpentín de reacción a través de la primera válvula multipuerto;
incubar las moléculas desnaturalizadas y reducidas con el reactivo alquilante en el primer serpentín de reacción, alquilando así las moléculas desnaturalizadas y reducidas;
mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas del primer serpentín de reacción al segundo vial;
mover las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas a una columna de desalación a través de la primera válvula multipuerto y la segunda válvula multipuerto;
aplicar las moléculas desnaturalizadas, reducidas y alquiladas a la columna de desalación, lo que da como resultado moléculas desaladas;
mover las moléculas desaladas al segundo vial;
combinar las moléculas desaladas con una enzima;
mover las moléculas desaladas y la enzima a un segundo serpentín de reacción;
incubar las moléculas desaladas y la enzima en el segundo serpentín de reacción, digiriendo así las moléculas;
mover las moléculas digeridas al tercer vial; y
mover las moléculas digeridas del tercer vial al dispositivo analítico para el análisis de las moléculas digeridas.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos uno de:

(a) comprende mover automáticamente, con una aguja, la muestra del primer vial al bucle de muestra;
(g) comprende mover automáticamente las moléculas en el segundo vial al dispositivo analítico para que el análisis de las moléculas de uno o más de (a) a (g) se realice automáticamente usando un controlador; o
(a) a (g) se realizan en un sistema cerrado.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las moléculas comprenden polipéptidos, en donde la columna de captura comprende una columna de unión a polipéptidos, y en donde (e) comprende unir los polipéptidos en la muestra a la columna de unión a polipéptidos, separando así los polipéptidos en la muestra de la matriz de la muestra.

7. Un sistema cerrado (100) que comprende:

un primer vial adaptado para contener una muestra que comprende moléculas;
un bucle de muestra adaptado para recibir la muestra del primer vial;
una primera válvula multipuerto (104) acoplada fluidamente al bucle de muestra y dispuesta para obtener un volumen de la muestra a través de un primer puerto de la primera válvula multipuerto;
una segunda válvula multipuerto (112) acoplada fluidamente y dispuesta aguas abajo de la primera válvula multipuerto;
una columna de captura dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una primera posición, estando la columna de captura configurada para unir las moléculas de la muestra;
un segundo vial dispuesto aguas abajo de la columna de captura;
una fuente de tampón acoplada fluidamente a la primera válvula multipuerto y dispuesta para suministrar solución tampón de elución al segundo vial a través de la segunda válvula multipuerto y la columna de captura cuando la segunda válvula multipuerto está en la primera posición, de modo que la solución tampón de elución esté adaptada para eluir sustancialmente todas las moléculas de la columna de captura;
un dispositivo analítico; y
un sistema de muestreo automático configurado para obtener la muestra del primer vial;
en donde:
el segundo vial comprende un vial de flujo continuo (1600) configurado para filtrar la solución tampón de elución de la mezcla de elución/molécula fuera del segundo vial, dejando así solo las moléculas eluidas en el segundo vial; y
el sistema está configurado para mover automáticamente las moléculas del segundo vial desde el segundo vial al dispositivo analítico.

8. El sistema cerrado de la reivindicación 7, que comprende además una aguja configurada para recuperar automáticamente la muestra del primer vial y depositar la muestra en el bucle de muestra y/o para mover automáticamente las moléculas en el segundo vial del segundo vial al dispositivo analítico.

9. El sistema cerrado de la reivindicación 7 u 8, que comprende además un dispositivo dosificador acoplado fluidamente al bucle de muestra y la aguja para controlar el volumen de la muestra obtenida por la primera válvula multipuerto.

10. El sistema cerrado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la columna de captura comprende una columna de unión a polipéptidos; opcionalmente, en donde la columna de unión a polipéptidos está configurada además para preconcentrar los polipéptidos.

11. El sistema cerrado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además una columna de desalación dispuesta para acoplarse fluidamente a la segunda válvula multipuerto cuando la segunda válvula multipuerto está en una segunda posición diferente de la primera posición, en donde cuando la segunda válvula multipuerto está en la segunda posición, la columna de desalación está dispuesta para recibir los polipéptidos eluidos en el segundo vial y configurada para reducir la concentración de sal de los polipéptidos eluidos.

12. El sistema cerrado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el vial de flujo (1600) comprende una base (1604), un canalón (1608) acoplado a la base y que se extiende hacia fuera desde la misma, un puerto de entrada (1660) formado en la base y un puerto de salida (1664) formado en el canalón;
opcionalmente, en donde el vial de flujo continuo comprende además un reborde (1606) dispuesto entre la base y el canalón, estando el reborde configurado para reducir la tensión superficial del fluido que fluye a través del vial de flujo continuo.

13. El sistema cerrado de la reivindicación 12, en donde el puerto de entrada se extiende a lo largo de un eje de entrada y el puerto de salida se extiende a lo largo de un eje de salida, estando el eje de salida inclinado con respecto al eje de entrada;
opcionalmente, en donde, la base se extiende a lo largo de un eje longitudinal que está inclinado con respecto a cada uno de los ejes de entrada y de salida.

14. El sistema cerrado de la reivindicación 12 o 13, en donde el canalón comprende un bajante (1644), y en donde el puerto de salida está formado en el bajante.

15. El sistema cerrado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que comprende además un portaviales configurado para recibir y retener el vial de flujo continuo;
opcionalmente, en donde el portaviales comprende una pluralidad de receptáculos configurados para recibir y retener una pluralidad de viales de flujo continuo.

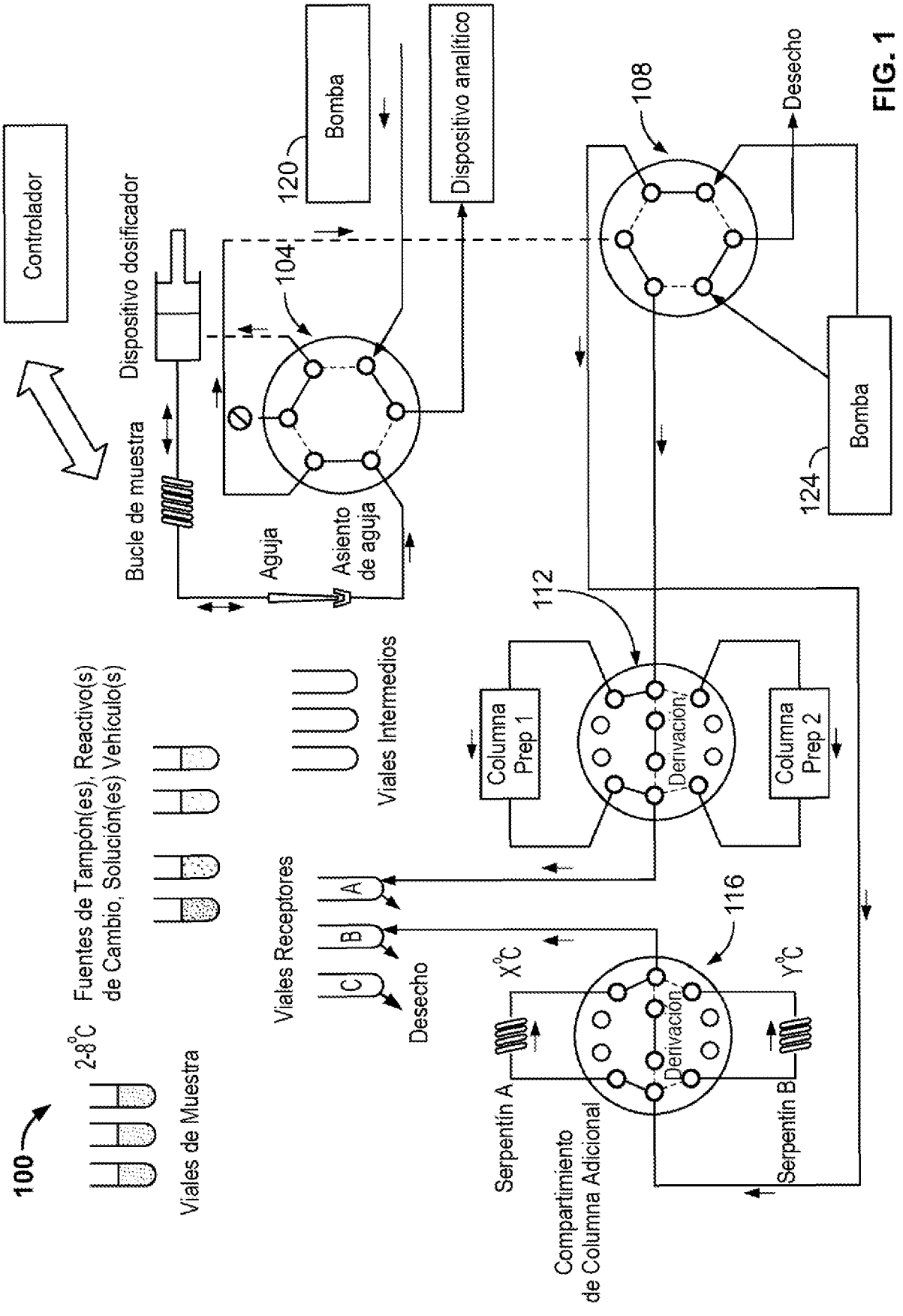

100
Viales de Muestra
2-8°C
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Viales Receptores
A
B
C
Desecho
Viales Intermedios
Controlador
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
124
Bomba
112
Columna Prep 1
Derivación
Columna Prep 2
116
X°C
Y°C
Derivación
Serpentín A
Serpentín B
Compartimiento de Columna Adicional

FIG. 1

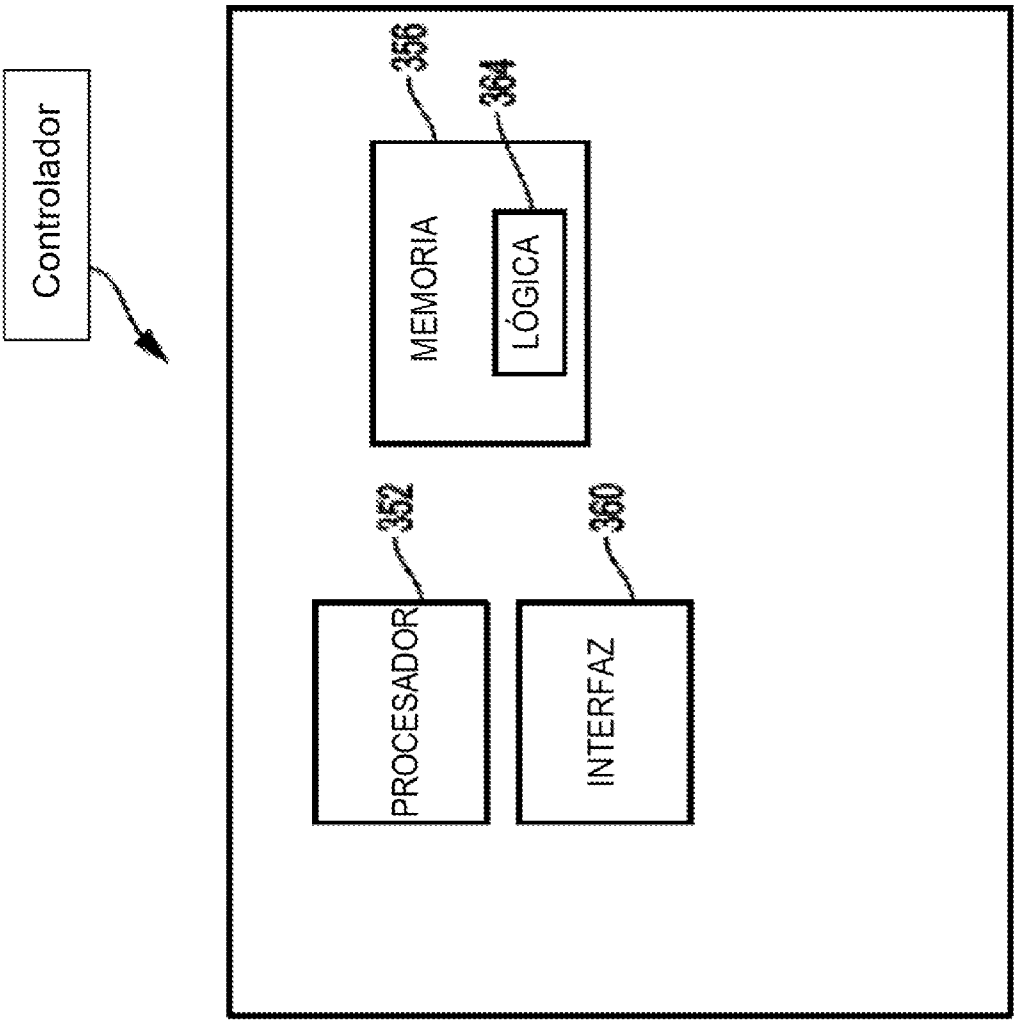

Controlador
356
354
MEMORIA
LÓGICA
352
360
PROCESADOR
INTERFAZ

FIG. 2

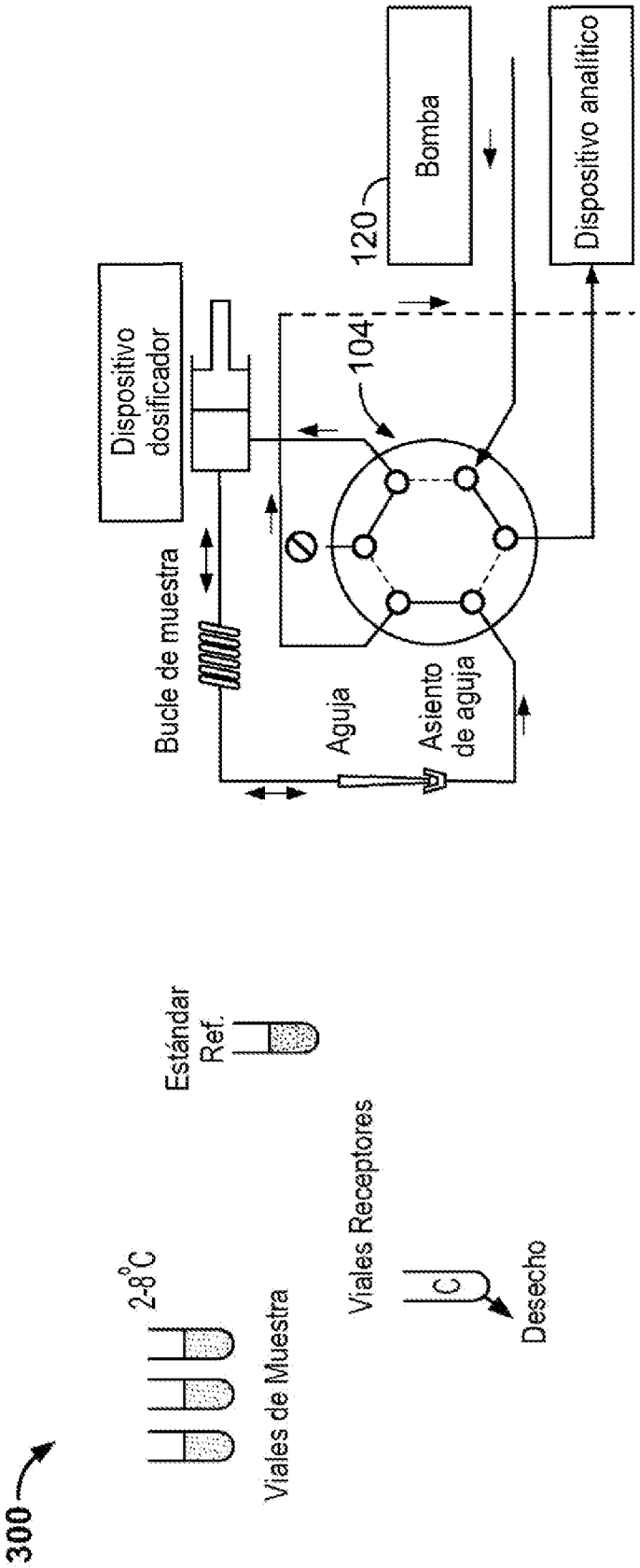

300
2-8°C
Viales de Muestra
Estándar
Ref.
Viales Receptores
C
Desecho
Dispositivo
dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento
de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico

FIG. 3

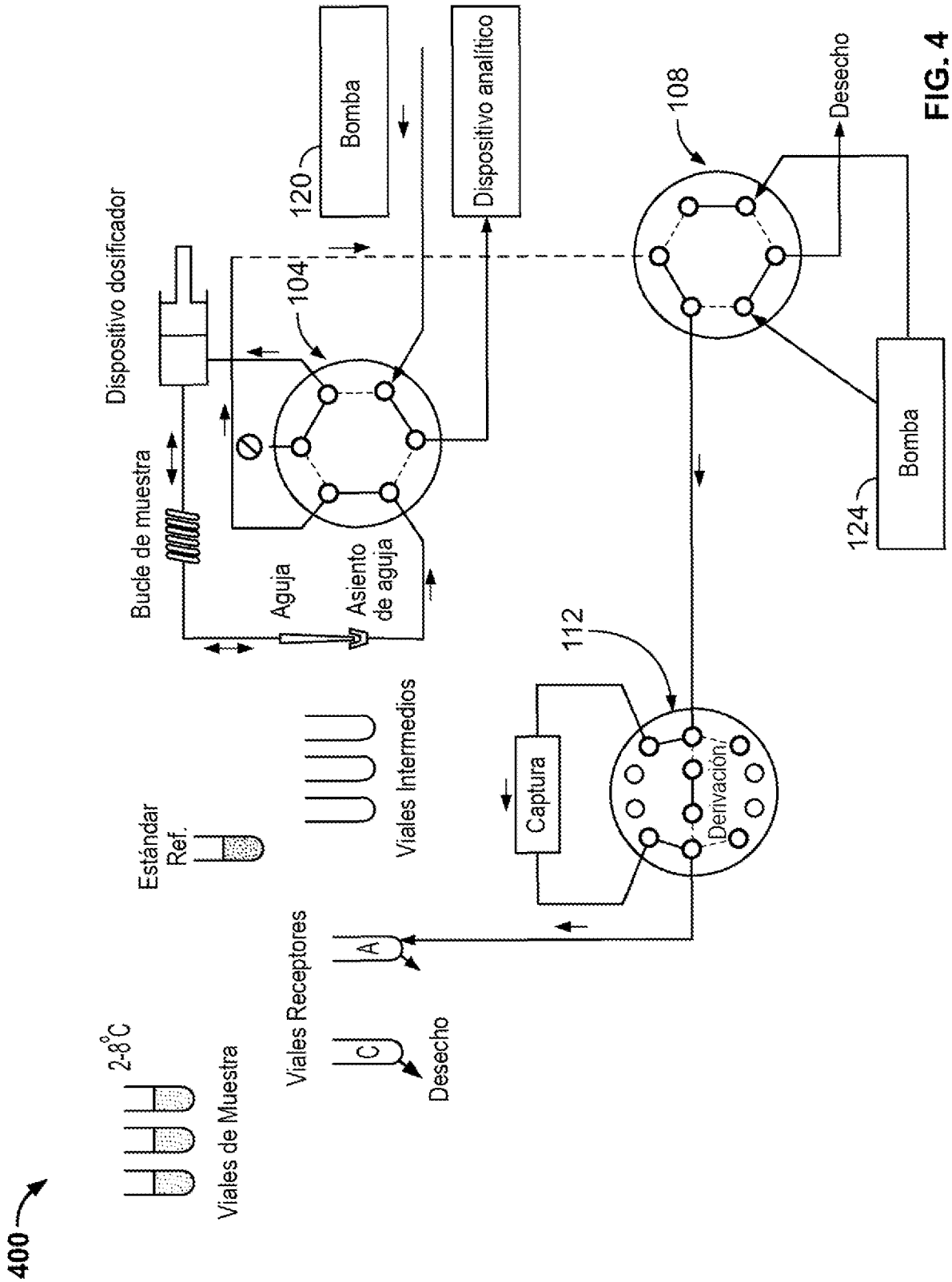

400
2-8°C
Viales de Muestra
Viales Receptores
A
C
Desecho
Estándar Ref.
Viales Intermedios
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
112
Captura
Derivación/
108
Desecho
124
Bomba

FIG. 4

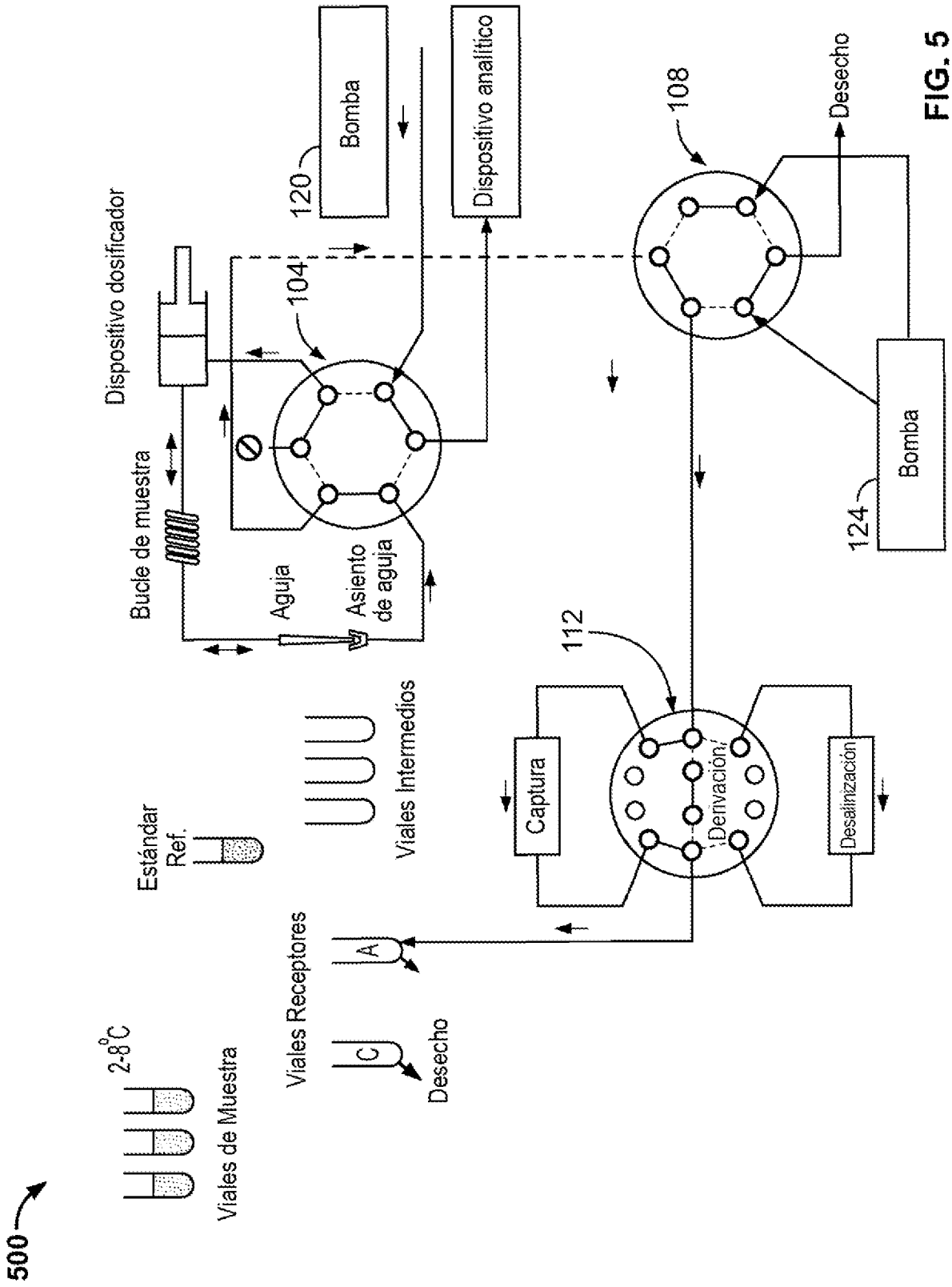

500
Viales de Muestra
2-8°C
Viales Receptores
A
C
Desecho
Estándar Ref.
Viales Intermedios
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
Dispositivo dosificador
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
112
Captura
Derivación/
Desalinización
124
Bomba

FIG. 5

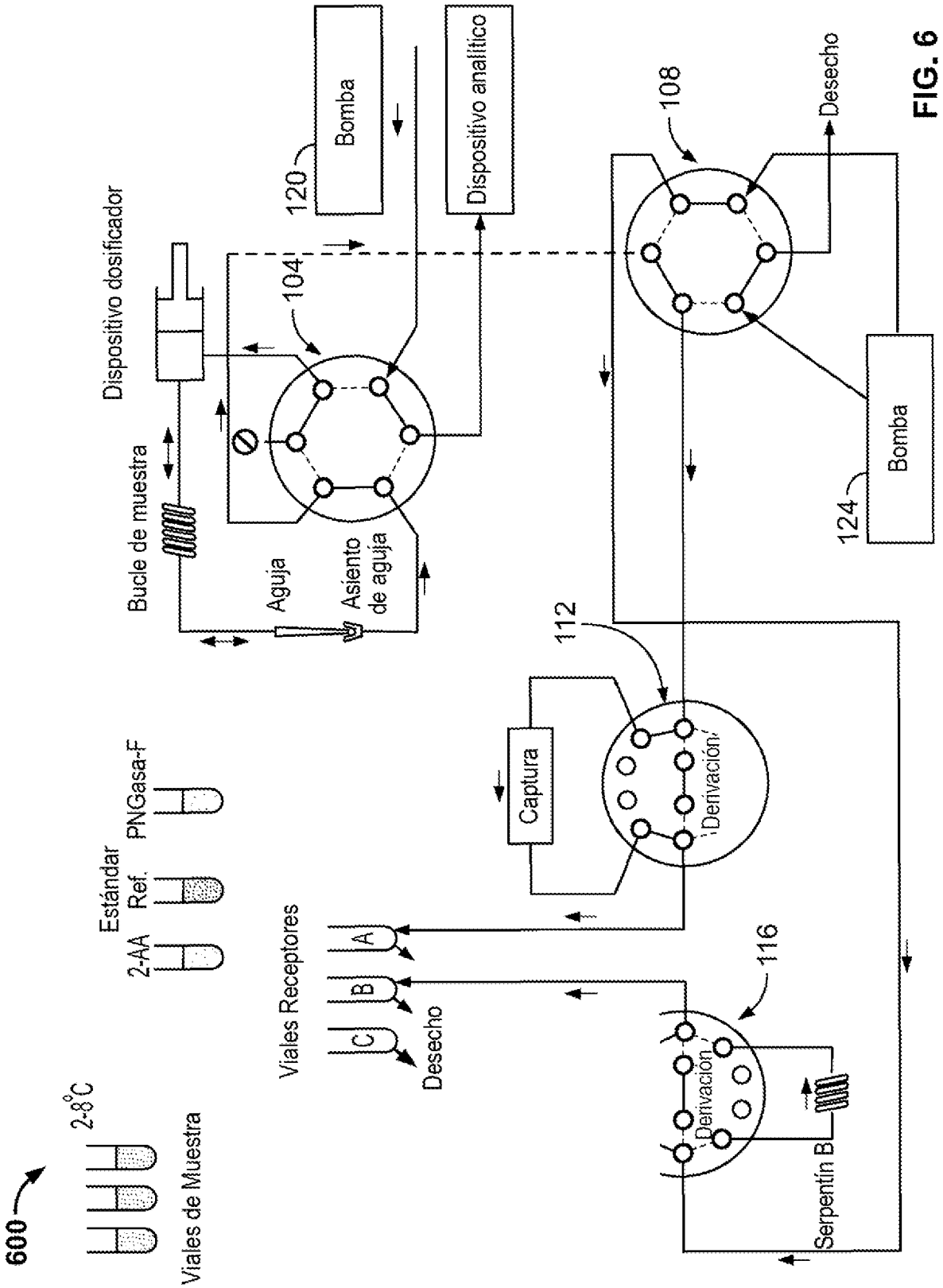

600
2-8°C
Viales de Muestra
Estándar
2-AA
Ref.
PNGasa-F
Viales Receptores
A
B
C
Desecho
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
124
Bomba
112
Captura
Derivación
116
Derivación
Serpentín B

FIG. 6

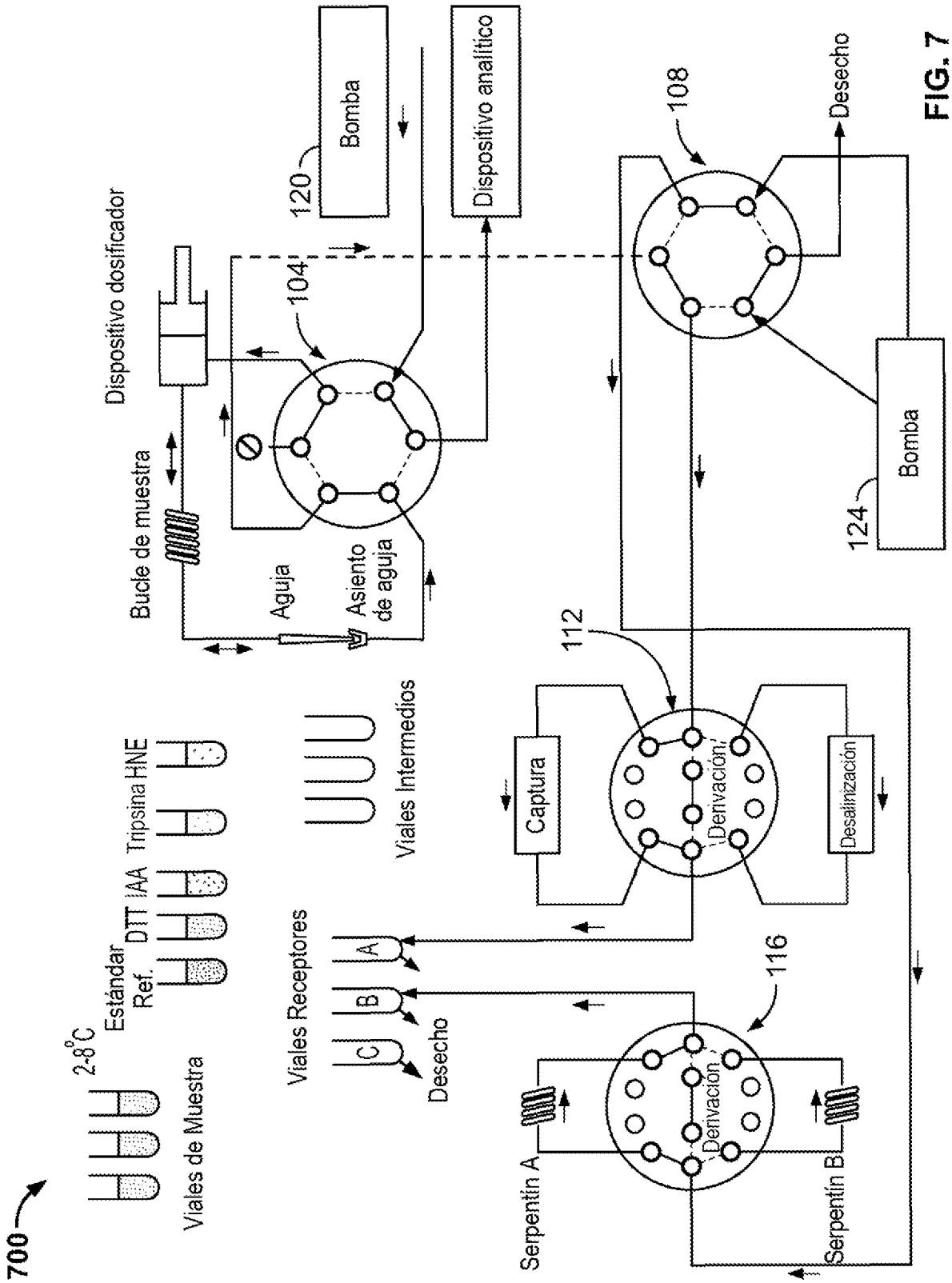

700
Viales de Muestra
2-8°C
Estándar Ref.
DTT
IAA
Tripsina
HNE
Viales Receptores
A
B
C
Desecho
Viales Intermedios
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
112
Captura
Derivación
Desalinización
116
Derivación
Serpentín A
Serpentín B
124
Bomba

FIG. 7

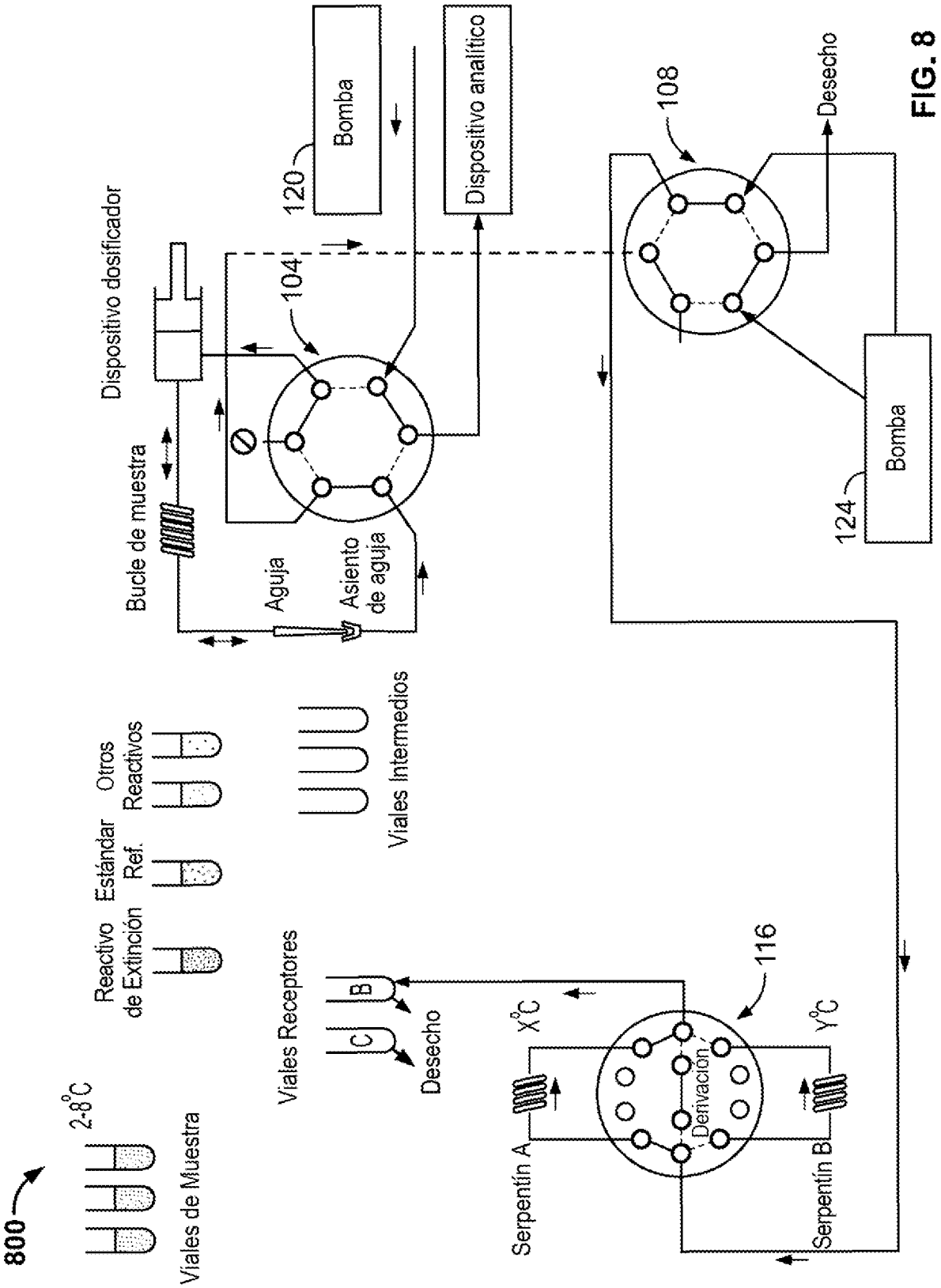

800
2-8°C
Viales de Muestra
Reactivo de Extinción
Estándar Ref.
Otros Reactivos
Viales Receptores
B
C
Desecho
Viales Intermedios
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
124
Bomba
116
X°C
Y°C
Derivación
Serpentín A
Serpentín B

FIG. 8

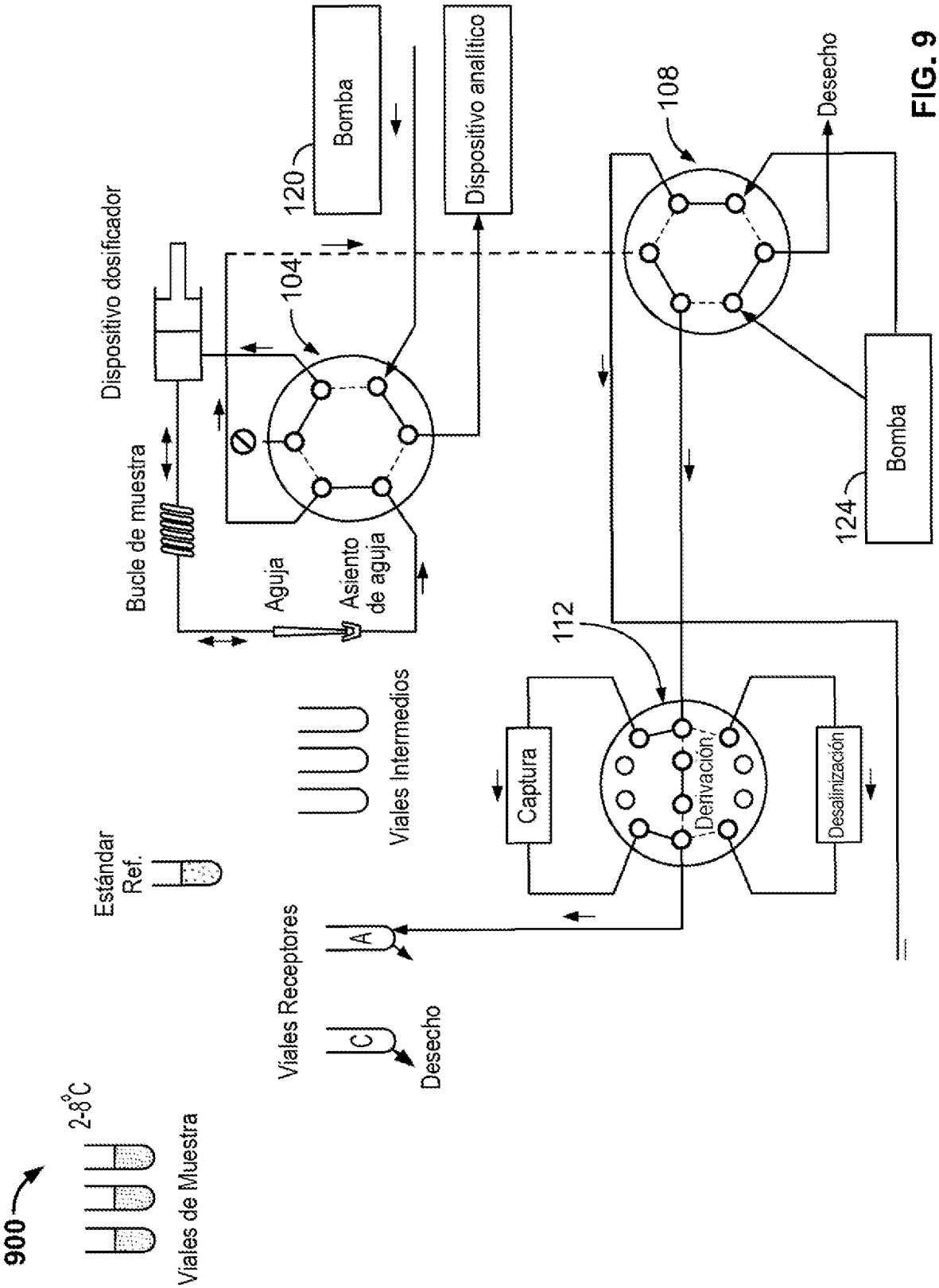

900
2-8°C
Viales de Muestra
Estándar Ref.
Viales Receptores
A
C
Desecho
Viales Intermedios
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
104
120
Bomba
Dispositivo analítico
108
Desecho
112
Captura
Derivación/ Elución
Desalinización
124
Bomba

FIG. 9

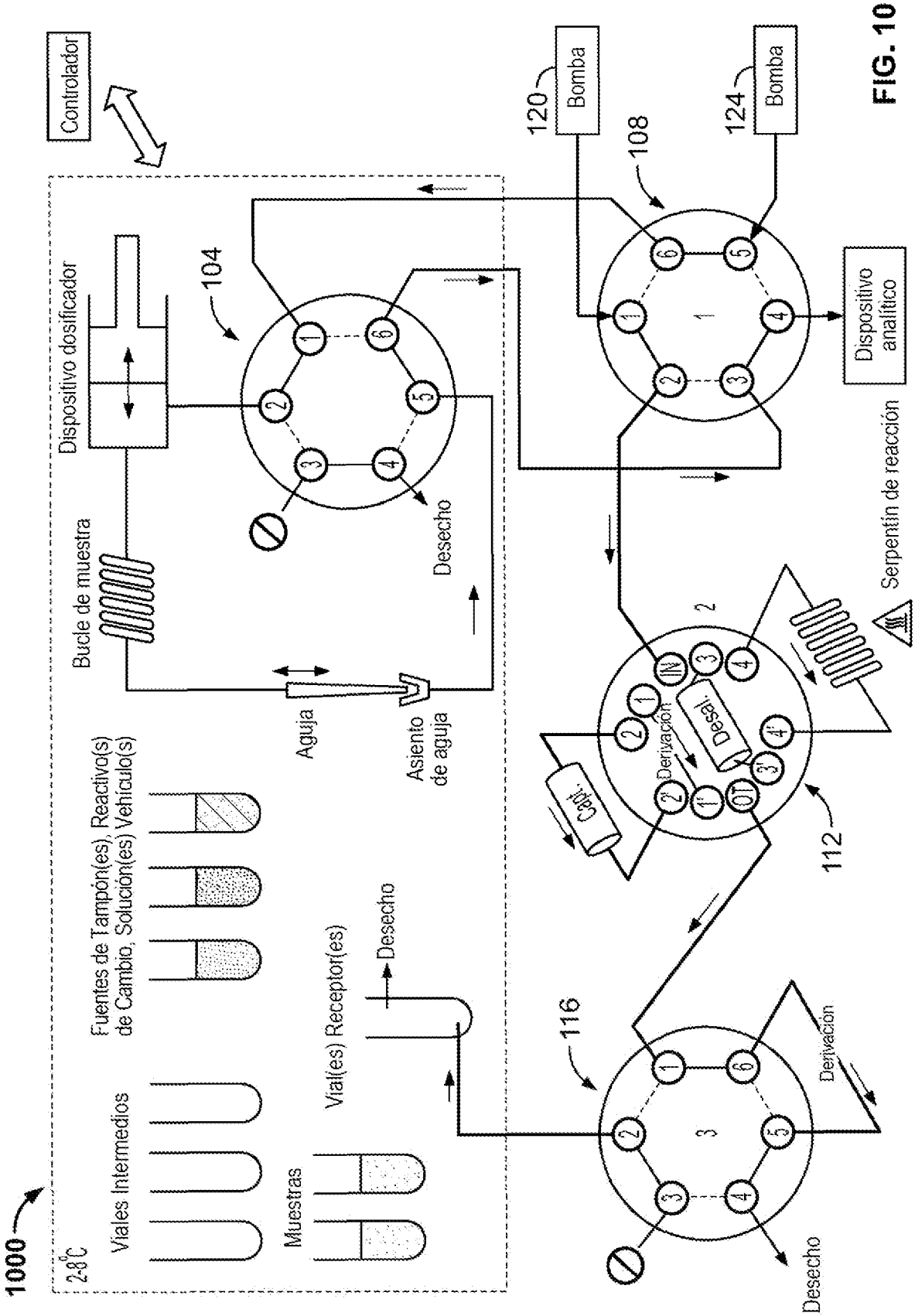

1000
2-8°C
Controlador
Dispositivo dosificador
104
Bucle de muestra
Aguja
Asiento de aguja
Desecho
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Viales Intermedios
Muestras
Vial(es) Receptor(es)
Desecho
120
Bomba
124
Bomba
108
Dispositivo analítico
Serpentín de reacción
Cebd.
Derivación
Desal.
112
116
Derivación
Desecho

FIG. 10

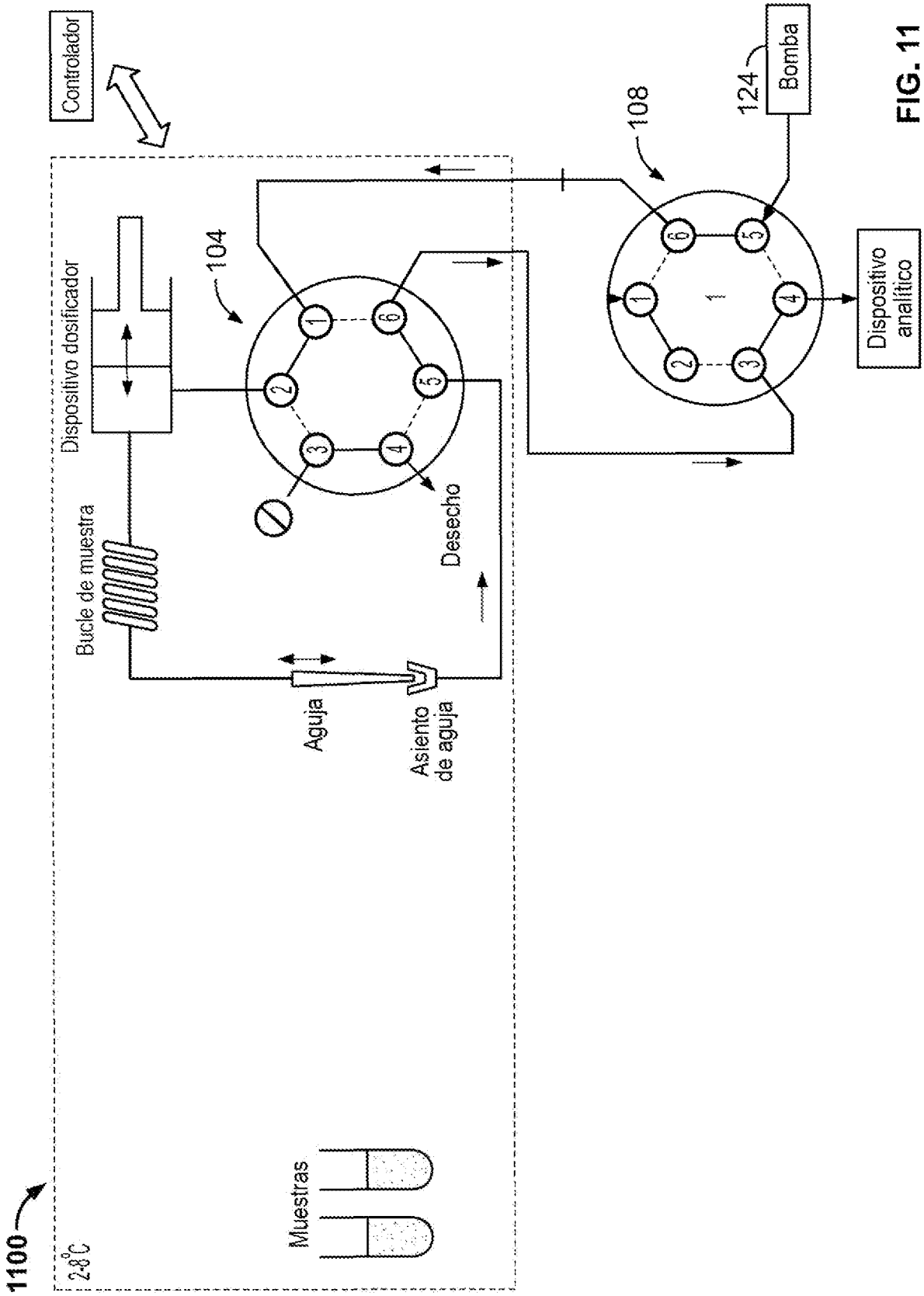

1100
2-8°C
Controlador
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Muestras
104
Aguja
Asiento de aguja
Desecho
108
124
Bomba
Dispositivo analítico

FIG. 11

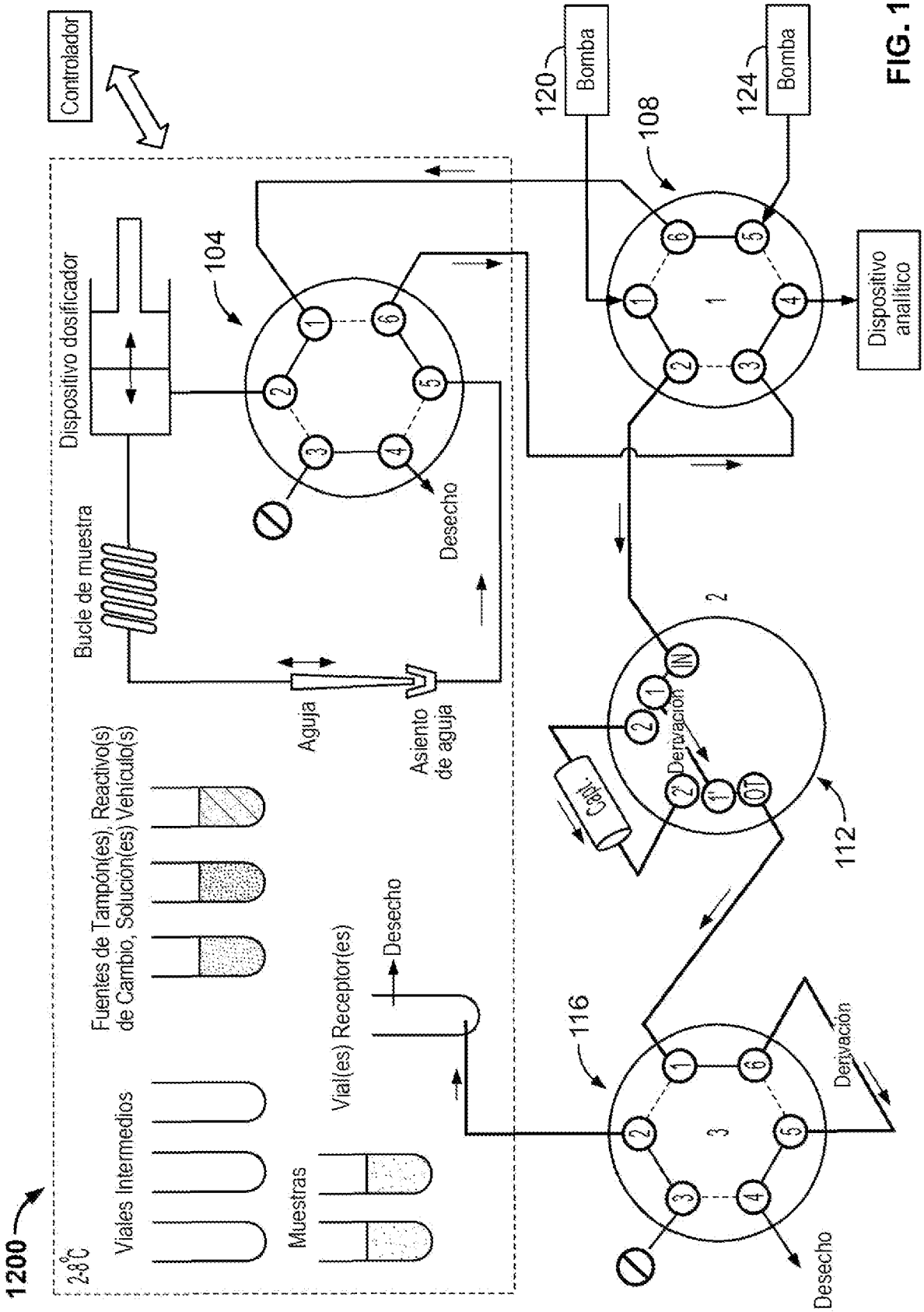

1200
28°C
Viales Intermedios
Muestras
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Vial(es) Receptor(es)
Desecho
Aguja
Asiento de aguja
Bucle de muestra
Dispositivo dosificador
104
Desecho
Controlador
120
Bomba
124
Bomba
108
Dispositivo analítico
Derivación
112
116
Derivación
Desecho

FIG. 12

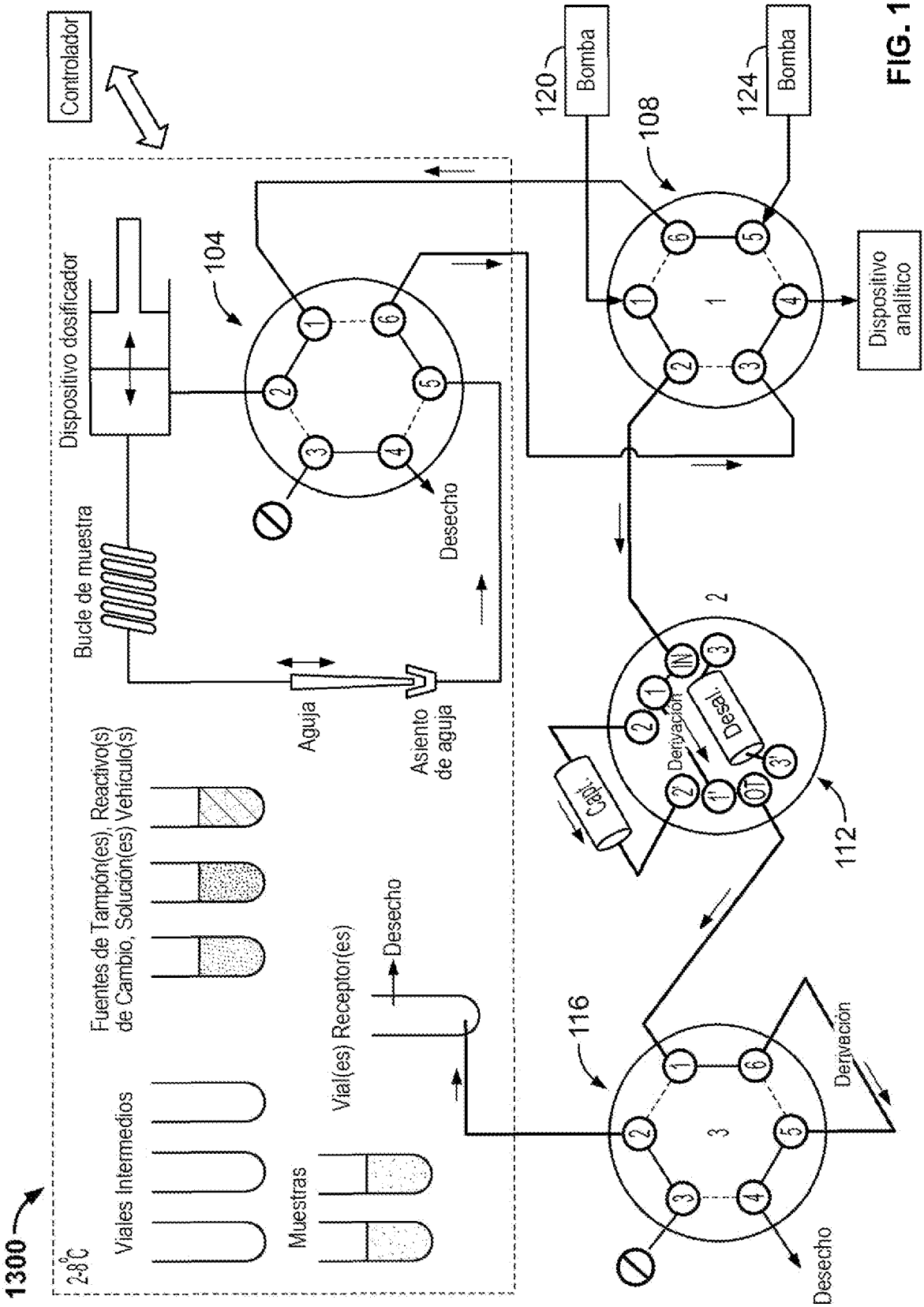

1300
2-8°C
Viales intermedios
Muestras
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Vial(es) Receptor(es)
Desecho
Aguja
Asiento de aguja
Bucle de muestra
Dispositivo dosificador
104
Desecho
Controlador
120
Bomba
124
Bomba
108
Dispositivo analítico
Cal.
Derivación
Desal.
112
116
Derivación
Desecho

FIG. 13

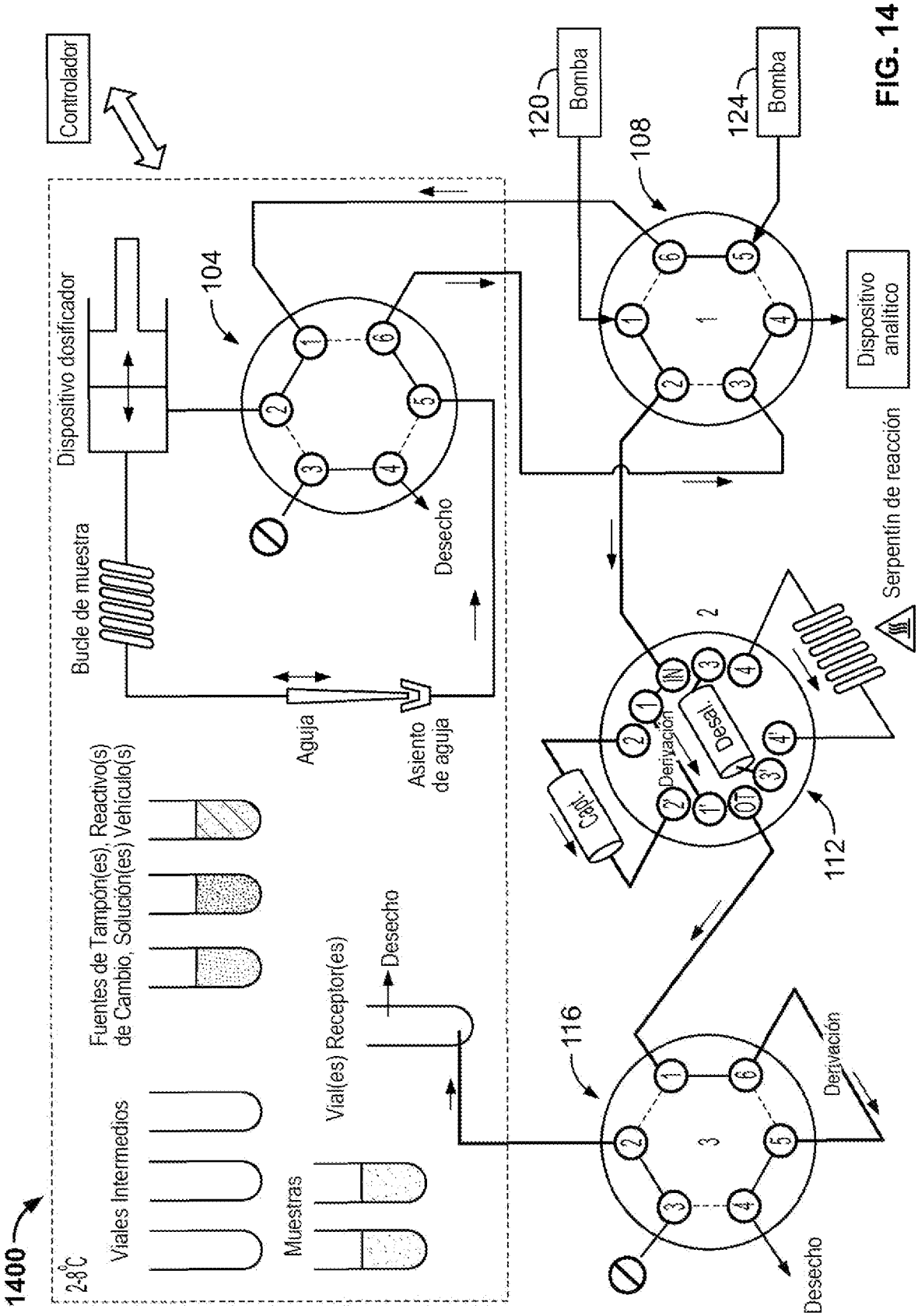

1400
2-8°C
Controlador
Dispositivo dosificador
Bucle de muestra
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Viales Intermedios
Muestras
Vial(es) Receptor(es)
Desecho
Aguja
Asiento de aguja
104
Desecho
120
Bomba
124
Bomba
108
Dispositivo analítico
Serpentín de reacción
112
Derivación
Desgl.
Carg.
116
Derivación
Desecho

FIG. 14

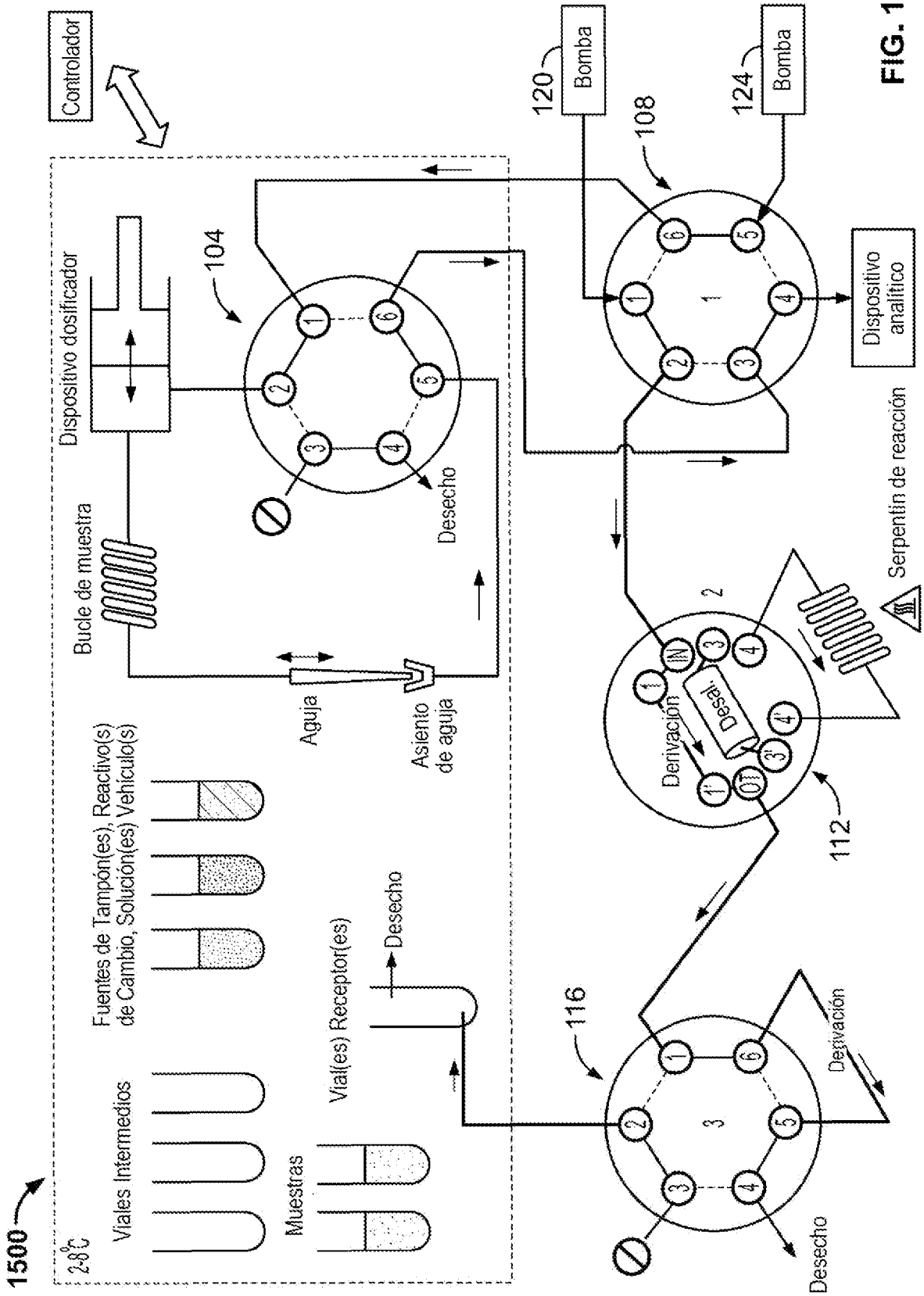

1500
2-8°C
Viales Intermedios
Muestras
Fuentes de Tampón(es), Reactivo(s) de Cambio, Solución(es) Vehículo(s)
Vial(es) Receptor(es)
Desecho
Bucle de muestra
Dispositivo dosificador
Aguja
Asiento de aguja
104
Desecho
Controlador
120
Bomba
124
Bomba
108
Dispositivo analítico
Serpentín de reacción
Derivación
Desal
112
116
Derivación
Desecho

FIG. 15

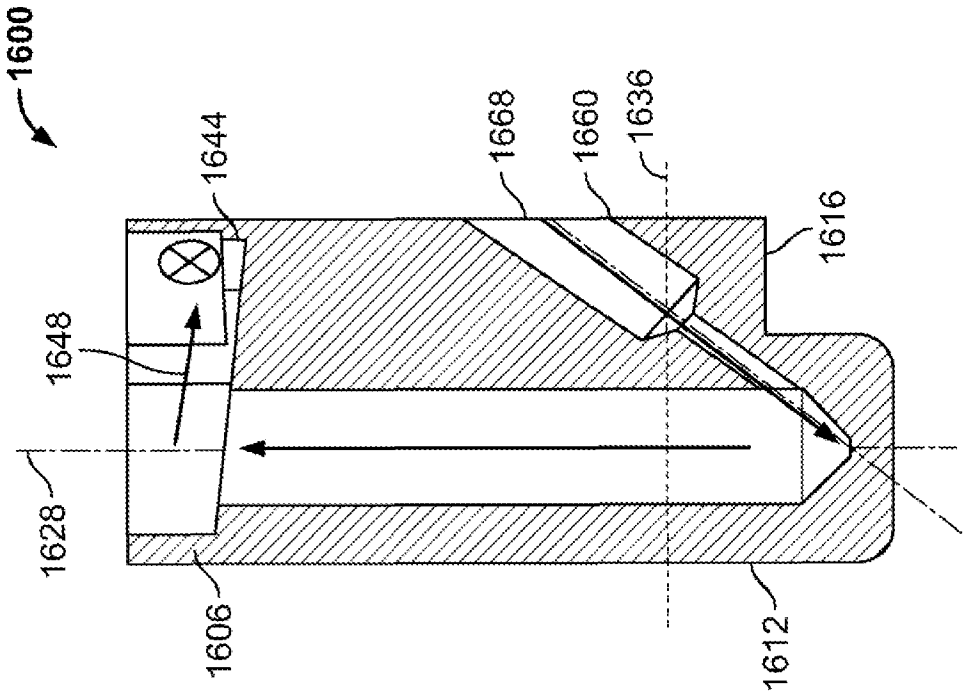

1600
1644
1668
1660
1636
1616
1648
1628
1606
1612

FIG. 17

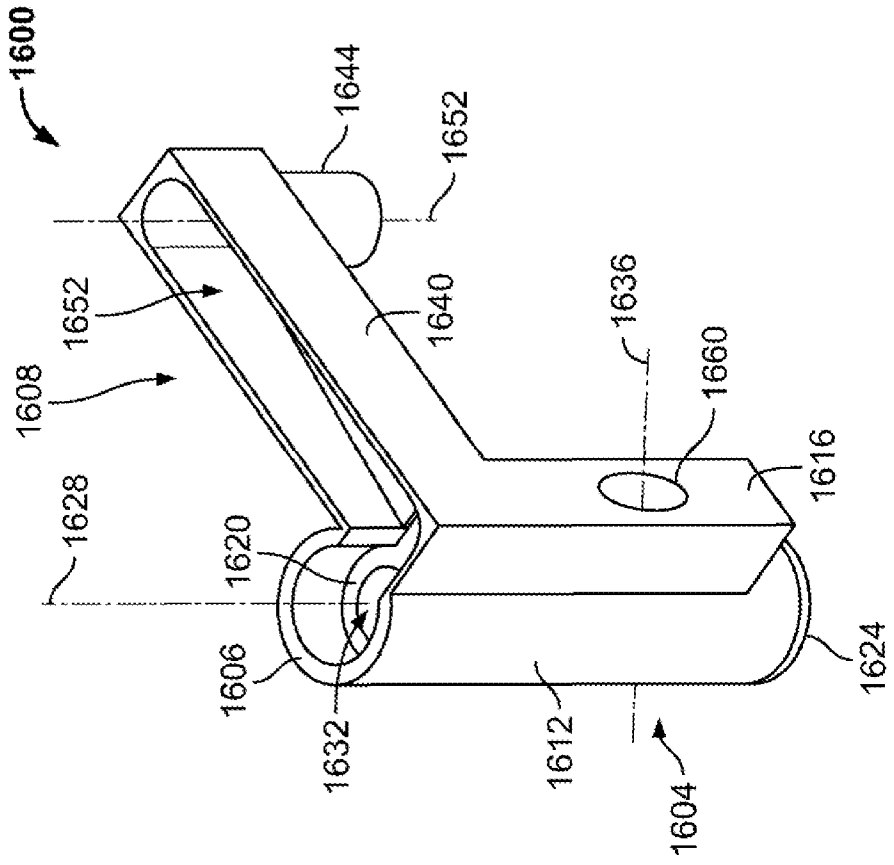

1600
1644
1652
1652
1640
1636
1660
1608
1616
1628
1620
1606
1632
1612
1624
1604

FIG. 16

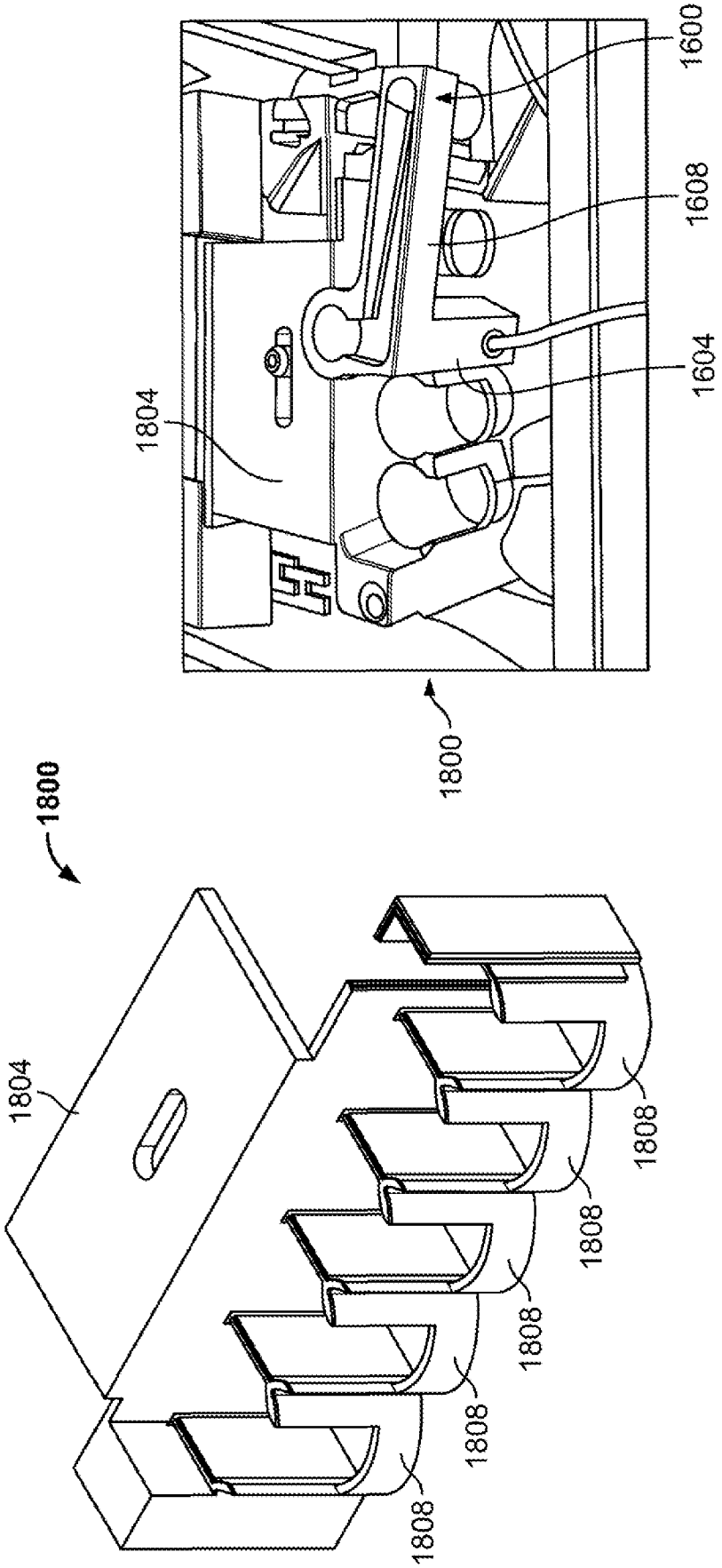


FIG. 18

FIG. 19

Molécula	Ensayo SEC	Ensayo CEX	Ensayo rCE
mAb1	✓	✓	✓
mAb2	✓		✓
mAb3	✓	✓	✓
BiTE1	✓	✓	
BiTE2	✓	✓	✓
Bi-específica 1	✓	✓	✓
Fusion 1	✓	✓	✓
Bi-específica 2	✓	✓	✓
xmAB	✓	✓	✓

FIG. 20

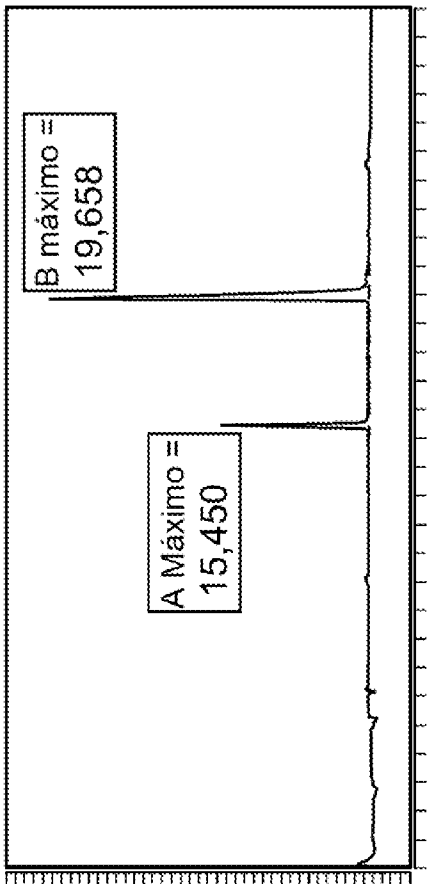


FIG. 21

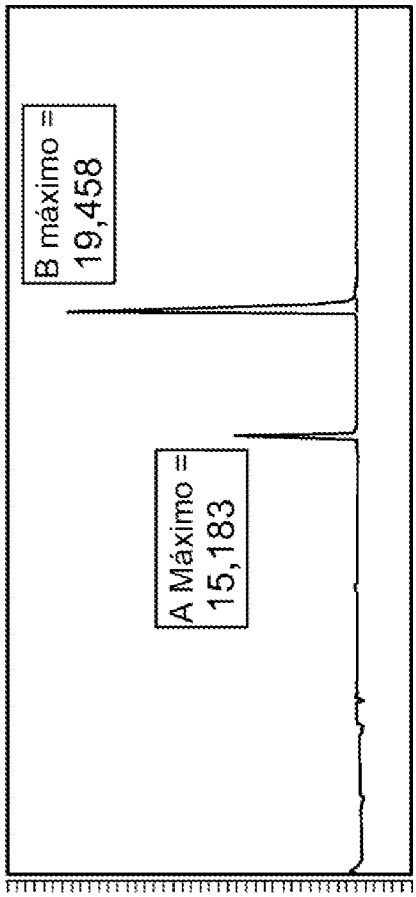


FIG. 22