



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 587**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07786032 .8**
96 Fecha de presentación : **12.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2041580**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Ensayo de aglutinación homogéneo de doble receptor para fármacos inmunosupresores.**

30 Prioridad: **13.07.2006 US 807245 P**
03.07.2007 US 772886

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. Hoffmann-La Roche AG.

72 Inventor/es: **Sigler, Gerald, F.;**
Ghoshal, Mitali;
Rashid, Shaker;
Wu, Yifei;
Dorn, Allan, R. y
Tsai, Jane, S., C.

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 359 587 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de aglutinación homogéneo de doble receptor para fármacos inmunosupresores

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la monitorización terapéutica de fármacos, y en particular, a los métodos de inmunoensayo para la determinación de la presencia o la cantidad de sustancias farmacológicas inmunosupresoras en una muestra. Más particularmente, la presente invención está relacionada con ensayos de doble receptor homogéneos no competitivos para la medición de fármacos inmunosupresores.

Antecedentes

15 Varios fármacos inmunosupresores importantes actúan sobre las inmunofilinas, la ciclosporina, el tacrolimus, la rapamicina, y el everolimus. Las inmunofilinas son proteínas chaperonas con actividad isomerasa de peptidil-prolil que pertenecen a una de las dos grandes familias, las ciclofilinas de unión a ciclosporina (CyPs) y las proteínas de unión a FK506 (FKBPs).

20 La ciclosporina (también conocida como ciclosporina A) es un metabolito natural de un hongo del suelo, un péptido compuesto por 11 aminoácidos y, junto al tacrolimus, es un inhibidor de la calcineurina. Se cree que la ciclosporina se une a la proteína citosólica ciclofilina (una inmunofilina) de los linfocitos inmunocompetentes, especialmente linfocitos T. Este complejo de ciclosporina y ciclofilina inhibe a la calcineurina, que bajo circunstancias normales induce la transcripción de interleucina-2. El fármaco también inhibe la producción de linfocina y la liberación de interleucina, dando lugar a una función reducida de las células T efectoras.

25 El tacrolimus (FK506) también es un producto fúngico (*Streptomyces tsukubaensis*). Es una lactona macrolítica y actúa inhibiendo la calcineurina. El fármaco se utiliza particularmente en los trasplantes de hígado, riñón, corazón y pulmón. Se une a una inmunofilina, seguido de la unión del complejo a la calcineurina y la inhibición de su actividad fosfatasa. De este modo, previene el paso de fase G0 a fase G1. El tacrolimus es más potente que la ciclosporina y tiene efectos secundarios menos prominentes.

30 La rapamicina (sirolimus) es un fármaco inmunosupresor extremadamente potente. Forma un complejo estable con FKBP12 (una proteína de unión a FK506 de 12-kDa), y a su vez el complejo rapamicina-FKBP12 se une a la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR) o a la diana en levaduras de la rapamicina (yTOR). Existen dos formas de yTOR, yTOR1 e yTOR2. Como miembro de la novedosa familia de quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol quinasa, la actividad quinasa de las mTORs es esencial para su función de señalización. El dominio de unión de rapamicina FKBP12 (FRBD) en mTOR ha sido identificado como un segmento de 11 kDa localizado en posición N-terminal en relación al dominio quinasa. Aunque la ciclosporina y el tacrolimus (FK506) tienen estructuras moleculares diferentes, sus propiedades inmunosupresoras y mecanismos moleculares son similares. Ambos fármacos se unen intracelularmente con abundantes proteínas citosólicas conocidas como inmunofilinas. En el caso del tacrolimus, parece ser que la mayor proteína de unión es FKBP12, mientras que la ciclosporina se une a la familia de inmunofilinas llamadas ciclofilinas. Estos complejos fármaco-inmunofilina pueden después formar un complejo pentamérico con calcineurina, calmodulina, y calcio causando una inhibición no competitiva de la actividad fosfatasa de la calcineurina.

45 El everolimus es un macrólido inmunosupresor que posee una cadena estable de 2-hidroxietilo en posición C-40 de la estructura del sirolimus. El everolimus, que tiene una mayor polaridad que el sirolimus, fue desarrollado en un intento de mejorar las características farmacocinéticas del sirolimus.

50 La calcineurina (CaN), una proteína fosfatasa heterodimérica, está compuesta por una subunidad catalítica A de 61 kDa (CaNA) y una subunidad reguladora B de 19 kDa (CaNB). Se conoce que el efecto inhibitorio del tacrolimus (FK506) en la actividad enzimática de CaN está mediado en gran parte por FKBP12. El hecho que el complejo FK506/FKBP12 se une a CaN con alta afinidad en presencia de calcio hace que sea posible el desarrollo de un ensayo en sándwich de doble receptor para medir cuantitativamente el tacrolimus en las muestras de sangre.

55 Desde que los análisis de estructura cristalina revelaron que tanto CaN A como B aportan interfases de interacción para la unión al complejo FK506-FKBP12, la fusión deseada debe incluir estas dos subunidades. Recientemente se ha descrito la expresión y la purificación de un polipéptido de cadena simple de 97 kDa de una fusión de calcineurina A/B-calmodulina (scCN) (Y. Qin et al, Biochimica et Biophysica Acta, 1747, 171-178, 2005). Aunque era implícito que la cadena simple de CaN-CaM puede presentar actividad fosfatasa, la capacidad para unirse al complejo FK506-FKBP12 aún no se ha determinado. Además, el nivel de expresión de esta scCN de 97 kDa fue bastante pobre. En un intento de producir una proteína más pequeña y de más fácil manipulación, Schreiber y colaboradores describieron la generación de fusiones de CaN truncada. En una de dichas fusiones, los aminoácidos 12-394 de la CaNA fueron fusionados en el extremo N-terminal de la CaNB completa a fin de expresar una CAB funcional (fCAB). De un modo similar, también se construyó una versión más corta llamada CAB mínima (mCAB) que contenía los aminoácidos 340-394 de la CaNA y la CaNB completa. La actividad de unión de estas fCAB y SCAB al complejo FK506-

FKBP12 se indicó mediante los ensayos de marcador transcripcional en las células T Jurkat transfectadas temporalmente (P. Clemons et al, Chemistry & Biology, 9, 49-61, 2002). No obstante, desde entonces no se han descrito más estudios en relación a la expresión y la purificación de fCAB y mCAB para determinar directamente la interacción con FK506-FKBP12 in vitro.

5 Para el adecuado manejo de los pacientes transplantados en terapia con fármacos inmunosupresores es importante obtener concentraciones sanguíneas de fármaco óptimas. Dado que a menudo los fármacos inmunosupresores se dan en combinación entre sí, la especificidad por el fármaco original es crítica.

10 Se conocen, y están disponibles comercialmente, varios inmunoensayos competitivos para fármacos inmunosupresores en los que un conjugado de un análogo del fármaco compite con el fármaco libre por un número limitado de sitios de unión a anticuerpos. Aunque estos inmunoensayos muestran buena selectividad por los fármacos originales, generalmente muestran reactividad cruzada significativa a uno o más metabolitos, dando lugar por consiguiente a un sesgo positivo indeseable en los inmunoensayos cuando se comparan con los métodos de referencia. Los ensayos actuales para fármacos inmunosupresores también incluyen una cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a una espectrometría de masas (LC/MS/MS). Estas metodologías requieren equipos y habilidades especiales.

15 Con los inmunoensayos competitivos de, por ejemplo, rapamicina se observa un problema adicional, ya que se requiere la utilización de un derivado análogo de la rapamicina, el cual es inherentemente inestable. Otro problema que aparece con los inmunoensayos competitivos es la dificultad de lograr una sensibilidad suficiente para medir rangos terapéuticos muy bajos, por ejemplo, de 5-20 ng/ml.

20 Se ha demostrado un acoplamiento covalente directo de la proteína de unión a las partículas en el formato de ensayo del fármaco inmunosupresor de receptor único para la detección de rapamicina en las patentes co-pendientes comúnmente denominadas US 60/714,712, archivada el 7 de septiembre de 2005, y US 11/468,940 archivada el 31 de agosto de 2006, el contenido de cuyas aplicaciones está incorporado aquí como referencia. La utilización de nanopartículas también se describe en éstas.

25 Armstrong et al., en Clinical Chemistry 44:12, 2516-2523 (1998) describen un ensayo de formación de pentámeros para la medición de tacrolimus y sus metabolitos activos tras su extracción a partir de sangre total. Ellos describen un ensayo basado en placas microtituladas utilizando proteínas de unión.

30 Sagi-Eisenberg, en la patente WO 2005/062708 publicada el 14 de julio de 2005, instruye sobre un ensayo heterogéneo para la detección de ofrapamicina utilizando FKBP12 inmovilizada.

35 Huster, en la patente US 2006/0099654 publicada el 11 de mayo de 2006, describe un método de inmunoensayo para la determinación de sirolimus mediante la combinación de una muestra sospechosa de contener sirolimus con dos reactivos de cuentas de látex y un receptor de analito biotinilado. Uno de los reactivos de cuentas está recubierto con estreptavidina y contiene un tinte fotosensible. Un segundo reactivo de cuentas está recubierto con un anticuerpo generado mediante la utilización de un fragmento de la molécula de sirolimus y contiene un tinte quimioluminiscente. El receptor del analito puede ser FKBP.

40 La patente EP 1239285 describe un ensayo homogéneo de receptor único para la detección de un analito en una muestra utilizando un anticuerpo específico para el analito, analito biotinilado y partículas de látex de estreptavidina. Cuando el analito compite satisfactoriamente con el complejo analito-biotina, entonces se forman menos complejos, lo que induce una mayor agregación de los complejos de partículas. La patente EP 1239285 no describe un ensayo de aglutinación homogéneo de doble receptor para fármacos inmunosupresores.

45 La patente WO2005/088307 describe un inmunoensayo (inmunoturbidimétrico) de micropartículas homogéneo para everolimus utilizando anticuerpos específicos para el analito, analito biotinilado y partículas de látex de estreptavidina. Cuando el analito compite satisfactoriamente con el complejo analito-biotina, entonces se forman menos complejos, lo que induce una posterior agregación de complejos de partículas. No hay participación de 2 receptores en el ensayo de aglutinación.

50 La patente US 6187547 describe un método de ensayo homogéneo para la medición de los niveles sanguíneos de fármacos que se unen a la inmunofilina (FK506 o rapamicina, ciclosporinas) que incluye el paso de desplazamiento del fármaco de su inmunofilina mediante la utilización de un competidor de dicha unión. Consecuentemente, el receptor se une al fármaco. En dicho método no se incluyen partículas que pudieran permitir la aglutinación.

55 La patente US 6338946 describe un método para ensayar inmunosupresores que tengan una actividad inhibitoria sobre la calcineurina que incluye los pasos de formación de un complejo con FKBP12 unido a una fase sólida, calcineurina, calmodulina, iones de calcio e inmunosupresor. Este método no es un ensayo de aglutinación.

60 La patente WO 2007/028580 (documento EPC artículo 54(3)) describe un método de ensayo homogéneo para fármacos inmunosupresores utilizando una inmunofilina en un formato de receptor único. De ese modo, una inmuno-

filina se sustituye por un anticuerpo, y aparece competición entre un conjugado del fármaco y el analito del fármaco por un determinado número de sitios de unión a la inmunofilina.

La patente WO 2006/108130 (documento EPC artículo 54(3)) proporciona un método para determinar los niveles de complejos inmunosupresores que incluye los fármacos inmunosupresores tacrolimus, sirolimus y ciclosporina A por separado y en combinación, formados en la sangre de un paciente tratado con fármacos o en un paciente candidato a terapia con fármacos inmunosupresores.

Resumen de la invención

La presente invención incluye un método para la determinación de la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra que comprende los pasos de (a) proporcionar una muestra sospechosa de contener fármaco inmunosupresor, (b) añadir a la muestra al menos dos receptores que sean específicos para el fármaco, en que cada receptor es específico para un sitio de unión separado en el fármaco y en que cada uno de los receptores se une a una partícula de detección, y en que además el fármaco se une a los receptores y causa la aglutinación de las partículas, (c) medir la cantidad de partículas aglutinadas y, (d) correlacionar la cantidad de partículas aglutinadas con la presencia o la cantidad de fármaco inmunosupresor en la muestra. De acuerdo con una de las realizaciones, sólo uno de los receptores se une a una partícula de detección, y para aglutinar las partículas se utiliza un anticuerpo que se une específicamente a las proteínas receptor que no se unen a partículas. En otra realización, se sustituye un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor diana por uno o ambos receptores, en que el anticuerpo se une a una partícula de detección.

Breve descripción de las ilustraciones

Figura 1. Curva de calibración de la rapamicina de acuerdo con la presente invención, tal y como se describe en el Ejemplo 8, utilizando γ TOR1 FRBD. La concentración de rapamicina en las muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco se representa en el eje de X y la absorbancia se representa en el eje de Y.

Figura 2. Curva de calibración de la rapamicina de acuerdo con la presente invención, tal y como se describe en el Ejemplo 8, utilizando γ TOR2 FRBD. La concentración de rapamicina en las muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco se representa en el eje de X y la absorbancia se representa en el eje de Y.

Figura 3. Gráfica que compara la concentración medida de rapamicina (eje de Y) frente a la rapamicina añadida (eje de X) de acuerdo con la presente invención, tal y como se describe en el Ejemplo 8. La concentración de rapamicina en las muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco se representa en el eje de X y la concentración de rapamicina medida se representa en el eje de Y.

Figura 4. Curva de calibración de la rapamicina de acuerdo con la presente invención, tal y como se describe en el Ejemplo 15, utilizando mTOR FRBD. La concentración de rapamicina en las muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco se representa en el eje de X y la absorbancia se representa en el eje de Y.

Figura 5. Gráfica que muestra las interacciones entre la FKBP12 unida a FK506 con las fusiones de calcineurina A/B truncada.

Descripción detallada de la invención

Tal y como se utiliza aquí, el término "partícula de detección" hace referencia a cualquier partícula que tenga una forma generalmente esférica, con un diámetro que va de unos 10 nm a unos 1000 nm, que permita que se pueda distinguir entre un estado agregado y un estado no agregado en un ensayo homogéneo. La partícula de detección puede ser una nanopartícula o una micropartícula, pero a efectos de conveniencia, todas estas partículas son referidas aquí como "micropartículas". La superficie de la partícula de detección puede estar funcionalizada, y se pueden adherir varios compuestos a la superficie, incluyendo por ejemplo, fluoróforos, entidades quimioluminiscentes, anticuerpos, biotina, o estreptavidina.

Un epítipo es un área de la superficie de una molécula antigénica que estimula una respuesta inmune específica y en contra de la cual dicha respuesta va dirigida. El marcaje de epítipos es un método de DNA recombinante mediante el cual una proteína codificada por un gen clonado se hace inmunoreactiva frente a un anticuerpo conocido. El desarrollo de sistemas de marcadores de fusión proporciona una gran flexibilidad para la fácil purificación de proteínas recombinantes utilizando matrices de afinidad y anticuerpos específicos. Los marcadores de los epítipos tienen entre 10 y 15 aminoácidos de longitud y están diseñados para crear un asa molecular para una proteína. Generalmente se colocan en el extremo amino-terminal o en el extremo carboxi-terminal para minimizar cualquier disrupción potencial en la estructura terciaria y, por consiguiente, en la función de la proteína. Dado que los marcadores son pequeños, es improbable que posteriormente interfieran en la estructura y función de la proteína recombinante. De este modo, no suele ser necesaria la eliminación de los marcadores de epítipo antes de que se lleven a cabo experimentos subsiguientes. Se han utilizado varios marcadores, por ejemplo His6 (una secuencia de seis histidinas que tienen una fuerte afinidad por las matrices que contienen iones metálicos tales como Ni^{2+} o Co^{2+}), HA (una se-

cuencia péptica derivada de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe humana), y AviTag, una secuencia que puede estar enzimáticamente mono-biotinilada en su residuo de lisina interno mediante la biotina proteína ligasa de E. coli (BirA). La enzima BirA puede añadirse a la mezcla de expresión y la biotinilación puede llevarse a cabo in situ.

5 El término "proteína de unión a FK506", o "FKBP", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una proteína receptor que se une a rapamicina para formar un complejo que se unirá específicamente a una proteína que se selecciona de entre el grupo que consiste en mTOR, yTOR1, yTOR2, y las FRBDs de mTOR, yTOR1, e yTOR2.

10 El término "unión específica" hace referencia a una unión de elevada avidéz y/o alta afinidad entre dos especies emparejadas, incluyendo por ejemplo, especies emparejadas tales como ligando/ porción diana, enzima/ sustrato, receptor/ agonista, anticuerpo/ antígeno y lecitina/ carbohidrato. La interacción de unión puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. En particular, la unión específica se caracteriza por la unión de un miembro de un par a una especie particular y la no unión a las otras especies dentro de la familia de compuestos a los que pertenece el miembro de unión correspondiente.

15 De este modo, por ejemplo, un anticuerpo se une preferiblemente a un único epítipo y no a otros epítipos de la familia de las proteínas.

20 El término "receptor" o "porción de unión", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una proteína o glicoproteína que se une específicamente a un compuesto diana. Un ejemplo de receptor es una inmunofilina que se une a un fármaco inmunosupresor.

25 El término "nanocápsula", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una micropartícula compuesta por un núcleo dieléctrico (por ejemplo, sílice o fosfato cálcico) recubierta con una capa metálica ultra-delgada (por ejemplo, oro). Los nanocápsulas adecuados para utilizar en la presente invención tienen un diámetro seleccionado que va de unos 50 nm a unos 250 nm. La superficie de la micropartícula puede estar funcionalizada, y se pueden adherir varios compuestos a su superficie, incluyendo por ejemplo, anticuerpos o estreptavidina.

30 El término "micropartícula", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una partícula sólida de entre unos 10 nm y unos 1000 nm de diámetro. Habitualmente, para la utilización en la presente invención, las micropartículas tendrán un diámetro de entre unos 100 nm y unos 600 nm. Las micropartículas pueden estar formadas por una variedad de materiales e incluyen las micropartículas de poliestireno y de látex, las superficies de las cuales pueden estar funcionalizadas, y se pueden adherir varios compuestos a la superficie, por ejemplo, anticuerpos o estreptavidina.

35 Tal y como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" hace referencia a un polipéptido o a un grupo de polipéptidos que contiene al menos un dominio de unión, donde se forma un dominio de unión con el anticuerpo mediante el plegamiento de los dominios variables de una molécula de anticuerpo para formar espacios de unión tridimensionales con una forma de superficie interna y una distribución de cargas complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno, lo que permite la reacción inmunológica con el antígeno. A menos que se indique lo contrario la referencia general a un anticuerpo incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término anticuerpo también incluye proteínas recombinantes que contengan dominios de unión, así como fragmentos de anticuerpos, incluyendo los fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, y F(ab')₂.

40

45 Tal y como se utiliza aquí, un "enlazante" es un enlace, una molécula, o un grupo de moléculas que unen dos entidades separadas la una a la otra. Los enlazantes pueden proporcionar un espaciado óptimo entre las dos entidades o pueden además proporcionar un enlazamiento lábil que permita que las dos entidades puedan separarse la una de la otra. Los enlazamientos lábiles incluyen grupos fotoescindibles, porciones lábiles al ácido, porciones lábiles a la base, y grupos escindibles mediante enzimas.

50 Tal y como se utiliza aquí, el término "ensayo homogéneo" hace referencia a un test cuantitativo o cualitativo para la determinación de la presencia o de la concentración de un compuesto en una muestra, en el que no se necesita separar los reactivos del test que no hayan reaccionado de los reactivos que hayan reaccionado con el compuesto diana a fin de detectar o medir la concentración del compuesto diana.

55 Tal y como se utiliza aquí, el término "ensayo en sándwich" hace referencia a un ensayo homogéneo para la detección de un compuesto diana en el que se utilizan dos porciones de unión que se unen específicamente al compuesto diana, aunque en dos sitios diferentes de dicho compuesto diana.

60 La presente invención hace referencia a un ensayo homogéneo en sándwich basado en partículas para la detección de un fármaco inmunosupresor en un fluido biológico. Más particularmente, la presente invención hace referencia a un ensayo homogéneo basado en partículas que utiliza porciones de unión que se unen específicamente a fármacos inmunosupresores. El ensayo incluye al menos dos porciones de unión, donde cada una de las porciones de unión se une a punto diferente del fármaco inmunosupresor diana, y cada una de las porciones de unión se une a una o más partículas. Consecuentemente, durante el ensayo se ponen en contacto una muestra sospechosa de contener el fármaco inmunosupresor de interés con un compuesto que contiene dos porciones de unión, tal que el grado de

65

aglutinación de los reactivos, es decir, el número de complejos sándwich formados entre las dos porciones de unión y el fármaco inmunosupresor, indica la cantidad de fármaco inmunosupresor presente en la muestra.

5 La detección del grado de aglutinación se lleva a cabo mediante un formato de ensayo homogéneo en el que no es necesario separar los reactivos que no han reaccionado, es decir, las porciones de unión no unidas, de los reactivos que han reaccionado (es decir, los complejos sándwich que contienen dos porciones de unión y el fármaco inmunosupresor). Los sistemas de ensayo homogéneo son conocidos por los expertos en la técnica y pueden adaptarse para su utilización en la presente invención.

10 De acuerdo con una realización, las dos porciones de unión están unidas a partículas de detección y el paso de medición de la cantidad de aglutinación que tiene lugar cuando se pone en contacto la muestra con las dos porciones de unión se lleva a cabo mediante la medición de la turbidez de la muestra en comparación con una referencia. Se puede determinar el efecto sobre el grado de aglutinación mediante la medición de la absorbancia. De acuerdo con una realización, la partícula de detección es una micropartícula, y se utiliza un ensayo de aglutinación de micropartículas para determinar la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra. Se considera que dichos ensayos de aglutinación de micropartículas son ensayos homogéneos porque no se realiza el paso de lavado antes del paso de medición de la cantidad de aglutinación que ha tenido lugar. Convenientemente, los ensayos de aglutinación de micropartículas se llevan a cabo y se miden utilizando analizadores automatizados tales como los analizadores de Roche/Hitachi o los analizadores COBAS (Roche Diagnostics, Indianapolis). En los ensayos de aglutinación de micropartículas de la presente invención, una primera porción de unión y una segunda porción de unión se unen, directa o indirectamente, a micropartículas. La primera y la segunda porciones de unión son específicas para diferentes sitios de unión en el fármaco a determinar. En una solución de reacción, estos reactivos (las porciones de unión unidas a micropartículas) se dispersan en el medio líquido y forman una suspensión estable. En presencia del fármaco inmunosupresor, se produce la unión entre el fármaco y los receptores (las porciones de unión), causando la aglutinación de las partículas y el correspondiente incremento de la turbidez de la solución, la cual se cuantifica mediante la medición de la absorbancia de la solución. Existe una correlación directa entre la cantidad de fármaco presente en una muestra y la cantidad de absorbancia medida.

30 De acuerdo con una realización, la partícula de detección es un nanocápsula. Los nanocápsulas son un tipo de partículas de detección ópticamente sintonizables compuestas por un núcleo dieléctrico (por ejemplo, sílice, alginato o fosfato cálcico) recubierto con una capa metálica ultra-delgada (por ejemplo, oro). Los nanocápsulas de oro tienen propiedades físicas similares a las del oro coloidal, en particular una fuerte absorción óptica debida a la respuesta electrónica colectiva del metal a la luz. La respuesta óptica de los nanocápsulas a la luz depende claramente del tamaño relativo del núcleo de la nanopartícula y del grosor del caparazón de oro. Mediante la variación del núcleo relativo y del grosor del caparazón, el color de los nanocápsulas puede variar a lo largo de un amplio rango dentro del espectro óptico que abarca las regiones del espectro visibles y las cercanas al espectro IR. Los nanocápsulas de oro pueden estar hechos tanto para absorber como para dispersar la luz, preferentemente mediante la variación del tamaño de la partícula en relación a la longitud de onda de la luz a su resonancia óptica. En una realización, el núcleo de los nanocápsulas tiene un diámetro que se selecciona de entre rango que va de unos 50 nm a unos 200 nm, y en una realización de unos 120 nm, y el grosor del recubrimiento de los nanocápsulas o del caparazón se selecciona de entre el rango que va de unos 5 nm a unos 30 nm.

45 Se ha descrito un inmunoensayo de sangre total que utiliza nanocápsulas de oro (Anal. Chem. 75:2377-2381, 2003). Se prevé que, en el ensayo de nanopartículas descrito, las proteínas de unión tales como las inmunofilinas pueden sustituirse por anticuerpos. El principio de la agregación de nanopartículas es similar al de la técnica de aglutinación de micropartículas. La elevada turbidez de la sangre y la gran extinción visible complican la detección de los agregados en el ensayo de aglutinación. No obstante, la selección de longitudes de onda óptimas y los tratamientos previos de las muestras de sangre pueden vencer estos factores de dificultad. Los nanocápsulas también tienen la ventaja de ser bastante estables en relación a la agregación en sangre total, y que puede detectarse la dimerización y la agregación de las nanopartículas mediante un formato de ensayo en sándwich (fármaco inmunosupresor con proteínas de unión) por medio de un cambio en el espectro del rojo cercano al infrarrojo, donde la sangre total es más transmisiva, permitiendo así la detección de la agregación de nanocápsulas en sangre total.

55 De acuerdo con una realización, se describe un método de ensayo para la determinación de la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra que incluye los pasos de proporcionar la muestra; mezclar dicha muestra con un primer receptor y un segundo receptor para formar una suspensión, en donde dichos primer y segundo receptores están unidos a partículas de detección y cada uno de los dichos primer y segundo receptores se unen específicamente a un sitio de unión separado en dicho fármaco, donde la presencia del fármaco resulta en la aglutinación de las partículas de detección; detectar directamente o medir una cantidad de aglutinación de partículas en dicha suspensión; y correlacionar la cantidad de aglutinación de partículas con la presencia o la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra. Una realización adicional hace referencia a que el fármaco inmunosupresor se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus, y dicho primer receptor es una inmunofilina o un fragmento de unión de la misma. Una realización adicional hace referencia a que las partículas de detección se seleccionan de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas.

65

De acuerdo con una realización el fármaco inmunosupresor a detectar y cuantificar se selecciona a partir de el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus, y las porciones de unión son proteínas receptor de unión al fármaco inmunosupresor. En una realización, los receptores representan las inmunofilinas nativas del fármaco inmunosupresor diana, o fragmentos o derivados de unión de dichas inmunofilinas nativas. En una realización, el fármaco inmunosupresor diana es rapamicina o everolimus y el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) y el segundo receptor contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR). En una realización adicional, la FKBP es FKBP12 o FKBP25 y la TOR se selecciona de entre el grupo que consiste en mTOR, yTOR1, yTOR2, y las FRBDs de mTOR, yTOR1, e yTOR2.

En una realización alternativa el fármaco inmunosupresor a detectar y cuantificar en una muestra es tacrolimus, donde el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) y el segundo receptor contiene calcineurina, o un fragmento o derivado de unión de la misma. En una realización adicional, el segundo receptor además contiene calmodulina y un ión de calcio unidos a la calcineurina. En otra realización más en la que el fármaco inmunosupresor a detectar y cuantificar es una ciclosporina, donde el primer receptor contiene una ciclofilina seleccionada de entre el grupo que consiste en ciclofilina A (CypA), ciclofilina B (CypB), ciclofilina C (CypC), cuyas estructuras están descritas en Mikol, et al. PNAS 91:5183-5186 (1994), y el segundo receptor contiene una calcineurina. En una realización adicional, el segundo receptor además incluye calmodulina y un ión de calcio unido a la calcineurina.

De acuerdo con una realización, la proteína receptor que se une al fármaco inmunosupresor se une a una partícula de detección, donde la partícula de detección es un nanocápsula o una micropartícula. La partícula de detección puede unirse a la proteína receptor de proteínas mediante la utilización de cualquiera de las técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la partícula de detección puede estar unida a la proteína receptor mediante un enlace covalente directo utilizando enlazantes estándar, o la proteína puede estar unida a la partícula de detección mediante un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, interacciones hidrófobas/hidrófilas o cualquier combinación de éstas. En una de las realizaciones de la invención, las proteínas receptor están adheridas a la partícula de detección mediante apareamiento directo o a través de un marcador.

Como ejemplo, las partículas de detección pueden adherirse a anticuerpos anti-marcadores y las proteínas de unión pueden adherirse al marcador correspondiente. Alternativamente, una primera proteína receptor puede adherirse a un marcador (hapteno), incluyendo por ejemplo biotina, y las partículas de detección pueden unirse a estreptavidina o a un anticuerpo que se une al marcador (hapteno). La segunda proteína de unión del fármaco también se adhiere al mismo marcador o, en una realización alternativa, a un marcador diferente. El número de biotinas o moléculas marcadas adheridas a la proteína puede variar, pero lo más preferible es que se adhiera una biotina (u otro marcador) por cada molécula de proteína de unión a fin de minimizar la aglutinación espontánea de las micropartículas de estreptavidina (o ligando para dicho marcador).

De acuerdo con una realización, se adhiere estreptavidina, avidina o un anticuerpo anti-biotina (o un anticuerpo anti-hapteno) a una partícula de detección. En presencia del fármaco inmunosupresor, se forma un sándwich simultáneamente entre el fármaco y las dos proteínas de unión biotiniladas. En presencia de las partículas de detección marcadas con estreptavidina tiene lugar la aglutinación, que puede medirse mediante dispersión de luz. Cuanto más fármaco haya presente en la muestra, más aglutinación se observará. Cuando no hay fármaco presente, no se formará ningún sándwich y las partículas de detección no se aglutinarán. De acuerdo con una realización, la partícula de detección es una micropartícula marcada con estreptavidina y las proteínas receptor biotiniladas están adheridas previamente a la micropartícula de estreptavidina antes de poner en contacto las proteínas receptor con la muestra que contiene el fármaco inmunosupresor. Este procedimiento proporciona los resultados más óptimos en el ensayo.

De modo similar, cuando se marcan las dos proteínas receptor con un miembro de un par fluoróforo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés fluorescence resonance energy transfer), se puede detectar respectivamente la presencia del fármaco inmunosupresor. En presencia del fármaco inmunosupresor se forma simultáneamente un sándwich entre el fármaco y las dos proteínas de unión biotiniladas. La formación de este complejo acerca los dos fluoróforos el uno al otro con tal proximidad que tiene lugar la transferencia de energía fluorescente bajo la excitación del fluoróforo donador con luz de excitación. Tal fenómeno puede medirse mediante la detección de la disminución de las emisiones del fluoróforo donador o el incremento de las emisiones del fluoróforo aceptor.

De acuerdo con una realización, las partículas de detección están unidas a dichos primer y segundo receptores mediante un enlace biotina-estreptavidina o biotina-avidina. En una realización adicional, las partículas de detección están unidas covalentemente a través de un enlazante, ya sea directa o indirectamente, a dichos primer y segundo receptores. Además, un enlazante contiene un anticuerpo para el primer receptor y un anticuerpo para el segundo receptor. Los receptores primero y segundo son proteínas recombinantes de fusión que contienen un sitio de adhesión para la molécula de biotina.

De acuerdo con una realización, las proteínas receptor pueden expresarse como proteínas de fusión recombinantes que contienen una secuencia peptídica que, o bien representa un ligando o marcador, o bien proporciona un sitio óptimo de adhesión para una molécula de biotina. Por ejemplo, la proteína receptor puede ser una proteína recombinante que contiene una pareja de fusión con una secuencia señal de biotinilización. La proteína de fusión se co-

- expresa en *Escherichia coli* o en un sistema libre de células que contiene ligasa de biotina con, por ejemplo, AviTag, que cataliza la adición covalente de la porción de biotina a un residuo de lisina de la secuencia señal. En una realización la ligasa de biotina incluye AviTag y el residuo es lisina. En una realización, las dos proteínas receptor diferentes utilizadas en el ensayo son proteínas marcadas con biotina marcada con AviTag. Las secuencias marcadas con AviTag pueden adherirse tanto al extremo C-terminal como al N-terminal. Los modelos del concepto de sándwich sugieren que al menos uno de los marcadores se debe situar en el extremo N-terminal para prevenir el impedimento esteárico. No obstante, los solicitantes han encontrado que, sorprendentemente, el ensayo funciona correctamente con ambos marcadores en el extremo C-terminal.
- 5
- 10 En una realización alternativa, los anticuerpos para la proteína receptor están unidos a la superficie de las partículas de detección, donde los anticuerpos unidos se unen específicamente a la misma proteína receptor o a un marcador unido a la proteína receptor. En presencia de fármacos inmunosupresores se forma el sándwich y tiene lugar la aglutinación. Estos anticuerpos están diseñados y/o seleccionador de tal manera que los anticuerpos no se unen a al sitio de unión para fármacos inmunosupresores de la proteína receptor.
- 15
- 20 De acuerdo con una realización, se proporcionan reactivos del ensayo para la detección y la cuantificación de un fármaco inmunosupresor presente en una muestra. La muestra puede ser cualquier muestra líquida sospechosa de contener un fármaco inmunosupresor. Más habitualmente, la muestra es un fluido biológico corporal obtenido de un paciente al que se ha administrado un fármaco inmunosupresor. En una realización, la muestra es sangre total o un producto derivado de la misma. Generalmente, cuando la muestra que se utiliza es sangre total y el ensayo es un método de detección de aglutinación de micropartículas, la muestra de sangre se trata previamente antes de poner en contacto la muestra con los reactivos del ensayo a fin de liberar la porción de fármaco unida a células. Este procedimiento incluye la combinación de la muestra de sangre total con un agente precipitador. El agente precipitador se selecciona de entre los que se conocen en la técnica, incluyendo por ejemplo sulfato de cobre acuoso o sulfato de zinc en metanol, etanol, etilenglicol, acetonitrilo o disolventes orgánicos miscibles en agua similares. Entonces la mezcla de sangre total se mezcla exhaustivamente y se centrifuga. El sobrenadante claro se transfiere a un recipiente para muestras y se coloca en el analizador para la realización del ensayo. En una realización, el compuesto utilizado para tratar previamente la muestra de sangre total incluye metanol y sulfato de zinc. Tras el tratamiento previo de la muestra, se sustraen los residuos celulares antes de la adición de los reactivos del ensayo. En una realización, los residuos celulares se sustraen mediante centrifugación a baja velocidad (aproximadamente 12.000 rpm) durante 5 minutos.
- 25
- 30
- 35 De acuerdo con una realización, los reactivos del ensayo incluyen un primer receptor y un segundo receptor, donde el primer y el segundo receptor se unen específicamente a sitios de unión separados en el fármaco diana para formar un complejo en sándwich tras el contacto de los reactivos con el fármaco. De acuerdo con una realización, tanto el primer como el segundo receptores se proporcionan con un marcador para unir el receptor a una partícula de detección. En otra realización, se proporcionarán el primer y el segundo receptor con la partícula de detección ya unida tanto al primero como al segundo receptor. En una realización, el primer y el segundo receptor también contienen un marcador biotinilado y la partícula de detección esta unida a estreptavidina. En una realización adicional, tanto el primer como el segundo receptores se proporcionan con una sola molécula de biotina. En una realización, la partícula de detección es una micropartícula unida a estreptavidina o a un anticuerpo específico para biotina. En una realización, se proporcionan los reactivos del inmunoensayo como dos complejos que contienen un receptor unido a una micropartícula a través de un enlace biotina-estreptavidina.
- 40
- 45 En una realización, se proporciona un reactivo para la determinación de un fármaco inmunosupresor en una muestra, incluyendo dicho reactivo un primer complejo de unión para el fármaco que contiene un primer receptor unido a una primera partícula de detección; un segundo complejo de unión para el fármaco que contiene una porción de unión que se selecciona de entre el grupo que consiste en un segundo receptor unido a una partícula de detección, un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor unido a una segunda partícula de detección, y un segundo anticuerpo específico para el receptor que forma un complejo con un segundo receptor, donde cada complejo de unión al fármaco se une específicamente a un sitio de unión separado en dicho fármaco inmunosupresor. En una realización adicional, la porción de unión es un segundo receptor unido a una partícula de detección.
- 50
- 55 En una realización, se proporciona un reactivo de ensayo de aglutinación para la cuantificación de la cantidad de rapamicina o everolimus en una muestra. En esta realización, el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 unida a una partícula de detección y dicho segundo receptor contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) unida a una partícula de detección. En una realización, se proporciona un reactivo en el que la partícula de detección es una micropartícula. En una realización adicional se proporciona un reactivo en el que el segundo complejo de unión al fármaco contiene un anticuerpo específico para el segundo receptor que forma un complejo con un segundo receptor. En una realización, el primer receptor contiene FKBP12 o FKBP25 y el segundo receptor se selecciona de entre el grupo que consiste en mTOR, yTOR1, yTOR2, y las FRBDs de mTOR, yTOR1, e yTOR2. En una realización alternativa, se proporciona un reactivo de ensayo de aglutinación para la cuantificación de la cantidad de tacrolimus presente en una muestra, donde los reactivos contienen un primer receptor que contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) unida a una partícula de detección y un segundo receptor que contiene calcineurina, o un fragmento o derivado de unión de la misma unido a una partícula de detección. En una realización adicional, el segundo receptor además contiene calmodulina y un ión de calcio unidos a la calcineurina. En otra realización más,
- 60
- 65

se proporciona un reactivo de ensayo de aglutinación para la cuantificación de la cantidad de ciclosporina, donde los reactivos contienen un primer receptor que contiene una ciclofilina unida a una partícula de detección que se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclofilina A (CypA), ciclofilina B (CypB), y ciclofilina C (CypC), y un segundo receptor que contiene una calcineurina o un fragmento de calcineurina unido a una partícula de detección. En una
 5 realización adicional, el segundo receptor también contiene calmodulina y un ión de calcio unidos a la calcineurina. Habitualmente, la partícula de detección es o bien un nanocápsula o una micropartícula.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para la determinación de la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra. El método incluye los pasos de aislamiento de la muestra, y opcionalmente el trata-
 10 miento previo de la muestra para liberar la fracción de fármaco unida a células. Entonces, la muestra se pone en contacto con un compuesto reactivo de ensayo que contiene un primer y un segundo receptor para formar una suspensión, donde el primer y el segundo receptor se unen específicamente a sitios separados del fármaco inmunosupresor diana. En una realización, el compuesto reactivo también contendrá partículas de detección que se unen tanto al primer como al segundo receptor. Alternativamente, en una realización se proporcionan las partículas de
 15 detección como un componente separado que se añade a la suspensión antes, durante o después de la adición del primer y el segundo receptor. Los reactivos del ensayo se mezclan conjuntamente para inducir la aglutinación en presencia del fármaco diana, donde tanto el primer como el segundo receptor se unen específicamente a sitios de unión separados de dicho fármaco y las partículas de detección se unen a cada uno de los receptores (si no están ya unidas a los receptores) para formar un complejo en sándwich detectable. Entonces se mide la cantidad de aglu-
 20 tinación directamente, es decir, sin que se requieran pasos de purificación o lavado adicionales, y por consiguiente, el ensayo es un ensayo homogéneo. La cantidad de fármaco inmunosupresor se correlaciona con la cantidad detectada de aglutinación de partículas mediante la utilización de las técnicas de ensayo homogéneo conocidas por los expertos en la técnica. De acuerdo con una realización, el grado de aglutinación de partículas se mide mediante la medición de la absorbancia y la cantidad de fármaco presente se determina por referencia a una curva estándar.

En una realización se describe un método para la determinación de la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra que incluye los pasos de proporcionar una muestra; mezclar dicha muestra con un receptor unido a una primera partícula de detección y a una porción de unión que se selecciona de entre el grupo que
 30 consiste en un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor unido a una segunda partícula de detección, y un anticuerpo específico para el segundo receptor que forma un complejo con el segundo receptor para formar una suspensión, donde dicho receptor se une específicamente con dicho fármaco inmunosupresor en un sitio diferente al que se une el anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor, donde en presencia del fármaco tiene lugar la aglutinación de las partículas de detección; medir la cantidad de aglutinación de las partículas en dicha suspensión mediante la medición de la absorbancia; y correlacionar la cantidad de aglutinación de partículas con la presencia o
 35 la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra. En una realización adicional, el fármaco inmunosupresor se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus y la porción de unión es un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor, donde el anticuerpo está unido a una partícula de detección. En una realización adicional, el fármaco inmunosupresor es rapamicina o everolimus; el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP); y la porción de unión contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) o un anticuerpo que se une específicamente a una proteína diana de la rapamicina (TOR). En una realización adicional, el fármaco inmunosupresor es tacrolimus; el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP); y el segundo receptor contiene una calcineurina o un anticuerpo que se une específicamente a la calcineurina. En una realización adicional, el fármaco inmunosupresor es ciclosporina; el primer receptor contiene una ciclofilina; y el segundo receptor contiene una calcineurina o un anticuerpo que se une específicamente a la calcineurina.
 45

En una realización, las partículas de detección son o bien micropartículas o nanocápsulas, y en una realización las partículas de detección son micropartículas. El método puede utilizarse para medir la cantidad de un fármaco inmunosupresor que se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus mediante la selección de los receptores que se utiliza en el ensayo. Para detectar rapamicina o everolimus, el primer receptor contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) unida a una primera partícula de detección y el segundo receptor contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) unida a una segunda partícula de detección. Para la detección de tacrolimus, el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) unida a una primera partícula de detección, y el segundo receptor contiene una calcineurina unida a una segunda partícula de detección. Para la detección de ciclosporina, el primer receptor contiene una ciclofilina unida a una primera partícula de detección, y el segundo receptor contiene una calcineurina unida a una segunda partícula de detección. Para aquellos métodos en los que se detecte y cuantifique la presencia de tacrolimus o ciclosporina, el segundo receptor (calcineurina) opcionalmente puede estar además formando un complejo con calmodulina y un ión de calcio.
 50
 55

El método para la cuantificación de un fármaco inmunosupresor puede realizarse en cualquier muestra acuosa sospechosa de contener un fármaco inmunosupresor como forma de confirmación de la presencia y determinación de la concentración del fármaco en la muestra. En una realización, la muestra es un fluido corporal aislado procedente de un paciente, incluyendo tales fluidos como la sangre, el plasma, la orina, el esperma, el líquido cefalorraquídeo, la saliva y similares. En una realización, la muestra es sangre total. Generalmente, la muestra de sangre se trata previamente para liberar la fracción de fármaco inmunosupresor unida a células antes de que la muestra se ponga en
 60 contacto con los reactivos del ensayo. En una realización, la muestra de sangre se extrae con una solución que contiene metanol y sulfato de zinc, y los residuos celulares se sustraen con anterioridad a dicho paso de mezcla. En una
 65

realización, las partículas de detección son nanocápsulas y la muestra de sangre se trata previamente con anterioridad a la adición de los reactivos del ensayo.

5 En una realización, los anticuerpos anti-fármaco inmunosupresor también pueden utilizarse en un ensayo de aglutinación en lugar de uno o ambos receptores de proteína.

10 Los anticuerpos (y en una realización, los anticuerpos monoclonales) pueden generarse contra un complejo que contiene un fármaco inmunosupresor y una inmunofilina, donde el anticuerpo se selecciona en base a su capacidad de unión al fármaco inmunosupresor. De este modo, se puede potenciar la especificidad del anticuerpo para los fármacos inmunosupresores activos en relación a los metabolitos inactivos del fármaco inmunosupresor. Como ejemplo, un anticuerpo puede generarse contra una porción de la molécula de rapamicina específica para el sitio de unión de FKBP12 (donde el inmunógeno utilizado contiene un complejo formado por rapamicina y una proteína diana de la rapamicina (TOR)). Alternativamente, podría generarse un anticuerpo contra una porción de la molécula de rapamicina específico para el sitio de unión de la proteína asociada a rapamicina-FKBP (donde el inmunógeno utilizado contiene un complejo formado por rapamicina y FKBP12). Se podría aplicar un planteamiento similar para otros fármacos inmunosupresores, incluyendo ciclosporina, tacrolimus, y everolimus. Por ejemplo, se genera un anticuerpo contra la FK-506 unida a FKBP12 y se utiliza para medir la FK-506 en una muestra. La unión de FK-506 a FKBP12 es muy estable, y el complejo FK-506/FKBP12 puede acoplarse como inmunógeno a KLH para inyectarse en ratones y obtener una respuesta inmune. (En este caso el acoplamiento se realizaría entre FKBP12 y KLH mediante los métodos estándar de acoplamiento proteína-proteína.) El aislamiento de anticuerpos adecuados y la selección de anticuerpos monoclonales se haría mediante la utilización de los métodos estándar conocidos en la técnica. Este planteamiento también puede utilizarse para producir anticuerpos contra ciclosporina A unida a ciclofilina.

25 De acuerdo con una realización, se proporciona un método para la determinación de la cantidad de fármaco inmunosupresor en una muestra, en el que los reactivos del ensayo están seleccionados de entre el grupo que consiste en receptores de proteína unidos a partículas de detección y anticuerpos unidos a partículas de detección. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En una realización, el ensayo se realiza con dos anticuerpos, donde los anticuerpos se generan contra un complejo fármaco inmunosupresor/inmunofilina, pero con especificidad por dos sitios diferentes del fármaco inmunosupresor. En esta realización, los dos anticuerpos están acoplados a una partícula de detección. En otra realización, el ensayo se realiza con dos anticuerpos, donde los anticuerpos se generan contra un complejo fármaco inmunosupresor/inmunofilina, pero con especificidad por dos sitios diferentes de la inmunofilina. En esta realización, los dos anticuerpos están acoplados a la partícula de detección. En una realización adicional, los reactivos del ensayo pueden contener un receptor que se une específicamente al fármaco inmunosupresor diana y un anticuerpo que se une específicamente a un sitio diferente del fármaco inmunosupresor. En esta realización, tanto la proteína receptor como el anticuerpo están unidos a partículas de detección.

40 En una realización adicional, los reactivos del ensayo pueden contener un primer receptor, un segundo receptor y un anticuerpo que se une específicamente al segundo receptor. En esta realización, el primer receptor se une a una partícula de detección, y el primer receptor se une específicamente al fármaco inmunosupresor diana. La segunda proteína receptor se une al fármaco inmunosupresor diana en un sitio diferente al de la primera proteína receptor. En esta realización, la segunda proteína receptor no está unida a una partícula de detección y, generalmente, el anticuerpo no está marcado. No obstante, el anticuerpo puede estar unido opcionalmente a una partícula de detección. En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a la segunda proteína receptor se genera en contra de un inmunógeno que contiene un segundo complejo receptor/fármaco inmunosupresor. En una de las realizaciones, uno de los receptores, por ejemplo, FKBP12 (para la rapamicina) está marcado con un marcador, por ejemplo, biotina. Cuando se mezcla una muestra con una cantidad limitada de primera proteína receptor biotinilada y una segunda proteína receptor, se forma un complejo en sándwich cuando el fármaco diana está presente en la muestra. Se añaden el complejo en sándwich biotinilado resultante junto con FKBP12, que aún no ha reaccionado, a un segundo reactivo que contiene micropartículas de látex de estreptavidina y un anticuerpo que se une específicamente a una segunda proteína receptor. La aglutinación tiene lugar en proporción al número de complejos en sándwich biotinilados unidos a las micropartículas de látex de estreptavidina y aglutinados por el anticuerpo, que a su vez, se relaciona directamente con la cantidad de fármaco presente. Los anticuerpos que reaccionan con el segundo receptor que no forma parte de un complejo no producen ninguna señal. Es importante tener en cuenta que, en esta alternativa, el anticuerpo se une al segundo receptor en un sitio diferente al sitio de unión del receptor para el fármaco. Los anticuerpos anti-inmunofilina que se unen específicamente a un dominio de unión de FKBP/rapamicina están descritos en la patente US 6.464.974.

60 De acuerdo con una realización, un método para la cuantificación de un fármaco inmunosupresor incluye proporcionar una muestra y mezclar la muestra con un compuesto reactivo para formar una suspensión. El compuesto reactivo contiene un receptor y un anticuerpo, cada uno de los cuales está unido a una partícula de detección, y donde dicho receptor y un anticuerpo se unen específica y simultáneamente al fármaco inmunosupresor. Entonces, la cantidad de aglutinación de partículas presente en la suspensión se mide utilizando una técnica de ensayo homogéneo, tal como la medición de la absorbancia, por ejemplo, y la cantidad detectada de aglutinación de partículas se correlaciona con la cantidad de fármaco inmunosupresor presente en la muestra.

65

De acuerdo con otra realización, un método para la cuantificación de un fármaco inmunosupresor incluye proporcionar una muestra y mezclar la muestra con un compuesto reactivo para formar una suspensión, donde el compuesto reactivo contiene un primer y un segundo anticuerpo, cada uno de los cuales está unido específica y simultáneamente a una partícula de detección, y donde cada uno de dichos primer y segundo anticuerpos se unen específica y simultáneamente al fármaco inmunosupresor. Entonces, la cantidad de aglutinación de partículas presente en la suspensión se mide utilizando una técnica de ensayo homogéneo, tal como la medición de la absorbancia, por ejemplo, y la cantidad detectada de aglutinación de partículas se correlaciona entonces con la cantidad de fármaco inmunosupresor presente en la muestra.

De acuerdo con otra realización, un método para la cuantificación de un fármaco inmunosupresor incluye proporcionar una muestra y mezclar la muestra con un compuesto reactivo para formar una suspensión, donde el compuesto reactivo contiene un primer y un segundo receptor y un anticuerpo que se une específicamente al segundo receptor, donde cada uno de dichos primer y segundo receptores se unen específica y simultáneamente al fármaco inmunosupresor, y el primer receptor está unido a una partícula de detección. En una realización el anticuerpo también está unido a una partícula de detección. Entonces, la cantidad de aglutinación de partículas presente en la suspensión se mide utilizando una técnica de ensayo homogéneo, tal como la medición de la absorbancia, por ejemplo, y la cantidad detectada de aglutinación de partículas se correlaciona entonces con la cantidad de fármaco inmunosupresor presente en la muestra.

La presente invención también muestra la utilización de receptores mutantes que tienen una selectividad potenciada para el fármaco original. De acuerdo con una realización, los péptidos mutantes yTOR2 FRBD y FKBP12 se generan mediante la utilización de mutagénesis de sitio dirigido a fin de potenciar la especificidad del ensayo por el fármaco original de la rapamicina. Se puede aplicar el concepto de mutación de las proteínas receptor, a fin de potenciar la especificidad del complejo receptor por el fármaco original de la rapamicina, sobre cualquiera de las proteínas receptor descritas aquí. La formación del complejo yTOR2 FRBD/rapamicina/FKBP12 puede monitorizarse mediante varios de los métodos descritos aquí y que se utilizan para medir la concentración de rapamicina en las muestras de pacientes.

Las publicaciones de las estructuras cristalinas pueden utilizarse como soporte para los estudios de mutagénesis. Las proteínas de unión mutantes pueden producirse mediante métodos recombinantes comúnmente conocidos en la técnica y éstas contienen marcadores de afinidad añadidos mediante métodos de recombinación para ayudar a su purificación, utilizando métodos que también son comúnmente conocidos en la técnica. Consecuentemente, en relación a la siguiente tabla, se anticipa que los siguientes residuos de aminoácido pueden modificarse para potenciar la especificidad de las moléculas: el ácido glutámico en posición 54 de la FKBP12, la asparagina en posición 2038 de la yTOR2, el ácido aspártico en posición 1972 de la yTOR2, y la arginina en posición 1976 de la yTOR2.

La siguiente tabla muestra las distancias C-C medidas entre los metabolitos de la rapamicina, la FKBP12 y la FRBD. La estructura cristalina 1fap publicada por el RCSB PDB (Protein Data Base) se utilizó para medir las distancias C-C de los metabolitos de la rapamicina (12).

	Distancias C-C de la 1fap PDB	Porción C	FKBP12 (Å)	FRB (Å)	TOR2
M1	12-hidroxi-Rapa	C12	H87 (7,12) I90 (6,90)	T2098 (7,07)	N2038
M2	24-hidroxi-Rapa	C24	E54 (7,69)	L2031 (6,53) E2032 (4,67)	L1971 D1972
M3	16-O-desmetil-Rapa	C50		T2098 (4,00) Q2099 (5,73) D2102 (4,04)	N2038 Q2039 D2042
M4	39-O-desmetil-Rapa	C52	E54 (6,79)	R2036 (4,54) G2040 (3,93)	R1976 G1980
M5	27, 39-O-didesmetil-Rapa	C51, (C52 ver M4)		E2032 (5,18) E2033 (6,48) S2035 (5,45) R2036 (4,18)	D1972 D1973 S1975 R1976

La detección de la formación de complejos puede realizarse utilizando un par de fluoróforos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), pero no forma parte de la presente invención. La FRET se basa en la transferencia dependiente de la distancia de energía en estado de excitación proveniente de un fluoróforo donador hacia un fluoróforo aceptor. El fluoróforo donador se excita mediante luz incidente y se puede transferir la energía en estado de excitación proveniente del donador si hay un aceptor en un rango de de entre 20 Å y 60 Å. Más allá del rango óptimo de distancias intermoleculares, la eficiencia de la transferencia de energía disminuye como la inversa de la sexta potencia de la distancia. Esta transferencia resulta en una reducción de la intensidad de fluorescencia del donador y de la duración del estado excitado, y en un incremento de la intensidad de emisión del aceptor (Selvin, P.R., Nature Structural Biology, 2000, 7, 9, 730-734). Este formato de ensayo requiere que un par de fluoróforos FRET estén acoplados a un par de receptores de unión. Se han utilizado un fluoróforo donador, tal como el europio, y un fluoróforo aceptor, tal como la Cy5, mediante la utilización de luz de excitación de 340 nm y de detección de

emisión a 665 nm (Pulli, T., et. al., Analytical Chemistry, 2005, 77, 2637-2642). Consecuentemente, pueden marcarse la primera y la segunda proteínas receptor que se unen específicamente a un fármaco inmunosupresor con los fluoróforos donador y aceptor respectivos. Por ejemplo, en un ensayo para la detección de la rapamicina se puede utilizar un fluoróforo de europio donador para marcar un primer receptor (por ejemplo, FKBP12) y se puede utilizar un fluoróforo de Cy5 aceptor para marcar un segundo receptor (por ejemplo yTOR2 FRBD). Las distancias medidas entre los aminoácidos seleccionados en el complejo mTOR FRBD-rapamicina-FKBP12 (1fap, Protein Data Bank) están enumeradas en la tabla inferior. Una posible combinación consiste en marcar el extremo amino-terminal (NH₂) de la yTOR2 (R1959) y marcar el extremo amino-terminal de la FKBP12 (G1), que están a una distancia de 48,56 Å en la estructura cristalina, asumiendo que la yTOR2 adopta una conformación similar a la mTOR FRBD en el complejo mTOR FRBD-rapamicina-FKBP12.

	mTOR FRBD (yTOR2)	Distancia	FKBP12
Posición del aminoácido	R2018 (R1959)(NH ₂ -terminal)	38,5 Å	E107 (COOH-terminal)
	R2018 (R1959)(NH ₂ -terminal)	48,56 Å	G1 (NH ₂ -terminal)
	S2112 (G2052)(COOH-terminal)	32,97 Å	G1 (NH ₂ -terminal)

Existen varios equipos comerciales disponibles para el marcaje de los aminoácidos de yTOR2 y FKBP12 con los fluoróforos donador y aceptor. Por ejemplo, el quelato LANCE Eu-W 1024-ITC (Perkin Elmer, AD0013) está optimizado para el marcaje covalente con europio de proteínas que poseen al menos una amina alifática primaria (N-terminal o residuos de lisina). Adicionalmente, el paquete de colorante Cy mono-reactivo Cy5 (Amersham, Product Code PA23500) puede utilizarse para el marcaje covalente con Cry5 de los grupos amina de proteínas. Están disponibles otras reacciones químicas para permitir el marcaje mediante grupos amina (utilizando colorantes de éster de NHS), grupos tiol (utilizando colorantes de maleimida), o grupos aldehído (utilizando colorantes de hidrazida). Consecuentemente, los receptores de yTOR2 y FKBP12 se pueden marcar y se pueden sustraer los fluoróforos desmarcados de los receptores marcador mediante la realización de una cromatografía en columna.

El ensayo puede llevarse a cabo mediante la adición de rapamicina a yTOR2 marcada apropiadamente y a FKBP12 marcada. La presencia de rapamicina conducirá a la formación del complejo yTOR2/rapamicina/FKBP12 de un modo dependiente de rapamicina. Mediante la utilización de un fluorómetro se puede medir la fluorescencia resultante de la excitación de la luz del complejo yTOR2/ rapamicina/ FKBP12 formado. En este ejemplo, la fluorescencia medida es directamente proporcional a la concentración de rapamicina. Se puede construir una curva estándar con las concentraciones conocidas de rapamicina. De este modo, se puede calcular la concentración de rapamicina desconocida en una muestra de un paciente en base a la curva estándar. De un modo similar, se pueden detectar otros fármacos inmunosupresores mediante el marcaje de los receptores de proteína FKBP12 y de calcineurina para la detección de tacrolimus, o de una ciclofilina y de calcineurina para la detección de ciclosporina, con un fluoróforo donador y aceptor respectivamente.

La presente invención también incluye ensayos de doble receptor para tacrolimus (FK506) en los que se emplean las proteínas de fusión de la calcineurina A/B en combinación con FKBP12. Las proteínas de fusión de la calcineurina A/B pueden ser secuencias truncadas de la proteína nativa con marcadores en el extremo N- o C-terminal. De este modo, en una realización, se seleccionaron respectivamente proteínas de fusión de la calcineurina A/B marcadas con histidina en el extremo C-terminal, con pesos moleculares de 64 kDa (CNtAB-larga) y 26 kDa (CNtAB-corta), para ensayos de actividad de unión, en base a la expresión y cribado de solubilidad tanto en *E. coli* como en sistema libre de células. Cuando se expresan en *E. coli*, ambas fusiones CNtAB-larga y CNtAB-corta muestran un nivel de expresión sólido y las proteínas de fusión expresadas son estables y solubles. Se logró un grado de pureza de >90% para ambas proteínas de fusión mediante un simple proceso de purificación mediante captura por afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. Hay que destacar que un ensayo de referencia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF, del inglés *time-resolved fluorescence*) mostró un valor de CE50 de 0,77 nM para la unión de la CNtAB-larga purificada a la FKBP12, de un modo dependiente de FK506. No obstante, apenas se detectó la unión de la CNtAB-corta purificada a la FKBP12-FK506 en el ensayo. Un ensayo Biacore de resonancia del plasmón en superficie (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance) confirmó los resultados observados en el ensayo TRF anterior.

La presente invención también incluye equipos que contienen los reactivos del ensayo para la medición de fármacos inmunosupresores en muestras. El equipo también puede incluir varios contenedores, por ejemplo tubos, botellas, y similares. Preferiblemente, los equipos también incluyen las instrucciones para su uso. En una realización, el equipo contiene una primera y una segunda porciones de unión, donde la primera y la segunda porciones de unión se unen específicamente a un sitio de unión separado en el fármaco diana para formar un complejo en sándwich bajo el contacto de los reactivos con el fármaco. La primera y la segunda porciones de unión representan compuestos que se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en proteínas receptor y anticuerpos. En una realización, el equipo contiene una primera y una segunda proteínas receptor y un anticuerpo, donde la primera proteína receptor se une a una partícula de detección y el anticuerpo se une específicamente a la segunda proteína receptor. En esta realización, el anticuerpo específico para el segundo receptor puede, opcionalmente, estar unido a una segunda partícula de detección. Las porciones de unión individuales pueden proporcionarse en contenedores separados o mezcladas conjuntamente en un único contenedor.

En una realización, se proporciona un equipo para la detección de fármacos inmunosupresores, conteniendo dicho equipo un primer receptor y un segundo receptor que se unen específicamente a un fármaco inmunosupresor diana en dos sitios separados del fármaco inmunosupresor, conteniendo también cada uno de dichos primero y segundo receptores un marcador; y una gran variedad de partículas de detección, estando cada una de dichas partículas unida a un agente que se une a dicho marcador.

En una realización adicional, se proporciona un equipo para la detección de fármacos inmunosupresores en una muestra, conteniendo dicho equipo un primer reactivo que contiene una suspensión de una inmunofilina unida a una primera partícula de detección; un segundo reactivo que contiene una suspensión de una proteína receptor se selecciona de entre el grupo que consiste en una proteína asociada a FKBP-rapamicina, calcineurina y un anticuerpo para la calcineurina, dicho segundo receptor de proteínas unido a la partícula de detección, donde las partículas de detección están seleccionadas de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas.

En una realización alternativa, el equipo contiene un primer receptor y un segundo receptor donde tanto el primer como el segundo receptor están unidos al menos a una partícula de detección, y donde el primer y el segundo receptor se unen específicamente a sitios de unión separados en el fármaco diana para formar un complejo en sándwich bajo el contacto de los receptores con el fármaco. En una realización, se proporcionan las proteínas receptor del equipo con un marcador para unir el receptor a una partícula de detección, y se proporcionan las partículas de detección en un contenedor separado. En otra realización, se proporcionarán el primer y el segundo receptor con la partícula de detección ya unida al primer y al segundo receptores. La primera y la segunda proteínas receptor pueden proporcionarse en contenedores separados o mezcladas conjuntamente en un único contenedor. En una realización, el primer y el segundo receptor contienen un marcador biotinilado y la partícula de detección está unida a estreptavidina. En una realización, tanto el primer como el segundo receptores están unidos a una sola molécula de biotina. En una realización, la partícula de detección es una micropartícula unida a estreptavidina o a un anticuerpo específico para biotina. En una realización, el equipo contiene dos complejos, cada uno de los cuales contiene un receptor unido a una micropartícula mediante un enlace biotina-estreptavidina.

En una realización, se proporciona un equipo para la cuantificación de la cantidad de rapamicina o everolimus en una muestra. En esta realización, el equipo contiene un primer receptor que contiene una proteína de unión a FK506 unida a una partícula de detección, y un segundo receptor que contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) unida a una segunda partícula de detección. En una realización, el primer receptor contiene FKBP12 o FKBP25 y el segundo receptor se selecciona de entre el grupo que consiste en mTOR, yTOR1, yTOR2, y las FRBDs de mTOR, yTOR1, e yTOR2. En una realización alternativa, se proporciona un equipo para la cuantificación de la cantidad de tacrolimus presente en una muestra, donde los reactivos del equipo contienen un primer receptor que contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) unida a una partícula de detección y un segundo receptor que contiene calcineurina, o un fragmento o derivado de unión de la misma, unido a una partícula de detección. En una realización adicional, el equipo también contiene calmodulina y un ión de calcio, ya sea contenidos en contenedores separados o unidos a la calcineurina.

En una realización, se proporciona un equipo para la detección de rapamicina activa, conteniendo dicho equipo un primer reactivo que contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) enlazada a una primera partícula de detección; un segundo reactivo que contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) enlazada a una segunda partícula de detección, donde la primera y la segunda partícula de detección están independientemente seleccionadas de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas. En una realización adicional, se proporciona un equipo en el que la proteína FKBP es FKBP12 o FKBP25, y en el que la proteína asociada a FKBP-rapamicina se selecciona de entre el grupo que consiste en mTOR, el dominio de unión a FKBP de mTOR, yTOR1, el dominio de unión a FKBP de yTOR1, yTOR2, y el dominio de unión a FKBP de yTOR2.

En otra realización más, se proporciona un equipo para la cuantificación de la cantidad de ciclosporina, en el que los reactivos contienen un primer receptor que contiene una ciclofilina unida a una partícula de detección y un segundo receptor que contiene una calcineurina unida a una partícula de detección. En una realización adicional, el equipo también contiene calmodulina y un ión de calcio, ya sea contenidos en contenedores separados o unidos a la calcineurina.

Habitualmente, la partícula de detección de estos equipos es o bien un nanocápsula o una micropartícula, y en una realización la partícula de detección es una micropartícula de látex.

Los ejemplos siguientes se establecen para describir las realizaciones específicas.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de cDNA que codifica para yTOR1 FRBD e yTOR2 FRBD

Los cDNAs que codifican para los dominios de unión a la rapamicina FKBP12 de 90 aminoácidos de las TOR1 y TOR2 de levaduras (FRBD) fueron sintetizados químicamente por Blue Heron Biotechnology (Seattle, WA) con la siguiente secuencia optimizada de ácidos nucleicos:

Id. de Sec. Nº 1 (yTOR1 FRBD):

5' GAACTTTGGTATGAAGGACTCGAAGATGCATCTCGCCAATTTTTTGGTGAACACAATATC
GAAAAAATGTTTTCTACACTTGAACCCTTACACAAACACCTTGGAAATGAACCACAAACCCCTC
TCTGAAGTCTCCTTCAAAAATCCTTTGGCCGTGACCTTAACGACGCATATGAATGGCTTAAC
AACTACAAAAAATCTAAAGATATTAATAACCTGAATCAAGCATGGGACATCTATTACAACGTA
TTTCGCAAAATTACTCGTCAA 3'

5

Id. de Sec. Nº 2 (yTOR2 FRBD):

5' GAACAATGGTATGAAGGCCTGGATGATGCCTCTCGTCAATTCTTTGGTGAACACAATACA
GAAAAAATGTTTGCAGCGCTCGAACCCCTTATATGAAATGTTAAAACGTGGTCCAGAACTTTA
CGGAAATTTCTTTTCAAAATTTCTTTGGTCTGATCTCAATGATGCCTATGAATGGTTAATG
AATTATAAAAAAAGCAAAGATGTTAGCAACCTTAATCAAGCCTGGGATATTTACTATAACGTA
TTTCGCAAAATCGGTAAACAG 3'

10 Ejemplo 2: Construcción de vectores de expresión

Los cDNAs sintéticos, junto con dos juegos de cebadores de oligonucleótidos, se utilizaron para amplificar mediante PCR fragmentos de DNA de aproximadamente unas 300 pb, correspondientes a yTOR1 FRBD y a yTOR2 FRBD, y estos fragmentos de DNA se clonaron en el vector de expresión pIVEX2.7d o pIVEX2.8d (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Los plásmidos resultantes, confirmados mediante secuenciación de DNA, pueden expresar proteínas diana marcadas con AviTag que, no sólo son capaces de unirse a la FKBP-12 unida a rapamicina, sino que también pueden marcarse específicamente con biotina en un residuo de lisina único mediante la ligasa de biotina BirA.

Id. de Sec. Nº 3 (cebador directo para yTOR1 FRBD):

20

5' CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAACCTTTGGTATGAAGGACTC 3'

Id. de Sec. Nº 4 (cebador inverso para yTOR1 FRBD):

25

5' AAGATGTCGTTCCAGGCCCTTGACGAGTAATTTTGCAGAA 3'

Id. de Sec. Nº 5 (cebador directo para yTOR2 FRBD):

30

5' CGCTTAATTAACATATGACCGAACCAATGGTATGAAGGCCTG 3'

Id. de Sec. Nº 6 (cebador inverso para yTOR2 FRBD):

5' TTAGTTAGTTACCGGATCCCTTACTGTTTACCGATTTTGCAGAA 3'

35 Ejemplo 3: Producción de yTOR1 FRBD biotinilada e yTOR2 FRBD biotinilada en E. coli

Tras la selección utilizando el Sistema de Traducción Rápida acelular (RTS, del inglés Rapid Translation System) de Roche Diagnostics Corporation, las construcciones de expresión óptimas se transformaron en células BL21-A1, junto con el vector de expresión BirA, y se indujeron en presencia de 50 µM de biotina, arabinosa al 0,2% y 0,2 mM de isopropilo-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 30°C durante 16 horas. Las proteínas recombinantes expresadas se purificaron hasta una pureza de aproximadamente el 90% mediante cuentas de avidina modificada y cromatografía de exclusión por tamaño.

A continuación está la secuencia de aminoácidos para la yTOR1 FRBD recombinante (106 aminoácidos). La Lys 101 es el sitio específico para el marcaje con biotina dependiente de BirA. Esta proteína se une a la rapamicina en el sitio de unión de la FKBP12. La secuencia del marcador AviTag está indicada en letra negra, y la Lys 101 (K) es el sitio específico de marcaje con biotina dependiente de BirA.

Id. de Sec. Nº 7 (yTOR1 FRBD marcada con AviTag):

50

1 10 20 30 40 50 60
ELWYEGLEDASRQFFVEHNIKMFSTLEPLHKHLGNPQLSEVSFQKSFGRDLNDAYEWL
70 80 90 100
NNYKSKDINLNLQAWDIYINVFRKITRQGLNDI**FEAQK**I**EWHE**

A continuación está la secuencia de aminoácidos para la yTOR2 FRBD recombinante (119 aminoácidos). La Lys 12 es el sitio específico para el marcaje con biotina dependiente de BirA. Esta proteína se une a la rapamicina en el sitio de unión de la FKBP12. La secuencia del marcador AviTag está indicada en letra negra, y la Lys 12 (K) es el sitio específico de marcaje con biotina dependiente de BirA.

5

Id. de Sec. Nº 8 (yTOR2 FRBD marcada con AviTag):

```

1      10      20      30      40      50      60
MSGLNDIFEAQKIEWHEIEGRGRLIKHMTEQWYEGLDASRQFFGEHNTEKMFAALEPLYE
      70      80      90      100     110     120
MLKRGPETLREISFQNSFGRDLNDAYEWLMNYKKSQVSNLNQAWDIYYNVFRKIGKQ

```

10 Ejemplo 4: Construcción de vectores de expresión

Dos cebadores de oligonucleótidos se utilizaron para generar mediante PCR un fragmento de DNA, que codifica para FKBP12 con múltiples aminoácidos de glicina e histidina en el extremo carboxi-terminal, se clonaron en las dianas Nco I/Sma I del vector de expresión pIVEX2.7d. El plásmido resultante, confirmado mediante secuenciación de DNA, puede expresar una proteína de fusión con un peso molecular esperado de 15,0 kDa que puede unirse a rapamicina, a una matriz de NTA níquel y puede marcarse con biotina en la Lys específica para el marcador AviTag mediante la ligasa de biotina BirA.

15

20 Ejemplo 5: Producción de FKBP12 biotinilada (PM de 15 kDa) en E. coli

20

Se indujeron células transformadas con BL21-A1 que albergaban el vector de expresión anterior y un vector que expresa BirA, mediante arabinosa al 0,2% y 0,4 mM de isopropil IPTG a 30°C durante 16 horas. La proteína recombinante expresada se purificó hasta aproximadamente el 95% mediante purificaciones de afinidad secuenciales utilizando agarosa Ni-NTA y cuentas de Mono-Avidina (Pierce), respectivamente.

25

A continuación está la secuencia de aminoácidos para la proteína de unión a la rapamicina recombinante (134 aminoácidos). La Lys 129 es el sitio específico para el marcaje con biotina dependiente de BirA. Esta proteína se une a la rapamicina.

30

Id. de Sec. Nº 9: (FKBP12 marcada con AviTag):

```

1      10      20      30      40      50
MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKFKDSSRDRNKPFKFMGLGKQEVIRG
      60      70      80      90      100     110
WEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGGSHHHHHHG
      120     130
GLNDIFEAQKIEWHE

```

35 Ejemplo 6: Preparación de micropartículas recubiertas con FKBP12

35

Las micropartículas de estreptavidina (127nm) (SA-Latex Universalreagenz ZLF, Mat. No 03140431001) se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH, Alemania. La concentración final fue de 0,3% (peso/ volumen) en MOPS 50 mM (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico), pH 7,9.

40

La FKBP12 biotinilada del ejemplo 5 (32 µL de 3,27 mg/ml) se añadió a 5,2 ml de tampón MOPS 50 mM (pH 7,9). Esta solución de proteína biotinilada se añadió a 5,2 ml de una suspensión agitada de micropartículas de estreptavidina (127 nm) al 0,3% (peso/volumen) en MOPS 50 mM (pH 7,9), todo a la vez a temperatura ambiente. La reacción se dejó agitándose a temperatura ambiente durante 2 horas y durante toda la noche a 4°C, y entonces se centrifugó a 16.000 rpm durante 1 hora y 45 minutos. Las micropartículas se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM (pH 7,9) y entonces se centrifugaron a 16.000 rpm. Los procesos de resuspensión y centrifugación se repitieron una vez más, y se ajustó la concentración final de las micropartículas recubiertas con FKBP12 al 0,15% (peso/volumen).

45

Ejemplo 7: Preparación de micropartículas recubiertas con yTOR1 FRBD y con yTOR2 FRBD

50

La yTOR1 FRBD biotinilada del ejemplo 3 (300 µL de 0,35 mg/ml) se añadió al tampón MOPS 50 mM (pH 7,9). Esta solución de proteína biotinilada se añadió a 5.2 ml de suspensión agitada de micropartículas de estreptavidina (127 nm) al 0,3% (peso/volumen) en MOPS 50 mM (pH 7,9), todo a la vez a temperatura ambiente. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y se dejó durante la noche a 4°C, y entonces se centrifugó

a 16.000 rpm durante 1 hora y 45 minutos. Las micropartículas se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM (pH 7,9) y entonces se centrifugaron a 16.000 rpm. Los procesos de resuspensión y centrifugación se repitieron una vez más, y se ajustó la concentración final de las micropartículas recubiertas con yTOR1 FRBD al 0,15% (peso/ volumen).

- 5 La preparación de las micropartículas recubiertas con yTOR2 FRBD utilizando la yTOR2 FRBD del ejemplo 3 se realizó tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 8: Curvas de calibración de rapamicina utilizando muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco

10 Se preparó un reactivo tampón de la reacción produciendo un tampón PIPES 175 mM, pH 7,4, que contiene ácido poliacrílico (PAA, del inglés polyacrylic acid) al 0,5%. Este fue un primer reactivo de trabajo.

15 La mezcla de micropartículas recubiertas con FKBP12 y micropartículas recubiertas con yTOR1 FRBD en una proporción de 1:1 (v/v) proporcionó un segundo reactivo de trabajo. Se preparó un segundo reactivo de trabajo alternativo mediante la mezcla de micropartículas recubiertas con FKBP12 y micropartículas recubiertas con yTOR2 FRBD en una proporción de 1:1 (v/v).

20 Se obtuvieron calibradores a partir de un conjunto de muestras de sangre total con EDTA mediante la adición de rapamicina a las concentraciones de 0, 5, 10, 20, y 30 ng/ml utilizando una solución de reserva de rapamicina de 1 µg/mL en metanol. El tratamiento previo de las muestras de sangre se llevó a cabo utilizando un reactivo de precipitación de proteínas de una mezcla de metanol y sulfato de zinc acuoso en una proporción de 4:1 (300 mM).

25 Se añadieron doscientos µL de sangre total a 200 µL del reactivo de precipitación y se vortearon durante 15-30 segundos, dejándolos reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un recipiente para muestras y se colocó en el analizador.

30 El primer reactivo de trabajo (tampón de reacción) se colocó en el rotor para reactivos R1 y el segundo reactivo de trabajo (reactivo de micropartículas) en el rotor para reactivos R2. Se realizó un ensayo utilizando un analizador automatizado Roche/Hitachi 917 (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis) utilizando un volumen de muestra de 35 µL, 150 µL del primer reactivo de trabajo y 80 µL del segundo reactivo de trabajo (medición a una longitud de onda de 480 nm) durante 10 minutos. La curva de calibración para el ensayo de rapamicina utilizando yTOR1 FRBD se muestra en la Figura 1. La curva de calibración para el ensayo de rapamicina utilizando yTOR2 FRBD se muestra en la Figura 2.

35 En otro ensayo, en trece muestras individuales de sangre total obtenidas de 13 voluntarios, se añadieron varias concentraciones de rapamicina, cubriendo un rango de 0-48 ng/ml (se utilizaron 26 muestras en total). Cada una de las 26 muestras se midió de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, utilizando un analizador automatizado Roche/Hitachi 917. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 3 y hacen referencia al ensayo que se realizó utilizando yTOR2 FRBD.

Ejemplo 9: Síntesis de cDNA que codifica para mTOR FRBD

45 El cDNA que codifica para los dominios de unión a la rapamicina FKBP12 de 90 aminoácidos de mTOR (FRBD) se sintetizaron químicamente por Blue Heron Biotechnology con la siguiente secuencia optimizada de ácidos nucleicos:

Id. de Sec. Nº 10 (mTOR FRBD):

```
5' gaaatgtggcatgaaggacttgaagaagctagccgtctctattttggtgaacgcaacgta
aaaggaatgtttgaagtacttgaacctttacacgcaatgatggaacgtggaccccaaacctta
aaagaaacctcctttaatcaagcatatggtcgtgactaatggaagctcaagaatggtgctgt
aaatatatgaaatctggtaatgtaaaagatttaactcaagcctgggatttatactatcacgtt
ttccgcggtatctcaaaacaa 3'
```

Ejemplo 10: Construcción de vectores de expresión

Id. de Sec. Nº 11 (cebador 1 para la mTOR FRBD):

5' CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAAATGTGGCATGAAGGACTTGAA 3'

55

Id. de Sec. Nº 12 (cebador 2 para la mTOR FRBD):

5' AAGATGTCGTTTCAGGCCCCCTTGTGTTTGGAGATACGGCGGAA 3'

60 Los dos cebadores de oligonucleótidos anteriores y el cDNA que codifica para mTOR FRBD descrito anteriormente se utilizaron para amplificar mediante PCR un fragmento de DNA de 310 pb, y se clonó en las dianas Nco I/Sma I

del vector de expresión pIVEX2.7d. El plásmido resultante, confirmado mediante secuenciación del DNA, puede expresar una proteína de fusión que es capaz de unirse a FKBP12 unida a rapamicina y puede marcarse con biotina mediante la utilización de una ligasa de biotina BirA.

5 Ejemplo 11: Producción de mTOR FRBD biotinilada en E. coli

Se utilizó el Sistema de Traducción Rápida acelular (RTS) de Roche para producir la mTOR FRBD marcada con biotina y con marcador AviTag. El plásmido purificado de DNA se incubó tanto con el reactivo de la reacción RTS como con el reactivo de biotinilación en un aparato de reacción RTS 500 ProteoMaster durante 18 horas. La proteína recombinante generada se purificó hasta una pureza de aproximadamente el 95% mediante la utilización de cuentas de avidina modificadas.

La secuencia de aminoácidos de esta FRBD recombinante (107 aminoácidos) es la siguiente (Lys 102 es el sitio específico para el marcaje con biotina dependiente de BirA):

15 Id. de Sec. Nº 13 (mTOR FRBD marcada con AviTag):

```

1         10        20        30        40        50
MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMPFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ

60        70        80        90        100
EWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SKQGLNDIFEAQKIEWHE

```

20 Ejemplo 12: Preparación de micropartículas recubiertas con FKBP12

Las micropartículas recubiertas con FKBP12 se prepararon siguiendo un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 6. Las micropartículas de estreptavidina (SA-Latex Universalreagenz ZLF, Mat. No 03140431001) se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH, Alemania (127 nm). La concentración final fue de 0,3% (peso/volumen) en MOPS 50 mM (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico), pH 7,9.

25 La FKBP12 biotinilada (40 µL de 2,5 mg/ml) se añadió a 5 ml de tampón MOPS 50 mM (pH 7,9). Esta solución de proteína biotinilada se añadió a 5 ml de una suspensión agitada de micropartículas de estreptavidina (127 nm) al 0,3% en MOPS 50 mM (pH 7,9), todo a la vez a temperatura ambiente. La reacción se dejó agitándose a temperatura ambiente durante 2 horas y se dejó durante la noche a 4°C, y entonces se centrifugó a 16.000 rpm durante 1 hora y 45 minutos. Las micropartículas se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM (pH 7,9) y entonces se centrifugaron a 16.000 rpm. Los procesos de resuspensión y centrifugación se repitieron una vez más, y se ajustó la concentración final de las micropartículas recubiertas con FKBP12 al 0,15% (peso/volumen).

35 Ejemplo 13: Preparación de micropartículas recubiertas con mTOR FRBD

La mTOR1 FRBD biotinilada del ejemplo 11 (50 µL de 2 mg/ml) se añadió a 5 ml de tampón MOPS (pH 7,9). Esta solución de proteína biotinilada se añadió a 5 ml de suspensión agitada de micropartículas de estreptavidina (127 nm) al 0,3% en MOPS 50 mM (pH 7,9), todo a la vez. La reacción se dejó agitándose a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces se centrifugó a 16.000 rpm durante 1 hora y 45 minutos, y se ajustó la concentración final de las micropartículas de proteína-estreptavidina al 0,15% (peso/volumen).

40 Ejemplo 14: Curvas de calibración de rapamicina utilizando muestras de sangre total en las que se ha añadido el fármaco

45 La mezcla de micropartículas recubiertas con FKBP12 y micropartículas recubiertas con mTOR1 FRBD en una proporción de 1:1 (v/v) proporcionó un primer reactivo de trabajo. Este reactivo se utilizó a una concentración final del 0,15% en tampón MOPS 50 mM a pH 7,9.

50 Se preparó un segundo reactivo de trabajo produciendo un tampón PIPES de 175 mM, pH 7,4, que contiene ácido poliacrílico (PAA, del inglés polyacrylic acid) al 0,8%.

Se obtuvieron calibradores a partir de muestras de sangre total con EDTA en las que se habían añadido 12,5, 25, y 50 ng/ml de rapamicina (a partir de una solución de reserva de 10 µg/mL de rapamicina en metanol). El tratamiento previo de las muestras de sangre se llevó a cabo utilizando la precipitación de proteínas con una solución de metanol y sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso.

55 Se añadieron 200 µL de sangre total a 200 µL de metanol, seguido inmediatamente de 50 µL de CuSO₄ a 300mM. Esto se vortexó durante 15-30 segundos, dejándose reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un recipiente para muestras y se colocó en el analizador automatizado Roche/Hitachi 917 Roche Diagnostics Corporación, Indianápolis).

60

Se realizó un ensayo utilizando un volumen de muestra de 20 µL, 80 µL del primer reactivo de trabajo y 180 µL del segundo reactivo de trabajo, y medición a una longitud de onda de 480 nm. Los resultados se muestran en la Figura 4.

5

Ejemplo 15: Ensayo de rapamicina utilizando muestras de sangre total

Se añadió rapamicina 25 ng/ml a una muestra de sangre humana, extraída siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad, y se determinó la concentración utilizando la curva de calibración que se muestra en la Figura 4, que fue de 24,7 ng/ml y 24,6 ng/ml en ensayos por duplicado.

10

Ejemplo 16: Producción de fusiones de calcineurina A y B recombinante truncada (CNtABs) en E. coli

cDNAs de calcineurina A y B truncada

15

El cDNA que codifica para la calcineurina A humana truncada (aminoácidos 12-394) y para la cadena B natural (aminoácidos 1-170) sintetizado químicamente por Blue Heron Biotechnology (Seattle, WA) con la siguiente secuencia optimizada de ácidos nucleicos (Id. de Sec. N° 14):

```

5' TCAACCACTGATCGTGTGCGTTAAAGCTGTCCCGTTTCCACCGAGCCACCGCTTAACTGCAAAA
GAAGTTTTGATAACGACGGAAAACCGCGTGTGATATCCTTAAAGCACATCTGATGAAGGAAGG
CCGTTTAGAAGAATCAGTAGCGCTGCGTATCATTACCGAAGGAGCGTCAATCTTACGTCAAGAAA
AAAATCTGCTCGACATCGATGCACCGGTTACCGTATGTGGTGATATTCATGGTCAGTTTTTCGCAC
TTAATGAAATTATTTGAAGTGGGTGGTTCTCCGGCTAACACTCGTTATCTCTTTCGGGTGATTA
CGTCGATCGTGGCTACTTTTCTATTGAGTGTGTCTGTACCTGTGGGCATTAAAAATTCCTTTATC
CAAAAATCTTTTCTTACTGCGTGGCAATCATGAATGTCGTCATCTGACCGAATACTTCACTTTT
AAACAAGAAATGTAATAATCAAAATATAGCGAACGTGTGTATGATGCTTGTATGGATGCCTTTGATG
CTTACCCTTAGCCGCCTTAATGAACCAACAATTCCTGTGTGTACATGGTGGCCTTAGCCCCGAAA
TTAACACCTTAGATGATATCCGTAATTAGATCGTTTTAAAGAACACCCCGCTTATGGCCCCGATG
TGTGATATCTTGTGGTCGGATCCTCTGGAAGATTTGGTAACGAAAAAACTCAGGAACATTTTAC
TCATAACACCGTTTCGTGGCTGTAGTTATTTCTATTCTTACCCAGCCGTGTGCGAATTCTTCAAC
ACAACAACCTGCTGAGTATTCTCCGCGCCCATGAAGCCCAAGATGCCGGTTATCGTATGTATCGT
AAATCACAGACCACCGGGTCCCATCTCTCATTACGATTTTTTCTGCCCGAACTACCTTGACGT
TTACAATAATAAAGCCGCTGTTCTGAAATATGAAAACAACGTCATGAATATTCGCCAATTCATT
GCAGCCCTCACCTTATTGGCTTCCCAATTTATGGACGTGTTTACCTGGTCACTGCCATTTGTC
GGTGAGAAAGTTACTGAAATGCTTGTTAATGTTCTGAACATCTGTAGCGATGATGAATTAGGGTC
CGAAGAAGACGGGTTTGACGGTGCCACAGCTGCCGCGCGCAAAGAAATGGGCAACGAAGCATCCT
ATCCACTTGAAATGTGTTCTCATTGATGCGATGAAATTAACGCTTAGGTAAACGGTTTAAA
AACTTGATCTTGATAACTCTGGCTCCCTTCTGTGGAAGAATTTATGTCCTTACCGGAGCTGCA
GCAGAACCCTCTGGTCCAACGCGTAATTGATATCTTTGACACCGATGGAAATGGCGAAGTCGATT
TTAAGAATTTATTGAAGGTGTTTCTCAATTTAGCGTAAAGGGTGACAAAGAACAGAACTGCGT
TTCGATTCCGCATCTATGACATGGATAAAGATGGTTATATCTCAAACGGGGAATGTTCCAGGT
TTTAAAAATGATGGTAGGCAACAATTTAAAAGATACCCAATTACAACAAATTTGTAGATAAAACGA
TTATTAACGCAGATAAGGATGGTGTGATGGTCGCATTTCTTTGGAAGAGTTCTGCGCCGTTGTGGGA
GGTCTTGATATTCATAAAAAAATGGTCTGTCGATGTC 3'
    
```

20

Construcción de los vectores de expresión

El cDNA sintético de arriba, junto con dos juegos de cebadores de oligonucleótidos, se utilizaron para amplificar mediante PCR dos fragmentos de DNA, correspondientes a CNtAB-larga y a CNtAB-corta, respectivamente. Estos fragmentos de DNA se clonaron en el vector de expresión libre de células de Roche pIVEX2.3d a fin de expresar dos versiones diferentes de las proteínas quiméricas de calcineurina A/B marcadas con histidina.

25

Primer directo para la CNtAB-larga (Id. de Sec. N° 15):

30

5' CTTAAGAAGGAGATATACCATGTCAACCACTGATCGTGTGTCGT 3'

Cebador inverso para la CNtAB-larga (Id. de Sec. N° 16):

35

5' TGATGATGAGAACCCCCCGACATCGACGACCATTTTTTTT 3'

Cebador directo para la CNtAB-corta (Id. de Sec. N° 17):

40

5' CTTAAGAAGGAGATATACCATGCCTTATTGGCTTCCCAATTTT 3'

Cebador inverso para la CNtAB-corta (Id. de Sec. N° 18):

5' TGATGATGAGAACCCCCCGACATCGACGACCATTTTTT 3'

5 Producción de las proteínas de fusión de la calcineurina A y B humana marcada con histidina

Tras la preselección mediante el Sistema de Traducción Rápida acelular (RTS) de Roche, las construcciones de expresión óptima seleccionadas se transformaron en células BL21-A1, y las proteínas diana se expresaron mientras se indujeron en presencia de arabinosa al 0,2% y 0,4 mM de IPTG a 37°C durante 15 horas. Las proteínas recombinantes expresadas, CNtAB-larga o CNtAB-corta, se purificaron hasta una pureza de aproximadamente el 85% o el 95%, respectivamente, mediante purificación de afinidad en agarosa Ni-NTA seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE).

15 La secuencia de aminoácidos de la proteína CNtAB-larga recombinante (564 aminoácidos) es la siguiente (Id. de Sec. N° 19):

```

1      10      20      30      40      50      60
MSTTDRVVKA VPFPPSHRLTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLEESVALRIITEGAS

      70      80      90      100     110     120
ILRQEKNLID IDAPVTVCGDIHGQFFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECV

      130     140     150     160     170     180
LYLWALKILY PKTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQECKIKYSERVYDACMDAFDCLPLAAL

      190     200     210     220     230     240
MNQQFLCVHGGLSPEINTLDDIRKLRDFKEPPAYGPMCDI LWSDPLEDFGNEKTQEHFTH

      250     260     270     280     290     300
NTVRGCSYFY SYPVACEFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTGFPSLITIFSAFN

      310     320     330     340     350     360
YLDVYNNKAA VLKYENNVNIRQFNCSPHYWLPNFMDFVTWVSLPFVGEKVTEMLVNVLN

      370     380     390     400     410     420
ICSDDELGSE EDGFDGATAAARKEMGNEASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFKKLDDLNSG

      430     440     450     460     470     480
SLSVEEFMSLP ELQONPLVQRVIDIFD TDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDKQKLRFAF

      490     500     510     520     530     540
RIYDMDKDGYI SNGELFQVLKMMVGNNLKDTQLQQIVDKTI INADKGDGGRISFEEFCAV

      550     560
VGGLDIHKM VVDVGGGSHHHHHH
    
```

20 La CNtA1, correspondiente a los aminoácidos 12-394 de la calcineurina A humana, está en letra cursiva (en las posiciones 2-384). La CNB, correspondiente a los aminoácidos 1-170 de la calcineurina B humana, está en letra subrayada (en las posiciones 385-554). El marcador de histidina está en las posiciones 555-564.

25 La secuencia de aminoácidos de la proteína CNtAB-corta recombinante (236 aminoácidos) es la siguiente (Id. de Sec. N° 20):

1 10 20 30 40 50 60
MPYWLPNFMDVFTWSLPFVGEKVTMLVNVLNICSDDELGSEEDGFDGATAAARKEMGNE
70 80 90 100 110 120
ASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFFKLLDLDNSGSLSVVEEFMSLPELQQNPLVQRVIDIFDT
130 140 150 160 170 180
DGNGEVDFKRFIEGVSQFSVKGDKEQKLRFAFRIYDMDKDGYSNGELFQVLKMMVGNL
190 200 210 220 230
KDTQLQQIVDKTIINADKGDGRISFEEFCAVVGGLDIHKKMVVVDVGGGSHHHHHH

5 La CNTA2, correspondiente a los aminoácidos 340-394 de la calcineurina A humana, está en letra cursiva (en las posiciones 2-56). La CNB, correspondiente a los aminoácidos 1-170 de la calcineurina B humana, está en letra subrayada (en las posiciones 57-226). El marcador de histidina está en las posiciones 227-236.

Ejemplo 17. Interacción de FKBP12 con la CNtAB-larga dependiente de FK506.

10 La actividad de unión de las fusiones de calcineurina A/B truncada, CNtABs, a las FKBP12 unidas a FK506 se evaluó mediante un ensayo de referencia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) y otros ensayos. En el ensayo TRF, se recubrió una placa negra de 96 pocillos (Perkin Elmer) durante la noche a 4°C con CNtAB-larga o CNtAB-corta purificada y marcada con histidina en NaHCO₃ 0,1 M. Entonces, la placa recubierta con proteínas se bloqueó con BSA (seroalbúmina bovina) al 7,5% en un tampón A que contiene Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y ácido dietilenti-
15 triamina-pentaacético (DTPA) 20 µM. Mientras tanto, se preparó un conjugado de FKBP12-europio (Eu) mediante la incubación de la FKBP12 marcada con biotina del Ejemplo 5 con estreptavidina marcada con europio (Perkin-Elmer) en hielo durante 30 minutos. Tras el bloqueo, una placa de 96 pocillos recubierta se lavó con un tampón B que contiene Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, TWEEN 0,1% (ICI Americas, Inc.) y DTPA 20 µM. Entonces se añadió el conjugado preparado de FKBP12-Eu a la placa recubierta con CNtAB-larga o conCNtAB-corta. Se añadieron a la placa una serie de diferentes concentraciones de FK506 para iniciar la formación de complejos FKBP12-FK506-CNtABs.
20 Tras una hora y media de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó varias veces con el tampón B. Finalmente, se añadió la solución de potenciación (Perkin-Elmer) a la placa, y se incubó a temperatura ambiente con agitación moderada durante 5 min. Entonces se leyó la placa utilizando un lector de placas microtituladas múltiple VICTOR2V, Wallac, Inc. Los valores de fluorescencia relativa que se describen están derivados a partir de la media de tres resultados.

25 En la Figure 5, una curva de FK506 dosis-dependiente muestra un valor EC50 de 0,77 nM para la unión de la CNtAB-larga a FKBP12. En cambio, la unión de la CNtAB-corta a la FKBP12 unida a FK506 apenas se detecta. Además, un ensayo de resonancia de plasmón en superficie BIACORE (Biacore AG) también se muestra en concordancia con estos resultados obtenidos mediante ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo (no se muestran los datos). En conjunto, estos datos indican que la CNtAB-larga recombinante es funcional pero la funcionalidad de la CNtAB-corta es poco probable.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Sigler, Gerald F.
Tsai, Jane S. C.
Ghoshal, Mitali
Rashid, Shaker
Wu, Yifei
40 Dorn, Allan

<120> Ensayo De Aglutinación Homogéneo De Doble Receptor Para Fármacos Inmunosupresores

<130> 23514 WO

45 <140>
<141>

<150> 60/807,245
50 <151> 2006-07-13

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 3.3

55 <210> 1

<211> 270
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 1

```

gaactttggt atgaaggact cgaagatgca tctcgccaat tttttgttga acacaatatac 60
gaaaaaatgt tttctacact tgaaccctta cacaacacc ttggaaatga accacaaacc 120
ctctctgaag tctcctttca aaaatccttt ggccgtgacc ttaacgacgc atatgaatgg 180
cttaacaact acaaaaaatc taaagatatt aataacctga atcaagcatg ggacatctat 240
tacaacgtat ttcgcaaaat tactcgtcaa 270
    
```

10 <210> 2
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción sintética

<400> 2

```

gaacaatggt atgaaggcct ggatgatgcc tctcgtcaat tctttggtga acacaatatac 60
gaaaaaatgt ttgcagcgc tgaaccctta tatgaaatgt taaaacgtgg tccagaaact 120
ttacgggaaa tttcctttca aaattccttt ggctcgtgac tcaatgatgc ctatgaatgg 180
ttaatgaatt ataaaaaaag caaagatggt agcaacctta atcaagcctg ggatatttac 240
tataacgtat ttcgcaaaat cggtaaacag 270
    
```

20 <210> 3
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 3

30 cttaagaag gagatatacc atggaacttt ggtatgaagg actc 44

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 4

40 aagatgtcgt tcaggcccc ttgacgagta atttgcgaa a 41

<210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 5

50 cgcttaatta aacatatgac cgaacaatgg tatgaaggcc tg 42

<210> 6
 <211> 44
 <212> DNA

55 <210> 6
 <211> 44
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

5

<400> 6

ttagttagt accgcatccc ttactgttta ccgattttgc gaaa 44

<210> 7

10

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción artificial

<400> 7

```

Glu Leu Trp Tyr Glu Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Val
 1          5          10          15
Glu His Asn Ile Glu Lys Met Phe Ser Thr Leu Glu Pro Leu His Lys
          20          25          30
His Leu Gly Asn Glu Pro Gln Thr Leu Ser Glu Val Ser Phe Gln Lys
          35          40          45
Ser Phe Gly Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Asn Asn Tyr
          50          55          60
Lys Lys Ser Lys Asp Ile Asn Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr
          65          70          75          80
Tyr Asn Val Phe Arg Lys Ile Thr Arg Gln Gly Gly Leu Asn Asp Ile
          85          90          95
Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
          100          105
    
```

20

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción artificial

<400> 8

```

Met Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1          5          10          15
Glu Ile Glu Gly Arg Gly Arg Leu Ile Lys His Met Thr Glu Gln Trp
          20          25          30
Tyr Glu Gly Leu Asp Asp Ala Ser Arg Gln Phe Phe Gly Glu His Asn
          35          40          45
Thr Glu Lys Met Phe Ala Ala Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Met Leu Lys
          50          55          60
Arg Gly Pro Glu Thr Leu Arg Glu Ile Ser Phe Gln Asn Ser Phe Gly
          65          70          75          80
Arg Asp Leu Asn Asp Ala Tyr Glu Trp Leu Met Asn Tyr Lys Lys Ser
          85          90          95
Lys Asp Val Ser Asn Leu Asn Gln Ala Trp Asp Ile Tyr Tyr Asn Val
          100          105          110
Phe Arg Lys Ile Gly Lys Gln
          115
    
```

<210> 9
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción artificial

<400> 9

```

Met Gly val Gln val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
 1          5          10          15
Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys val val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
 20          25          30
Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
 35          40          45
Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly val
 50          55          60
Ala Gln Met Ser val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
 65          70          75          80
Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
 85          90          95

Thr Leu val Phe Asp val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Ser
 100          105
His His His His His His Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
 115          120          125
Lys Ile Glu Trp His Glu
 130
    
```

10

<210> 10
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción Sintética

<400> 10

```

gaaatgtggc atgaaggact tgaagaagct agccgtctct attttggtga acgcaacgta 60
aaaggaatgt ttgaagtact tgaaccttta cagcgaatga tggaacgtgg accccaaacc 120
ttaaaagaaa cctcctttaa tcaagcatat ggtcgtgact taatggaagc tcaagaatgg 180
tgtcgtaaat atatgaaatc tggtaatgta aaagatttaa ctcaagcctg ggatttatac 240
tatcacgttt tccgccgtat ctcaaaaaca
 270
    
```

20

<210> 11
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 11

30 cttaaagaag gagatatacc atggaaatgt ggcatagaagg acttgaa 47

<210> 12
 <211> 41
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

5

<400> 12

aagatgctgt tcaggcccc ttgtttgag atacggcgga a 41

<210> 13

10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción Sintética

<400> 13

```

Met Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe
 1          5          10
Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His
          20          25          30
Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn
          35          40          45
Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys
 50          55          60
Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu
 65          70          75          80
Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gln Gly Gly Leu Asn Asp
          85          90          95
Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
          100          105
    
```

<210> 14

20

<211> 1659

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción Sintética

<400> 14

```

tcaaccactg atcgtgtcgt taaagctgtc ccgtttccac cgagccaccg cttaaactgca 60
aaagaagttt ttgataacga cggaaaaccg cgtgttgata tccttaaagc acatctgatg 120
aaggaaggcc gtttagaaga atcagtagcg ctgctgatca ttaccgaagg agcgtcaatc 180
ttacgtcaag aaaaaaatct gctcgacatc gatgcaccgg ttaccgatg tggtgatatt 240
catggtcagi ttttcgactt aatgaaatta tttgaagtgg gtggttctcc ggctaacact 300
cgttatctct ttctgggtga ttacgtcgat cgtggctact tttctattga gtgtgttctg 360
tacctgtggg cattaaaaat tctttatcca aaaactcttt tcttactgcg tggcaatcat 420
gaatgtcgtc atctgaccga atacttcact tttaaacaag aatgtaaaat caaatatagc 480
gaacgtgtgt atgatgcttg tatggatgcc tttgattgct tacccttagc cgccttaatg 540
aaccaacaat tctgtgtgtg acatggtggc cttagccccg aaattaacac cttagatgat 600
atccgtaaat tagatcgttt taaagaacca cccgcttatg gcccgatgtg tgatatcttg 660
tggtcggatc ctctggaaga ttttgtaac gaaaaaactc aggaacattt tactcataac 720
accgttcgtg gctgtagtta tttctattct taccagccg tgtgcaatt cettcaacac 780
aacaacctgc tgagtattct ccgcgccat gaagcccaag atgccggtta tcgatgtat 840
cgtaaatcac agaccaccgg gttcccatct ctctattcga tttttctgc cccgaactac 900
cttgacgttt acaataataa agccgctgtt ctgaaatag aaaacaacgt catgaatatt 960
cgccaattca attgcagccc tcaccttat tggcttccca attttatgga cgtgtttacc 1020
tggtcactgc catttgcgg tgagaagt actgaaatgc ttgtaatgt tctgaacac 1080
tgtagcgatg atgaattagg gtccgaagaa gacgggttg acggtgccac agctgcccg 1140
cgcaaagaaa tgggcaacga agcatcctat ccacttgaaa tggtttctca tttgatgcc 1200
gatgaaatta aacgcttagg taaacggtt aaaaaactg atcttgataa ctctggctcc 1260
ctttctgtgg aagaatttat gtcctaccg gagctgcagc agaaccctct ggtccaacgc 1320
gtaattgata tctttgacac cgatggaaat ggcgaagtgc attttaaaga atttattgaa 1380
gggtgtttctc aatttagcgt aaaggtgac aaagaacaga aactgcgttt cgcattccgc 1440
atctatgaca tggataaaga tggttatct tcaaacgggg aattgttcca ggttttaaaa 1500
atgatggtag gcaacaattt aaaagatacc caattacaac aaattgtaga taaaacgatt 1560
attaacgcag ataaggatgg tgatggtcgc atttcttctg aagagtctg cgccgttctg 1620
ggaggtcttg atattcataa aaaaatggtc gtcgatgtc 1659

```

<210> 15
 <211> 43
 <212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer Sintético

10 <400> 15
 cttaagaag gagatatacc atgtcaacca ctgatcgtgt cgt 43

<210> 16
 <211> 41
 <212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer Sintético

20 <400> 16
 tgatgatgag aaccccccc gacatcgacg accattttt t 41

<210> 17
 <211> 44
 <212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer Sintético

30 <400> 17
 cttaagaag gagatatacc atgccttatt ggttcccaa tttt 44

<210> 18
 <211> 41
 <212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer Sintético

<400> 18

tgatgatgag aaccccccc gacatcgacg accattttt t 41

5

<210> 19

<211> 564

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción Sintética

<400> 19

15

```

Met Ser Thr Thr Asp Arg Val Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Ser
 1          5          10          15
His Arg Leu Thr Ala Lys Glu Val Phe Asp Asn Asp Gly Lys Pro Arg
          20          25          30
Val Asp Ile Leu Lys Ala His Leu Met Lys Glu Gly Arg Leu Glu Glu
          35          40          45
Ser Val Ala Leu Arg Ile Ile Thr Glu Gly Ala Ser Ile Leu Arg Gln
          50          55          60
Glu Lys Asn Leu Leu Asp Ile Asp Ala Pro Val Thr Val Cys Gly Asp
 65          70          75          80
Ile His Gly Gln Phe Phe Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly
    
```

				85					90					95			
Ser	Pro	Ala	Asn	Thr	Arg	Tyr	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg		
			100					105					110				
Gly	Tyr	Phe	Ser	Ile	Glu	Cys	Val	Leu	Tyr	Leu	Trp	Ala	Leu	Lys	Ile		
		115					120					125					
Leu	Tyr	Pro	Lys	Thr	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Gly	Asn	His	Glu	Cys	Arg		
	130					135					140						
His	Leu	Thr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Lys	Gln	Glu	Cys	Lys	Ile	Lys	Tyr		
145					150					155					160		
Ser	Glu	Arg	Val	Tyr	Asp	Ala	Cys	Met	Asp	Ala	Phe	Asp	Cys	Leu	Pro		
				165					170					175			
Leu	Ala	Ala	Leu	Met	Asn	Gln	Gln	Phe	Leu	Cys	Val	His	Gly	Gly	Leu		
			180					185					190				
Ser	Pro	Glu	Ile	Asn	Thr	Leu	Asp	Asp	Ile	Arg	Lys	Leu	Asp	Arg	Phe		
		195					200					205					
Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Gly	Pro	Met	Cys	Asp	Ile	Leu	Trp	Ser	Asp		
	210					215					220						
Pro	Leu	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Glu	Lys	Thr	Gln	Glu	His	Phe	Thr	His		
225					230					235					240		
Asn	Thr	Val	Arg	Gly	Cys	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Ala	Val	Cys		
				245					250					255			
Glu	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Asn	Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	Arg	Ala	His	Glu		
			260					265					270				
Ala	Gln	Asp	Ala	Gly	Tyr	Arg	Met	Tyr	Arg	Lys	Ser	Gln	Thr	Thr	Gly		
		275					280					285					
Phe	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr	Ile	Phe	Ser	Ala	Pro	Asn	Tyr	Leu	Asp	Val		
	290					295					300						
Tyr	Asn	Asn	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Met	Asn		
305					310					315					320		
Ile	Arg	Gln	Phe	Asn	Cys	Ser	Pro	His	Pro	Tyr	Trp	Leu	Pro	Asn	Phe		
				325					330					335			
Met	Asp	Val	Phe	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Thr		
			340					345					350				
Glu	Met	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Asn	Ile	Cys	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Gly		
		355					360					365					
Ser	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Asp	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu		
	370					375					380						
Met	Gly	Asn	Glu	Ala	Ser	Tyr	Pro	Leu	Glu	Met	Cys	Ser	His	Phe	Asp		
385					390					395					400		
Ala	Asp	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Gly	Lys	Arg	Phe	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu		
				405					410					415			
Asp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Phe	Met	Ser	Leu	Pro	Glu		
			420					425					430				
Leu	Gln	Gln	Asn	Pro	Leu	Val	Gln	Arg	Val	Ile	Asp	Ile	Phe	Asp	Thr		
			435				440					445					

Asp Gly Asn Gly Glu Val Asp Phe Lys Glu Phe Ile Glu Gly Val Ser
 450 455 460
 Gln Phe Ser Val Lys Gly Asp Lys Glu Gln Lys Leu Arg Phe Ala Phe
 465 470 475
 Arg Ile Tyr Asp Met Asp Lys Asp Gly Tyr Ile Ser Asn Gly Glu Leu
 485 490 495
 Phe Gln Val Leu Lys Met Met Val Gly Asn Asn Leu Lys Asp Thr Gln
 500 505 510
 Leu Gln Gln Ile Val Asp Lys Thr Ile Ile Asn Ala Asp Lys Asp Gly
 515 520 525
 Asp Gly Arg Ile Ser Phe Glu Glu Phe Cys Ala Val Val Gly Gly Leu
 530 535 540
 Asp Ile His Lys Lys Met Val Val Asp Val Gly Gly Gly Ser His His
 545 550 555 560
 His His His His

<210> 20

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Construcción Sintética

10

<400> 20

Met 1 Pro Tyr Trp Leu 5 Pro Asn Phe Met Asp 10 Val Phe Thr Trp Ser 15 Leu
 Pro Phe Val Gly 20 Glu Lys Val Thr Glu 25 Met Leu Val Asn Val 30 Leu Asn
 Ile Cys Ser 35 Asp Asp Glu Leu Gly 40 Ser Glu Glu Asp Gly 45 Phe Asp Gly
 Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys 55 Glu Met Gly Asn Glu 60 Ala Ser Tyr Pro
 Leu 65 Glu Met Cys Ser His 70 Phe Asp Ala Asp Glu 75 Ile Lys Arg Leu Gly 80
 Lys Arg Phe Lys Lys 85 Leu Asp Leu Asp Asn 90 Ser Gly Ser Leu Ser Val 95
 Glu Glu Phe Met 100 Ser Leu Pro Glu 105 Gln Gln Asn Pro Leu 110 Val Gln
 Arg Val Ile 115 Asp Ile Phe Asp Thr 120 Asp Gly Asn Gly Glu 125 Val Asp Phe
 Lys Glu Phe Ile Glu Gly Val 135 Ser Gln Phe Ser Val 140 Lys Gly Asp Lys
 Glu 145 Gln Lys Leu Arg Phe 150 Ala Phe Arg Ile Tyr 155 Asp Met Asp Lys Asp 160
 Gly Tyr Ile Ser Asn 165 Gly Glu Leu Phe Gln 170 Val Leu Lys Met Met Val 175

 Gly Asn Asn Leu 180 Lys Asp Thr Gln Leu 185 Gln Gln Ile Val Asp 190 Lys Thr
 Ile Ile Asn Ala Asp Lys Asp Gly 200 Asp Gly Arg Ile Ser 205 Phe Glu Glu
 Phe Cys Ala Val Val Gly Gly 215 Leu Asp Ile His Lys 220 Lys Met Val Val
 Asp 225 Val Gly Gly Gly Ser 230 His His His His His 235 His

REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo para la determinación de la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra que incluye los pasos de proporcionar la muestra; mezclar dicha muestra con un primer receptor y un segundo receptor para formar una suspensión, donde dichos primer y segundo receptores están unidos a partículas de detección y cada uno de dichos primer y segundo receptores se une específicamente a un sitio de unión separado en dicho fármaco, donde en presencia del fármaco se da como resultado la aglutinación de las partículas de detección; detectar o medir directamente la cantidad de aglutinación de partículas en dicha suspensión; y correlacionar la cantidad de aglutinación de partículas con la presencia o la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus, y dicho primer receptor es una inmunofilina o un fragmento de unión de la misma.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las partículas de detección se seleccionan de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco inmunosupresor es rapamicina o everolimus; el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP); y el segundo receptor contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR).
5. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco inmunosupresor es tacrolimus; el primer receptor contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP); y el segundo receptor contiene calcineurina o un fragmento de unión de la misma.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco inmunosupresor es ciclosporina; el primer receptor contiene una ciclofilina; y el segundo receptor contiene calcineurina.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la calcineurina tiene unida tanto la calmodulina como el ion de calcio.
8. El método de la reivindicación 3, en el que la muestra es una muestra de sangre obtenida de un paciente al que se ha administrado al menos un fármaco inmunosupresor.
9. Un reactivo para la determinación de un fármaco inmunosupresor en una muestra, conteniendo dicho reactivo un primer complejo de unión al fármaco que contiene un primer receptor unido a una primera partícula de detección; un segundo complejo de unión al fármaco que contiene una porción de unión seleccionada de entre el grupo que consiste en un segundo receptor unido a una partícula de detección, un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor unido a una segunda partícula de detección, y un anticuerpo específico para el segundo receptor unido a una segunda partícula de detección que está formando un complejo con un segundo receptor, donde cada complejo de unión al fármaco se une específicamente a un sitio de unión separado en dicho fármaco inmunosupresor.
10. El reactivo de la reivindicación 9, en el que la porción de unión es un segundo receptor unido a una partícula de detección.
11. Un método para la determinación de la presencia o la cantidad de un fármaco inmunosupresor en una muestra que incluye los pasos de: proporcionar una muestra; mezclar dicha muestra con un receptor unido a una primera partícula de detección y una porción de unión que se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor unido a una segunda partícula de detección, un anticuerpo específico para el segundo receptor unido a un receptor que está formando un complejo con un segundo receptor para formar una suspensión, donde dicho receptor se une específicamente a dicho fármaco en un sitio diferente al que se une el anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor, donde en presencia del fármaco se da como resultado la aglutinación de las partículas de detección; medir una cantidad de aglutinación de partículas en dicha suspensión mediante medición de la absorbancia; y correlacionar la cantidad de aglutinación de partículas con la presencia o la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona de entre el grupo que consiste en ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, y everolimus y la porción de unión es un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor, donde el anticuerpo se une a una partícula de detección.
13. Un equipo para la detección de fármacos inmunosupresores, conteniendo dicho equipo un primer receptor y un segundo receptor que se unen específicamente a un fármaco inmunosupresor diana en dos sitios separados en el fármaco inmunosupresor, conteniendo además dichos primer y segundo receptores un marcador; y una variedad de partículas de detección, estando cada una de dichas partículas unida a un agente que se une a dicho marcador.

- 5
14. Un equipo para la detección de un fármaco inmunosupresor en una muestra, conteniendo dicho equipo un primer reactivo que contiene una suspensión de una inmunofilina unida a una primera partícula de detección; un segundo reactivo que contiene una suspensión de un receptor de proteínas que se selecciona de entre el grupo que consiste en una proteína asociada a FKBP-rapamicina, calcineurina y un anticuerpo para la calcineurina, estando dicho segundo receptor de proteínas unido a una partícula de detección, donde las partículas de detección se seleccionan de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas.
- 10
15. Un equipo para la detección de rapamicina activa, conteniendo dicho equipo un primer reactivo que contiene una proteína de unión a FK506 (FKBP) enlazada a una primera partícula de detección; un segundo reactivo que contiene una proteína diana de la rapamicina (TOR) enlazada a una segunda partícula de detección, donde la primera y la segunda partícula de detección se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en micropartículas y nanocápsulas.

Figura 1

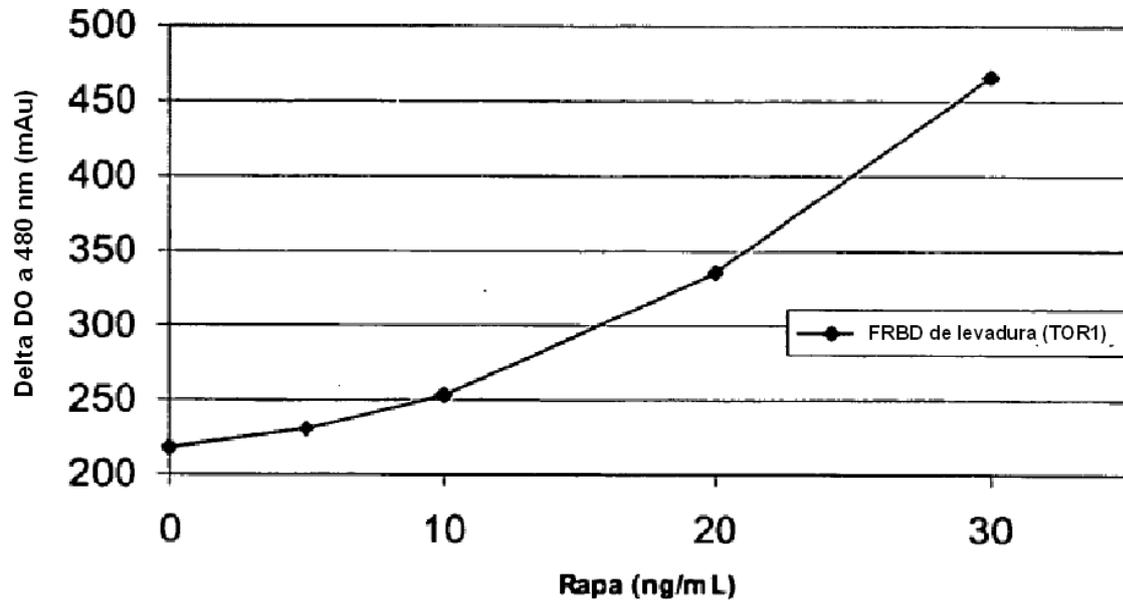


Figura 2

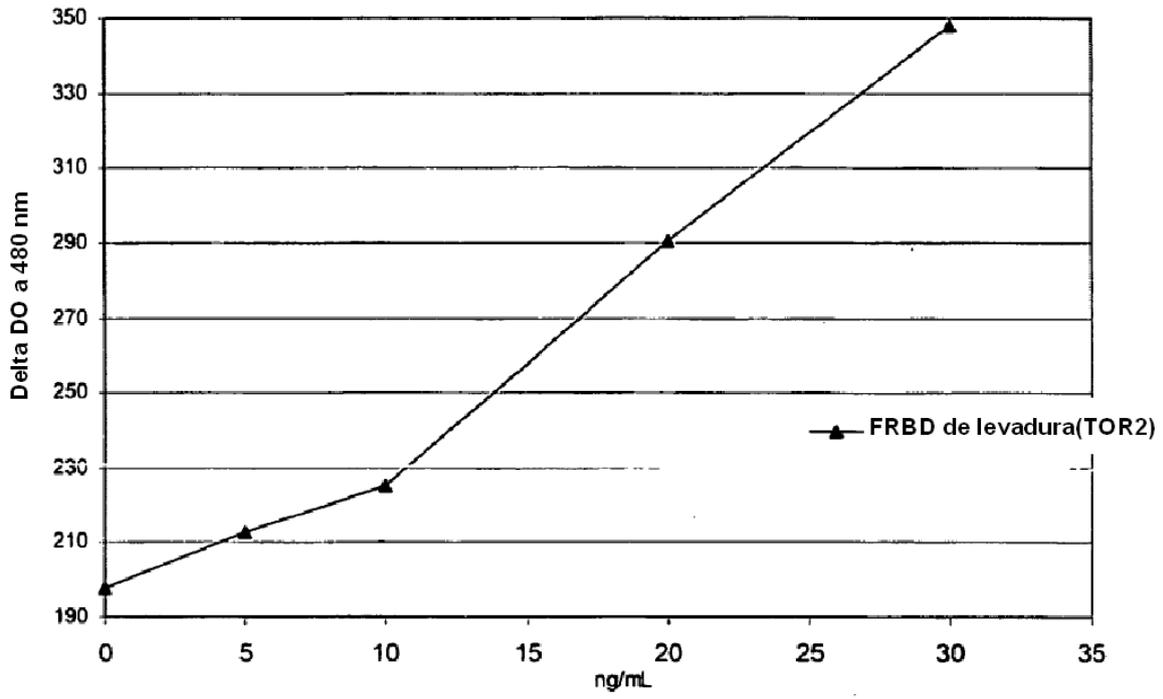


Figura 3

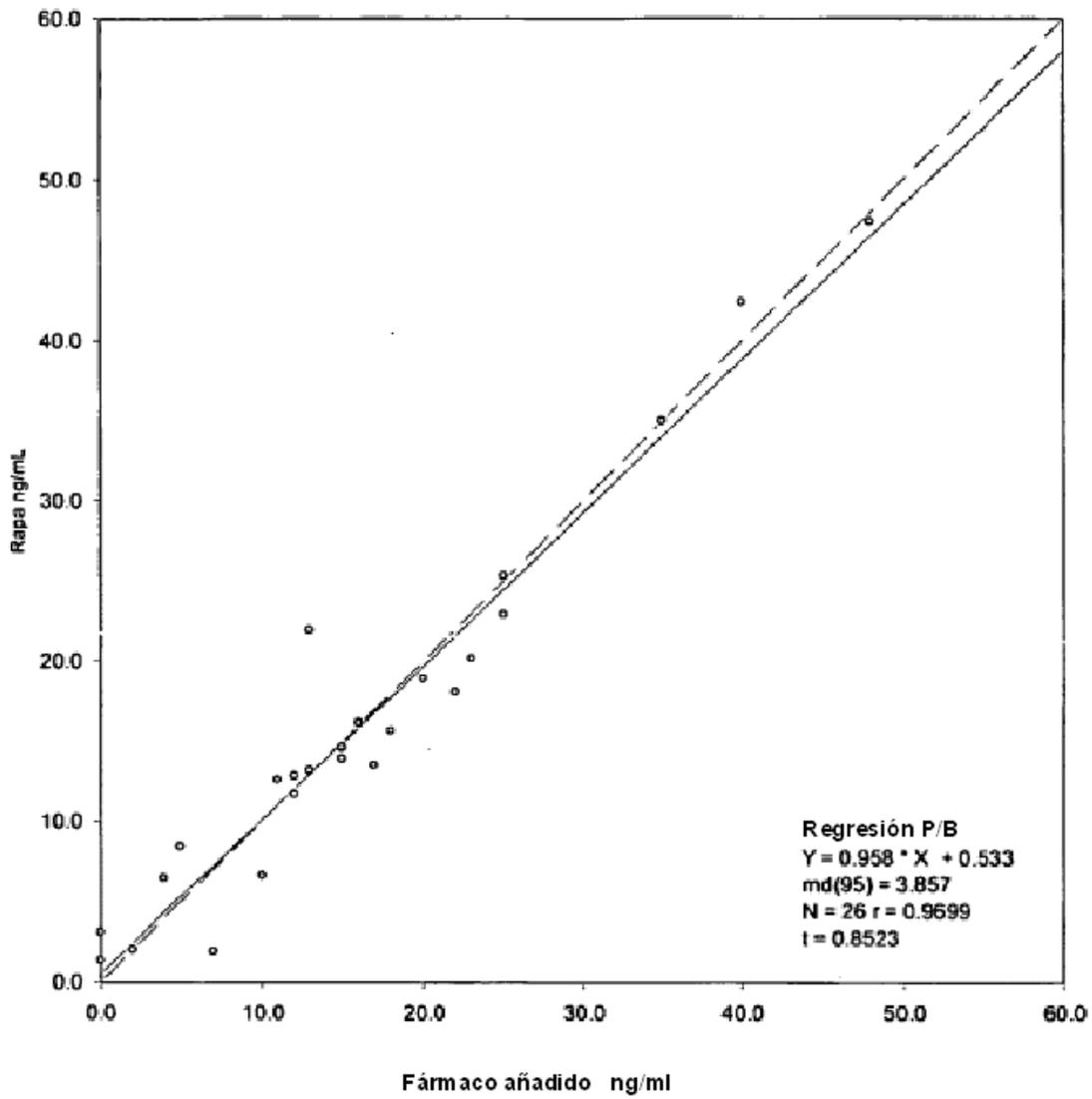


Figura 4

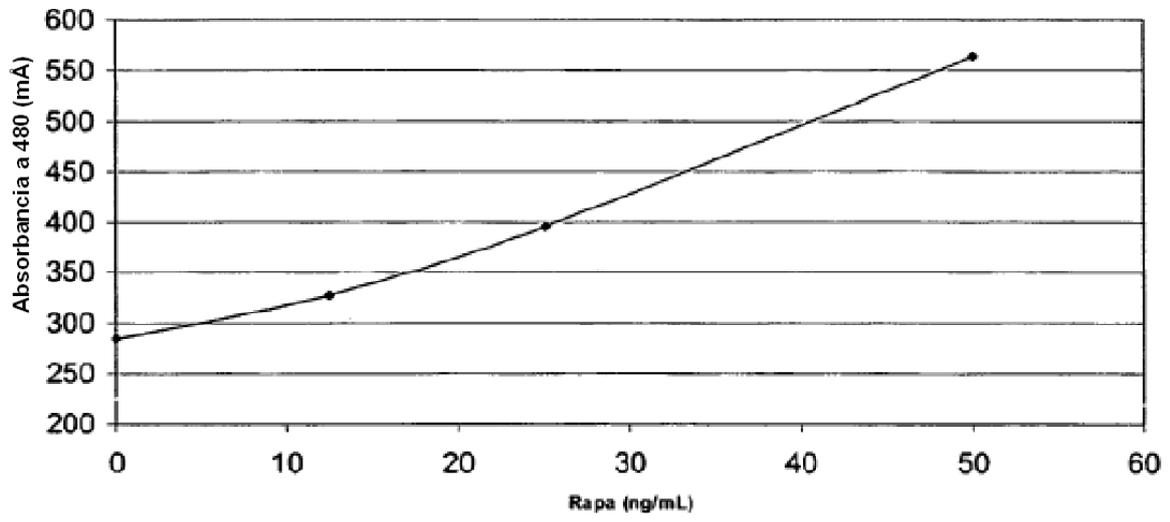


Figura 5

