

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 167**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
C07D 498/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06826077 .7**
96 Fecha de presentación: **13.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1949100**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TACROLIMUS USANDO DETERGENTES ACUOSOS.**

30 Prioridad:
13.10.2005 US 249188

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
ABBOTT LABORATORIES
Dept. 377, Bldg AP6A-1 100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-6008, US

72 Inventor/es:
KONRATH, John, G. y
WILSON, David, H.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 167 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

Método para la extracción y cuantificación de tacrolimus usando detergentes acuosos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de extracción de tacrolimus simple a partir de una muestra para ensayo para su uso en un ensayo de cuantificación de tacrolimus completamente automatizado.

10 **Antecedentes**

Tracolumus (también conocido como ProGraf[®] y FK506) es un antibiótico de macrólido de lactona con potentes propiedades inmunosupresoras, aislado a partir de los hongos terrestres *Streptomyces tsukubaensis*. Tracolumus exhibe sus efectos inmunosupresores inhibiendo la ruta de la calcineurina (que finalmente inhibe la proliferación de linfocitos T) a través de la formación de un complejo pentamérico entre tracolumus, proteínas de unión FK (FKBP), calmodulina y calcineurinas A y B (McKeon et al., Cell Vol.66, páginas 823-6 (1991)). Tracolumus se une fuertemente a FKBP (Kd-0,4 nM), y también se sabe que se une a la ciclofilina (Handshumacher et al, Science Vol. 226, páginas 544-547 (1984)), albúminas, y alfa-1 glucoproteína ácida (Wong, Clinica Chimica' Acta Vol. 323, páginas 241-253 (2001)). Tracolumus, usado en combinación con otros inmunosupresores, ha conseguido una amplia aceptación para el tratamiento del rechazo de los tejidos tras un trasplante de órganos.

La variabilidad extrema de un paciente a otro entre la dosis del fármaco y los niveles de fármaco en sangre conduce a su potencial de toxicidad, por lo que el control terapéutico de los niveles de tracolumus en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora con tracolumus es una práctica convencional.

Tracolumus es captado en gran medida en los eritrocitos (glóbulos rojos o RBC), unidos a la proteína de unión FK (FKBP, por lo tanto, las muestras de sangre completa son una matriz preferida para el control terapéutico de tracolumus en sangre, aunque puede extraerse de muestras de las biopsias, médula ósea y otros fluidos corporales. Tracolumus también forma complejos con otros constituyentes del plasma sanguíneo, tales como inmunofilinas, albúmina y lipoproteínas. Para determinar la presencia de tracolumus y su concentración en una muestra de sangre humana, los RBC presentes en la muestra deben lisarse para liberar los complejos tracolumus/proteína. Después, los complejos tracolumus/proteína deben disociarse para liberar tracolumus.

Tracolumus tiene una solubilidad limitada en soluciones acuosas. Consecuentemente, todos los ensayos de tracolumus disponibles usan disolventes orgánicos para extraer el fármaco para su ensayo. Se han usado rutinariamente disolventes orgánicos (por ejemplo, acetato de etilo, metanol, cloruro de metileno) para lisar los glóbulos rojos, para desnaturalizar las proteínas y para extraer tracolumus en preparación para su cuantificación,

Alak A. M., "Measurements of tracolumus (FK506) and its metabolites: A review of assay development and application in therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies", Therapeutic drug monitoring, New York, NY, US, vol. 19, Junio 1997 (06-1997)), páginas 338-351, que es una revisión de los protocolos para las mediciones de tracolumus en el control terapéutico del fármaco y estudios farmacocinéticos, se discuten protocolos para la extracción de tracolumus de muestras de sangre usando disolventes orgánicos como cloruro de metileno, acetato de etilo o metanol

El uso de procedimientos basados en disolventes orgánicos sufre de varias desventajas significativas. Por ejemplo, los disolventes orgánicos son muy volátiles, altamente inflamables e implican materiales peligrosos que deben eliminarse adecuadamente de acuerdo con las directrices medioambientales

La volatilidad de los disolventes orgánicos puede interferir también con la cuantificación precisa de tracolumus en relación con la evaporación acumulada de los disolventes orgánicos. La evaporación excesiva en cada etapa de la extracción y durante las incubaciones de la muestra del ensayo, pueden dar como resultado niveles artificialmente elevados de tracolumus en la detección.

Todos los procedimientos actuales para la extracción de tracolumus requieren una preparación manual compleja de la muestra. Los procedimientos actuales requieren una etapa de desnaturalización/extracción de una muestra, una etapa de centrifugación y una etapa de decantación del sobrenadante. Los métodos de extracción manual de tracolumus actuales son procesos lentos, que suponen un trabajo intensivo. Normalmente implican el pipeteo preciso de cuatro componentes: la muestra, el agente desnaturalizante, el agente de extracción y la muestra extraída. La precisión del pipeteo manual consume mucho tiempo y es poco fiable. Consecuentemente, estos procedimientos son caros en términos de costes asociados con la dotación de personal. También son técnicamente limitados en términos de rendimiento analítico y en la cuantificación precisa del tracolumus.

El uso de disolventes orgánicos junto con etapas de desnaturalización, centrifugación y decantación, requeridos por los procedimientos de pretratamiento de muestra actuales, imposibilitan el ensayo de cuantificación de tracolumus completamente automatizado, Para que sea posible la cuantificación automatizada completa, todos los reactivos y

las muestras deben permanecer en una forma acuosa. Ya no sería necesario la desnaturalización (lisis) y la centrifugación de las muestras de sangre. El uso de soluciones acuosas también eliminaría los efectos de la evaporación excesiva, y los riesgos asociados con el uso de condiciones volátiles, inflamables y potencialmente explosivos en un dispositivo eléctrico.

5 Consecuentemente, hay una necesidad e interés en la técnica de elaborar un método de cuantificación de tracolimus completamente automatizado, que elimine la necesidad del pretratamiento de la muestra, elaborado y laborioso. Tal método representaría una mejoría considerable respecto a los métodos actuales conocidos en la técnica, en términos de costes por ensayo. La eliminación de la interacción manual del usuario con las muestras también
10 mejoraría la reproducibilidad del método, mediante la eliminación de errores humanos, que pueden afectar a la extracción del fármaco (y por lo tanto, al resultado posterior).

La presente invención proporciona un método para la extracción de tracolimus en un medio acuoso sin precipitación, sin desnaturalización, que no sólo elimina el uso de disolventes orgánicos y centrifugación, sino que también cumple
15 los requisitos para un ensayo de cuantificación automatizada de tracolimus.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta gráficamente una curva dosis-respuesta de un ensayo semi-automatizado de tracolimus realizado en el analizador ARCHITECT™ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) usando una sal biliar como agente de extracción de tracolimus.

La Figura 2 es una curva dosis-respuesta de un ensayo completamente automatizado realizado en el analizador IMx™ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) usando una sal biliar como agente de extracción de tracolimus.

La Figura 3 compara gráficamente los resultados de las muestra de los pacientes a los que se les ha administrado tracolimus de un ensayo completamente automatizado usando extracción con sal biliar frente a los resultados de un ensayo disponible en el mercado usando extracción con disolvente orgánico manual.

La Figura 4 es una curva dosis-respuesta de un ensayo de tracolimus completamente automatizado realizado en el analizador IMx™ usando cinco sales biliares diferentes para la extracción.

La Figura 5 compara gráficamente dos curvas dosis-respuesta de una extracción de tracolimus completamente automatizada usando desoxicolato y CHAPS en el analizador IMx™.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método acuoso para la extracción de tracolimus sin precipitación, sin desnaturalización, que permite un método de cuantificación de tracolimus completamente automatizado en una muestra de sangre para ensayo, sin la necesidad de pretratamiento manual.

Puesto que tracolimus está unido en gran medida a los RBC, la muestra de sangre para ensayo preferida es sangre completa, aunque puede ser una muestra que contenga los RBC lavados previamente.

El método de la presente invención comprende mezclar la muestra de sangre para ensayo con al menos un agente hemolítico y al menos un agente de extracción de tracolimus. Los dos agentes pueden añadirse en una etapa o en etapas separadas.

El agente hemolítico lisa los glóbulos rojos resultantes en la liberación del complejo tracolimus/proteína. Para el fin de la presente invención, los términos "hemolítico", "eritrocítico" o "eritrolítico" tienen el mismo significado, es decir, la ruptura de los glóbulos rojos, dando como resultado la liberación de los contenidos intracelulares.

El agente de extracción disocia o libera tracolimus de sus complejos con los componentes de la proteína sanguínea en una solución acuosa compatible con los métodos de los ensayos de cuantificación posteriores.

Finalmente, durante el proceso de cuantificación, se determina la concentración del tracolimus extraído. En dicho proceso de cuantificación, la concentración determinada del tracolimus extraído corresponde a la concentración de tracolimus presente originalmente en la muestra de sangre.

El agente hemolítico debe exhibir una actividad eritrocitolítica potente, porque la extracción y cuantificación de tracolimus completamente automatizada requiere que no haya extracción de cualquier componente de la muestra/lisis/mezcla de extracción previa al ensayo y, sin embargo, sin desnaturalizar los anticuerpos u otras moléculas receptoras necesarias en el ensayo de cuantificación. Del mismo modo, la concentración del agente hemolítico debe ser suficiente para lisar cualquier membrana celular en la muestra casi de inmediato y, al mismo tiempo, no debe interferir en el proceso de cuantificación de tracolimus. Los agentes hemolíticos que pueden usarse en el método de la presente invención son detergentes no iónicos.

Estos agentes son conocidos por sus marcadas propiedades eritrocíticas a través de choque osmótico (alteración hipotónica).

Como se ha indicado anteriormente, cuando se usa un detergente como agente hemolítico, este debe ser uno cuya presencia continuada en el ensayo no interfiera en el propio ensayo. Por lo tanto, deben evitarse los detergentes iónicos de fuerte desnaturalización, tales como dodecilsulfato sódico. Los detergentes preferidos incluyen detergentes no iónicos, tales como octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100™), o saponina, preferentemente Triton X-100™. Además, para la automatización completa, es imprescindible que el detergente mantenga la solubilidad de la mezcla de reacción durante todo el periodo de incubación obligatorio del ensayo.

En parte, puesto que tracolimus es hidrófobo, se une a las proteínas de unión específica y de alta afinidad conocidas presentes en la sangre. Las inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión, específicas y de alta afinidad, que tienen importancia fisiológica. Las inmunofilinas son una familia de proteínas de unión intracelular que se unen a varios compuestos; en la actualidad se conocen dos familias distintas de inmunofilinas: ciclofilinas y macrofilinas, uniéndose estas últimas específicamente a tracolimus. La extracción de tracolimus que está fuertemente unido a las inmunofilinas no se consigue fácilmente usando soluciones acuosas. Aunque tracolimus se ha investigado extensamente y se ha usado para terapias inmunosupresoras durante más de 10 años, no existen métodos para la extracción del tracolimus basados en el uso de reactivos no desnaturalizantes acuosos. Todos los métodos conocidos en la técnica utilizan disolventes orgánicos para desnaturalizar las inmunofilinas y extraer tracolimus para la posterior determinación cuantitativa de la concentración. Se descubrió inesperadamente que los detergentes solubles en agua con la estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno (colesterol) muestran una poderosa extracción no desnaturalizante de tracolimus. Los detergentes con una estructura básica de colesterol útiles para su actividad de extracción de tracolimus incluyen, pero sin limitación, las sales biliares aniónicas y detergentes zwitteriónicos, tal como CHAPS™.

"Sal biliar", como se usa en el presente documento, significa cualquier compuesto o derivado del mismo entre la clase de moléculas esteroideas producidas por el hígado o por las bacterias del intestino, que exhiben propiedades detergentes. Las sales biliares que proporcionan las condiciones para la extracción de tracolimus de las proteínas de unión presentes en la muestra de sangre para ensayo pueden ser no conjugadas (por ejemplo colato) o conjugadas a otro resto, tal como por ejemplo, un resto alquilo, alquileo o aquilino sustituido o no sustituido, o más preferentemente un resto alquilo, alquileo o aquilino C₁-C₃₀, tal como, por ejemplo, taurina (por ejemplo, taurocolato) o glicina (por ejemplo, glicocolato) o un resto aromático soluble en agua. Las sales biliares útiles en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, colato, desoxicolato, quenodesoxicolato, colilglicina, quenodesoxicolato de glicina, colitaurina, quenodesoxicolato de taurina, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido sulfocólico o ácido sulfolítico, desoxicoliglicina, sulfoglicocoliglicina y ácido ursodesoxicólico.

Como se demuestra en los ejemplos posteriores, estas sales biliares solubles en agua representan la clase de moléculas que exhiben una actividad marcada de extracción de tracolimus no desnaturalizante. Para demostrar el fin de la invención se prefiere la sal biliar desoxicolato. Sin embargo, también se ha demostrado la actividad de extracción de otras sales biliares. Esta actividad de extracción de las sales biliares no se ha descrito previamente o no se ha aludido a ella en la técnica anterior, y la actividad de extracción no sería conocida como tal a priori por los expertos en la materia. La utilización de esta propiedad de las sales biliares proporciona las condiciones necesarias para el ensayo de cuantificación completamente automatizado de tracolimus (a) evitando el uso de productos químicos orgánicos peligrosos, lo que sería incómodo debido a las razones descritas anteriormente, y pueden ser peligrosos para su uso en un instrumento eléctrico, y (b) proporcionando una buena extracción y solubilización en presencia de inmunofilinas competidoras presentes en la muestra de sangre para ensayo.

Detergentes zwitteriónicos, tales como CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano-sulfonato hidrato) y CHAPSO, son detergentes no desnaturalizantes capaces de romper las interacciones de proteínas no específicas y producir una pequeña agregación de proteínas. La actividad de extracción de tracolimus no desnaturalizante de los CHAPS se demuestra en el Ejemplo 4 (Figura 5) de la presente solicitud.

El agente de extracción puede complementarse opcionalmente con un segundo agente de extracción, tal como un fosfolípido o sulfobetaina no detergente. Los fosfolípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, los fosfolípidos de origen natural, y particularmente incluyen lecitina (fosfatidilcolina).

Puesto que la automatización requiere que tracolimus se cuantifique en presencia de tanto el agente hemolítico como el agente de extracción, la naturaleza y concentraciones de estos agentes se seleccionan preferentemente de manera que se evita la interferencia significativa con el proceso de cuantificación. Por ejemplo, estos agentes preferentemente no son incompatibles con, y más preferentemente no interfieren con, la molécula de unión al analito y la molécula de generación de señal durante el proceso de cuantificación. Para la presente invención, el término "analito" es el compuesto de interés (por ejemplo, tracolimus). Una molécula puede capturar o unirse al analito formando un complejo. Esta molécula de unión al analito puede incluir cualquier proteína que se una al tracolimus, por ejemplo un anticuerpo, o una inmunofilina.

Las moléculas generadoras de señal pueden incluir, pero sin limitación, fosfatasa alcalina o acridinio.

Las propiedades químicas de los detergentes solubles en agua, que tienen una estructura básica de esteroide, usados en el método de la presente invención, no causan una interferencia significativa por su continua presencia en el ensayo a las concentraciones requeridas para la extracción.

5 La muestra de sangre para ensayo debería incubarse con el agente hemolítico durante un tiempo y en condiciones suficientes para completar la lisis, y más preferentemente suficientes para que ocurra la solubilización de las membranas y componentes celulares. Los tiempos adecuados pueden ser desde unos pocos segundos a varias horas, dependiendo del agente.

10 De la misma manera, la muestra debería incubarse con el agente de extracción durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la extracción del tracolimus de las inmunofilinas u otras proteínas de unión. Estas condiciones varían de acuerdo con las concentraciones elegidas de los detergentes y con los volúmenes relativos de la muestra. En general, la concentración de detergente debería estar en un intervalo de aproximadamente el 0,1% p/v al 3,0% p/v aproximadamente, y preferentemente del 0,3% a aproximadamente el 1,0%, durante la etapa de lisis de los RBC, y la concentración del agente de extracción (desoxicolato u otros detergentes acuosos) debería estar en el intervalo de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 1%, preferentemente de aproximadamente el 0,4% a aproximadamente el 0,6% durante la etapa de extracción.

20 La muestra de sangre para ensayo puede ponerse en contacto con el agente hemolítico y con el agente de extracción en etapas separadas (primero el agente hemolítico, seguido de la sal o sales biliares), o en la misma etapa. Puesto que los dos agentes son generalmente compatibles, la muestra de sangre para ensayo se mezcla preferentemente con una solución que contiene ambos agentes. El tiempo de incubación de la extracción puede ser de un amplio intervalo, dependiendo del tipo de ensayo, puede ser de sólo unos pocos segundos (por ejemplo, en muchos inmunoensayos rápidos sin equilibrio), a varias horas (por ejemplo, en algunos ensayos de equilibrio en placa de microtitulación). Con el fin de automatizar y reducir el tiempo del procedimiento, se prefieren tiempos de incubación más cortos con el agente hemolítico o con el agente de extracción o ambos. Consecuentemente, se prefieren tiempos de incubación para cada etapa individual o una etapa combinada de 10 a 20 minutos.

30 Después de los procesos de hemólisis y extracción, la concentración de tracolimus en la muestra se puede determinar por cualquiera de una serie de métodos conocidos por los expertos en la materia. Se pueden usar inmunoensayos o ensayos de unión a receptor (por ejemplo, ensayo de receptor de inmunofilina). Preferentemente, se usa un inmunoensayo. Para la automatización completa o semi-automatización, se puede usar cualquiera de varios analizadores de inmunoensayos automatizados disponibles en el mercado. El método de inmunoensayo preferido sería del tipo heterogéneo, que permite capturar tracolimus en una fase sólida (ya sea a través de anticuerpos o receptores de proteínas, conocidos por unir tracolimus, tal como FKBP) y la posterior separación de los componentes que interfieren potencialmente (tal como hemoglobina) en la muestra de sangre para ensayo del tracolimus unido. Esto incluye radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente enzimático de micropartículas (MEIA), ensayo de captura de iones, ensayo basado en quimioluminiscencia, u otras configuraciones de ensayo conocidas y disponibles en el mercado para la captura del analito, generación y detección de señales.

40 Los instrumentos preferidos para la demostración de la presente invención son el analizador de inmunoensayo Abbot Imx™, y el analizador de inmunoensayo Abbott ARCHITECT™. Se pueden obtener anticuerpos, preferentemente anticuerpos anticlonales, para su uso en un inmunoensayo de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la materia. También se pueden obtener anticuerpos a partir de fuentes comerciales, tales como Astellas (Osaka, Japón).

50 El tamaño de muestra óptimo depende de las cantidades que se prefieran para el método particular del ensayo de tracolimus. A modo de ejemplo, y sin limitación, a menudo se requiere un volumen mínimo de muestra en el intervalo de 50-200 µl para inmunoensayos con la sensibilidad suficiente para diagnóstico médico. Los analizadores de inmunoensayo Abbot Imx™ y Abbott ARCHITECT™ requieren un volumen mínimo de muestra de 150 µl para conseguir la sensibilidad óptima. Esto proporciona un volumen suficiente para premezclar la muestra y, sin embargo, un volumen suficiente para realizar un ensayo. Los expertos en la materia apreciarán que los volúmenes aspirados para el ensayo pueden afectar a la sensibilidad del ensayo. La optimización del volumen de muestra aspirado acompañaría el desarrollo de cualquier ensayo de tracolimus.

60 La presente invención también abarca un kit de ensayo para diagnóstico, basado en el método de la presente invención, para la determinación cuantitativa automatizada o semi-automatizada de tracolimus en muestras de sangre para ensayo. El kit de la presente invención comprende, como agente hemolítico preferido, Triton X100™, y desoxicolato como agente preferido de extracción de sal biliar.

65 En resumen, la presente invención permite la determinación completamente automatizada de la concentración de tracolimus en muestras de sangre para ensayo con una sensibilidad y precisión que es comparable con los métodos actuales, que requieren procedimientos de extracción manual laboriosos usando disolventes orgánicos.

La presente invención se aclarará más adelante mediante los siguientes ejemplos, que sólo pretenden ilustrar la

presente invención y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Uso de sal biliar para extraer tracolimus de sangre humana pre-lisada, para su cuantificación mediante el analizador de inmunoensayo Abbott ARCHITECT® en un formato semi-automatizado

Se añadió gravimétricamente tracolimus (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd Osaka) a la sangre humana pre-lisada y filtrada para proporcionar una serie de seis muestras de tracolimus para su análisis (las muestras comprendían concentraciones entre 2,5 y 30 ng/ml, y un blanco). Se premezclaron 110 µl de cada muestra con 110 µl de una solución de desoxicolato al 0,8 % (Sigma, St Louis, M) en vasos para muestras ARCHITECT®. La mezcla se mezcló durante 30 segundos con generación de vórtice. Los frascos de reactivos que contenían micropartículas magnéticas (Polymer Laboratories, Shropshire, Inglaterra) recubiertas con anticuerpo que reconoce tracolimus y una solución de trazador conjugado de tracolimus y acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), para la generación de señales luminosas, se colocaron en el instrumento ARCHITECT®. Después del inicio del ensayo, la pipeta ARCHITECT® transfirió 40 µl de cada muestra pre-extraída al recipiente de reacción ARCHITECT® (RV). A esto le siguió la adición de 50 µl de micropartículas recubiertas de anticuerpo anti-tracolimus. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 18 minutos. Después de una etapa de lavado, en la que las micropartículas magnéticas se capturan por medio de un imán y después se resuspenden en un tampón fosfato en el RV, se añadieron 50 µl de marcador tracolimus-acridinio a cada RV, y se incubaron durante cuatro minutos. Después de un segundo lavado, se liberó el marcador de unión, activado por una solución de peróxido, y se midió la luz quimioluminiscente en la secuencia convencional para el sistema del instrumento ARCHITECT®. Puesto que este ejemplo es un inmunoensayo competitivo, la señal luminosa es inversamente proporcional a la concentración de tracolimus en la muestra. La Figura 1 muestra la relación entre la señal luminosa y la concentración de tracolimus. El cambio de señal con la concentración de tracolimus indica que tracolimus se extrajo de la matriz de sangre completa, fue capturado por las micropartículas anti-tracolimus y detectado por el conjugado tracolimus-acridinio. Este ejemplo demuestra la extracción de tracolimus de proteínas de unión endógenas presentes en una matriz de sangre humana completa en un medio acuoso no desnaturante, usando desoxicolato como agente de extracción, y cuantificando mediante un analizador de inmunoensayo automatizado.

30 Ejemplo 2. Cuantificación de tracolimus completamente automatizada a partir de muestras de sangre completa de pacientes, usando una sal biliar para la extracción y el analizador de inmunoensayo Abbott Imx®

La sangre completa de las muestras de los pacientes a los que se les ha administrado tracolimus (alícuotas de 150 µl) se pipeteó en los pocillos de muestra de las celdas de la reacción de separación IMX (correspondiendo cada célula a una muestra de un único paciente). Las precisiones de los volúmenes pipeteados no eran importantes para el resultado, con tal de que hubiera suficiente muestra para que el instrumento Imx® llevara a cabo sus operaciones de pipeteado de la muestra (se recomienda un volumen mínimo de 150 µl en el manual de operación del instrumento). El elemento giratorio IMx® que contiene las celdas de reacción IMx® cargadas con muestras de tracolimus se colocó en el instrumento IMx. Se colocó un kit de diagnóstico de cuatro reactivos, incluyendo un reactivo hemolítico/de extracción que contenía Triton X 100 al 1,0 % (v/v) y desoxicolato al 0,5 % (p/v) dentro del instrumento y se inició el ensayo IMx completamente automatizado. El conjunto sonda/electrodo IMx® primero aspiró y dispensó 90 µl de las muestras de sangre completa, dos veces, para resuspender los RBC sedimentados. Se mezclaron alícuotas de 80 µl de reactivo hemolítico/de extracción con 80 µl de sangre completa de cada muestra en los pocillos pre-diluidos de las celdas de reacción IMx®, por medio del conjunto sonda/electrodo IMx®. Se transfirieron 50 µl de las muestras lisadas y extraídas de los pocillos de incubación de cada celda de reacción IMx® junto con 50 µl de micropartículas recubiertas de anti-tracolimus de un segundo frasco del kit de reactivos y 50 µl de reactivo hemolítico/de extracción adicional. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, se transfirieron alícuotas de 175 µl de mezcla de reacción de cada muestra a una matriz de fibra de vidrio de las celdas de reacción IMx por medio del conjunto sonda/electrodo IMx®. Las matrices de las celdas de reacción se lavaron con dos alícuotas de 100 µl de reactivo hemolítico/de extracción cada una, para retirar la hemoglobina de la muestra y otras sustancias que interfieran potencialmente de la matriz de fibra de carbono. Se añadieron entonces alícuotas de 70 µl de un conjugado de fosfatasa alcalina y tracolimus de un tercer frasco del kit de reactivo a las matrices de las celdas de reacción por medio del conjunto sonda/electrodo IMx® y se dejó incubando durante 28 minutos. Después, se lavó la matriz con un tampón de la línea de instrumentos IMx® (NaCl 0,3 M en tampón Tris, 2 x 100 µl). Después, el conjunto sonda/electrodo IMx® transfirió 70 µl del sustrato informador 4-metil-umberiferil-fosfato (MUP) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) de un cuarto frasco del kit de reactivo a cada matriz de las celdas de reacción IMx®. Inmediatamente después de la adición de MUP se midió el producto fluorescente para cada muestra (en recuentos por segundo por segundo, c/s/s) por medio del conjunto óptico IMx®. La señal fluorescente era inversamente proporcional a la concentración de tracolimus en la muestra. La señal se convirtió automáticamente en unidades de concentración de tracolimus, usando una curva de calibración que se había almacenado previamente en la memoria del instrumento. La curva de calibración se muestra en la Figura 2. Los calibradores se prepararon por adición gravimétrica de cantidades conocidas de tracolimus dentro de la sangre humana completa. Los resultados de la concentración de tracolimus para 40 muestras de pacientes a los que se les ha administrado tracolimus se muestran en la Figura 3, comparados con los resultados de un ensayo para tracolimus

disponible en el mercado, que requiere de extracción manual de las muestras con un disolvente orgánico previa al ensayo. La Figura 3 demuestra que el ensayo completamente automatizado usando extracción de sal biliar dio resultados de tracolimus comparables o mejores que un ensayo disponible en el mercado, que requiere extracción manual y centrifugación de la muestra previa al ensayo.

5

Ejemplo 3. Actividad de extracción de sales biliares distintas de desoxicolato para tracolimus

Se añadió gravimétricamente tracolimus a sangre completa normal para proporcionar una serie de nueve muestras de sangre completa con tracolimus (de 3 a 480 ng/ml, y un blanco) para el análisis. Se prepararon cinco reactivos hemolíticos/de extracción separados usando cinco sales biliares diferentes, a una concentración del 0,5%. Además de 0,5% de cada uno de desoxicolato, colato, quenodesoxicolato, taurodesoxicolato y glicocolato (Sigma, St. Louis, MS), cada reactivo hemolítico/de extracción incluía Triton X-100 al 1,0% como agente hemolítico. Se añadió un frasco de cada reactivo hemolítico/de extracción al kit de diagnóstico descrito en el Ejemplo 2 (micropartículas recubiertas de anti-tracolimus, conjugado de fosfatasa alcalina (Roche, Basel), tracolimus, y MUP). Después, se ensayó el conjunto de las nueve muestras de sangre completa con tracolimus preparadas con cada reactivo del kit, usando el ensayo completamente automatizado descrito en el Ejemplo 2. La Figura 4 muestra curvas dosis-respuesta inversas, obtenidas a partir de cada uno de los cinco ejemplo ejemplos de la sal biliar. Todas las sales biliares ensayadas mostraron una actividad de extracción significativa para tracolimus, como indica el cambio en la señal fluorescente con la concentración de tracolimus.

10

15

20

Ejemplo 4. Actividad de extracción de CHAPS para tracolimus

Se añadió gravimétricamente tracolimus a sangre completa normal para proporcionar una serie de muestras de sangre completa con tracolimus (de 3 a 480 ng/ml, y un blanco) para el análisis. Los experimentos se realizaron como se ha descrito en los ejemplos previos en tampón Tris, usando como agente de extracción CHAPS™ al 1% y como agente hemolítico Triton X-100 al 0,5%. Como se muestra en la Figura 5, hay actividad de extracción comparable entre los dos detergentes no desnaturizantes, desoxicolato y CHAPS™.

25

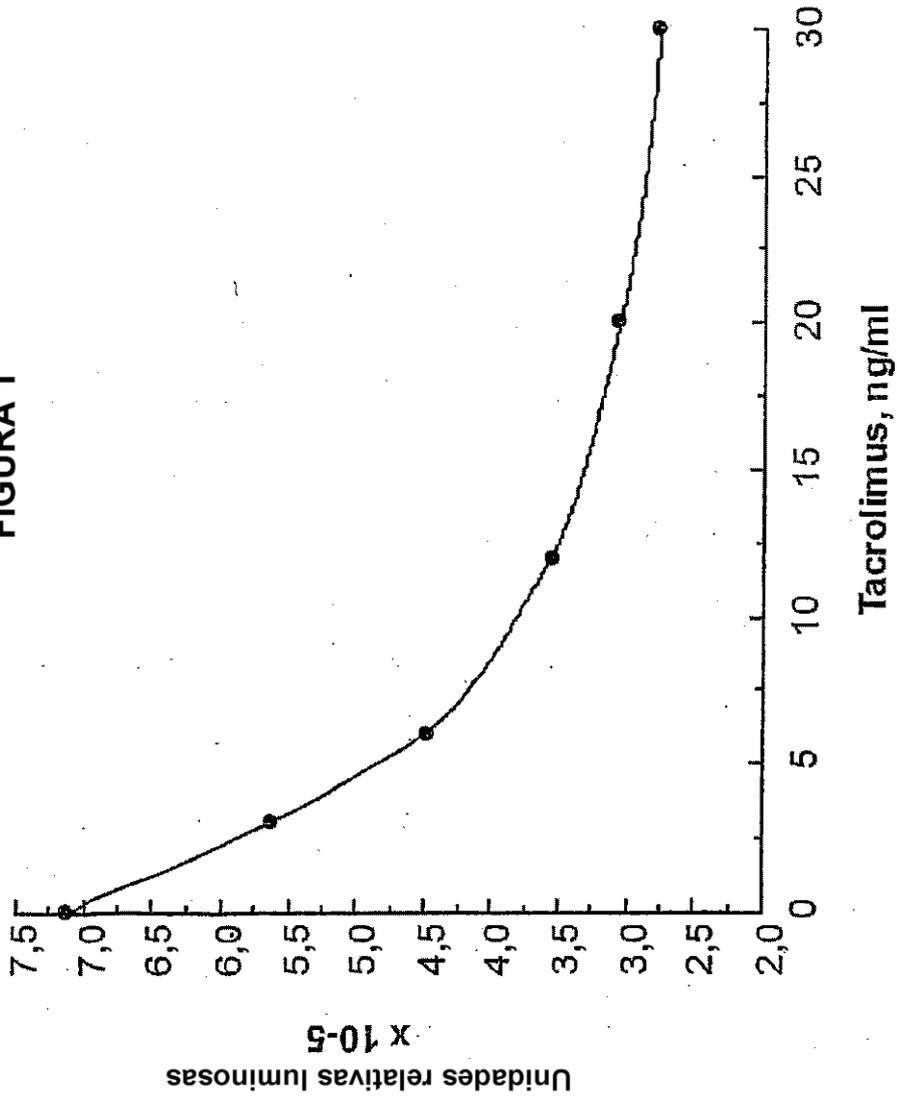
30

REIVINDICACIONES

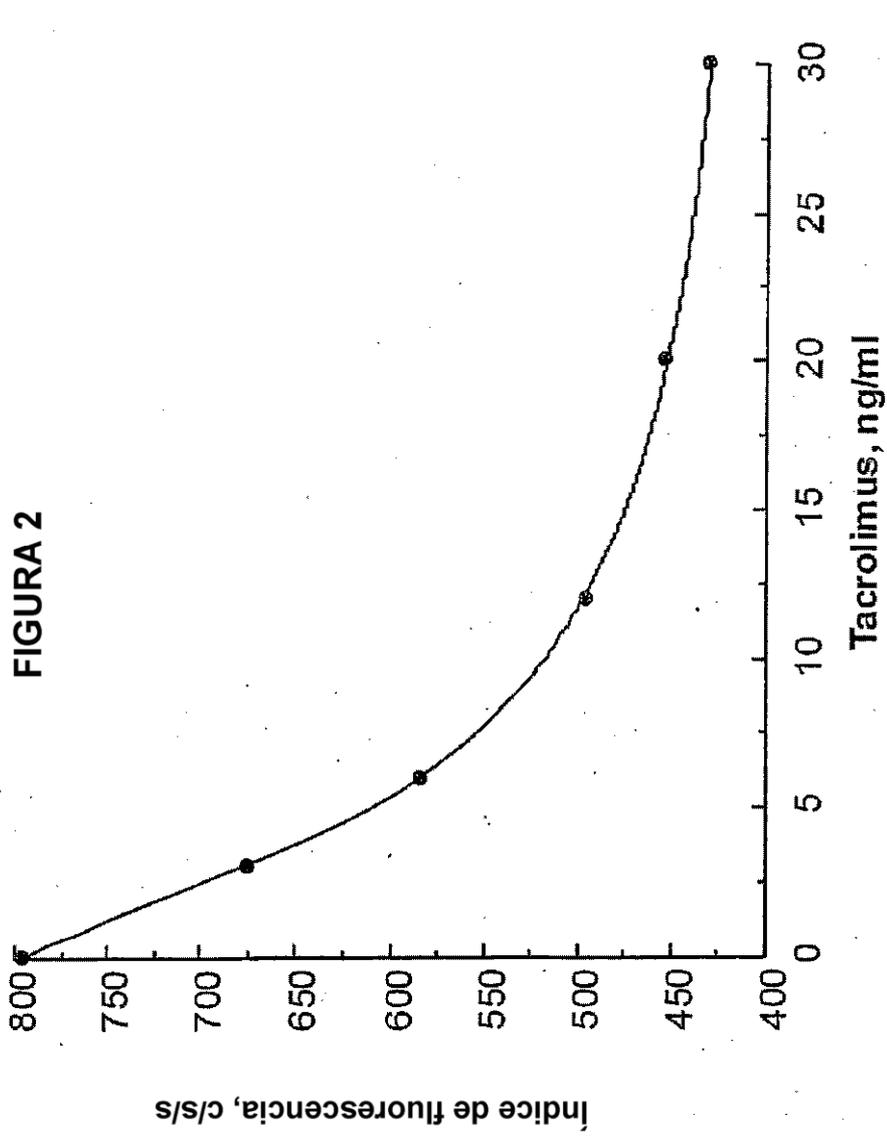
- 5 1. Un método de extracción de tracolimus de una muestra de sangre, que comprende poner el contacto de una muestra de sangre con un agente hemolítico detergente no-iónico y un agente de extracción soluble en agua.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre se proporciona en un medio acuoso no desnaturalizante.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que el agente hemolítico detergente no-iónico se selecciona entre el grupo que consiste en saponina y octilfenoxi polietoxietanol.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el agente de extracción comprende un resto ciclopentanoperhidrofenantreno (colesterol).
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que el agente de extracción se selecciona entre el grupo que consiste en detergentes de sal biliar aniónica y detergentes de sal biliar zwitteriónica.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que el agente de extracción es un detergente de sales biliares aniónicas seleccionado entre el grupo que consiste en sales biliares conjugadas y no conjugadas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho detergente de sal biliar es una sal biliar conjugada.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha sal biliar conjugada se selecciona entre el grupo que comprende glicocolato y taurodesoxicolato.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha sal biliar es una sal biliar no conjugada.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha sal biliar no conjugada se selecciona entre el grupo que comprende colato, desoxicolato y quenodesoxicolato.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha sal biliar es desoxicolato.
12. El método de la reivindicación 5, en el que el agente de extracción es un detergente de sal biliar zwitteriónica.
- 35 13. El método de la reivindicación 12, en el que el detergente de sal biliar zwitteriónica es 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano-sulfonato hidrato.
- 40 14. Un método de determinación de la concentración de tracolimus en una muestra de sangre para ensayo, en un medio acuoso no desnaturalizante, que comprende el proceso de:
 - (a) mezclar una muestra de sangre para ensayo con un agente hemolítico detergente no-iónico y un agente de extracción soluble en agua,
 - (b) lisar dicha muestra de sangre mediante dicho agente hemolítico,
 - (c) extraer tracolimus mediante dicho agente de extracción soluble en agua, y
 - 45 (d) determinar la concentración de tracolimus en dicha muestra de sangre en un sistema automatizado, en el que la concentración determinada de tracolimus extraído corresponde a la concentración de tracolimus presente en dicha muestra de sangre.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en el que el agente hemolítico es octilfenoxi polietoxietanol, y el agente de extracción soluble en agua es desoxicolato.
16. El método de la reivindicación 14, en el que el método de determinación de la concentración de tracolimus en la muestra es mediante un inmunoensayo.
- 55 17. El método de la reivindicación 14, en el que el método de determinación de la concentración de tracolimus en la muestra es mediante un ensayo de unión al receptor de inmunofilina.
- 60 18. El método de la reivindicación 16, en el que el método de inmunoensayo se selecciona entre el grupo que comprende radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente enzimático de micropartículas (MEIA), ensayo de captura de iones, y ensayo basado en quimioluminiscencia.
- 65 19. Un kit de ensayo adecuado para la detección del nivel de tracolimus en una muestra de sangre humana completa usando un sistema automático, comprendiendo dicho kit un agente hemolítico detergente no-iónico y un agente de extracción soluble en agua.

20. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en el que el agente hemolítico se selecciona entre el grupo que consiste en octilfenoxi polietoxietanol y saponina.
- 5 21. El kit de ensayo de la reivindicación 20, en el que dicho agente hemolítico es octilfenoxi polietoxietanol.
22. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en el que el agente de extracción soluble en agua es un resto ciclopentanoperhidrofenantreno (colesterol).
- 10 23. El kit de ensayo de la reivindicación 22, en el que el agente de extracción se selecciona entre el grupo que consiste en detergentes de sal biliar aniónica, y detergentes de sal biliar zwitteriónica.
24. El kit de ensayo de la reivindicación 23, en el que el detergente de sal biliar aniónica se selecciona entre sales biliares conjugadas y no conjugadas.
- 15 25. El kit de ensayo de la reivindicación 24, en el que el detergente de sal biliar es una sal biliar conjugada.
26. El kit de ensayo de la reivindicación 25, en el que la sal biliar conjugada se selecciona entre el grupo que comprende glicocolato y taurodesoxicolato.
- 20 27. El kit de ensayo de la reivindicación 24, en el que la sal biliar es una sal biliar no conjugada.
28. El kit de ensayo de la reivindicación 27, en el que la sal biliar no conjugada se selecciona entre el grupo que comprende colato, desoxicolato y quenodesoxicolato.
- 25 29. El kit de ensayo de la reivindicación 28, en el que dicha sal biliar es desoxicolato.
30. El kit de ensayo de la reivindicación 23, en el que el agente de extracción es un detergente de sales biliares zwitteriónicas.
- 30 31. El kit de ensayo de la reivindicación 30, en el que el detergente de sal biliar zwitteriónica es 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propanosulfonato hidrato.
32. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en el que dicho kit de ensayo puede usarse en una plataforma de ensayo semi-automatizada.
- 35 33. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en el que dicho kit de ensayo puede usarse en una plataforma de ensayo automatizada.
- 40

FIGURA 1

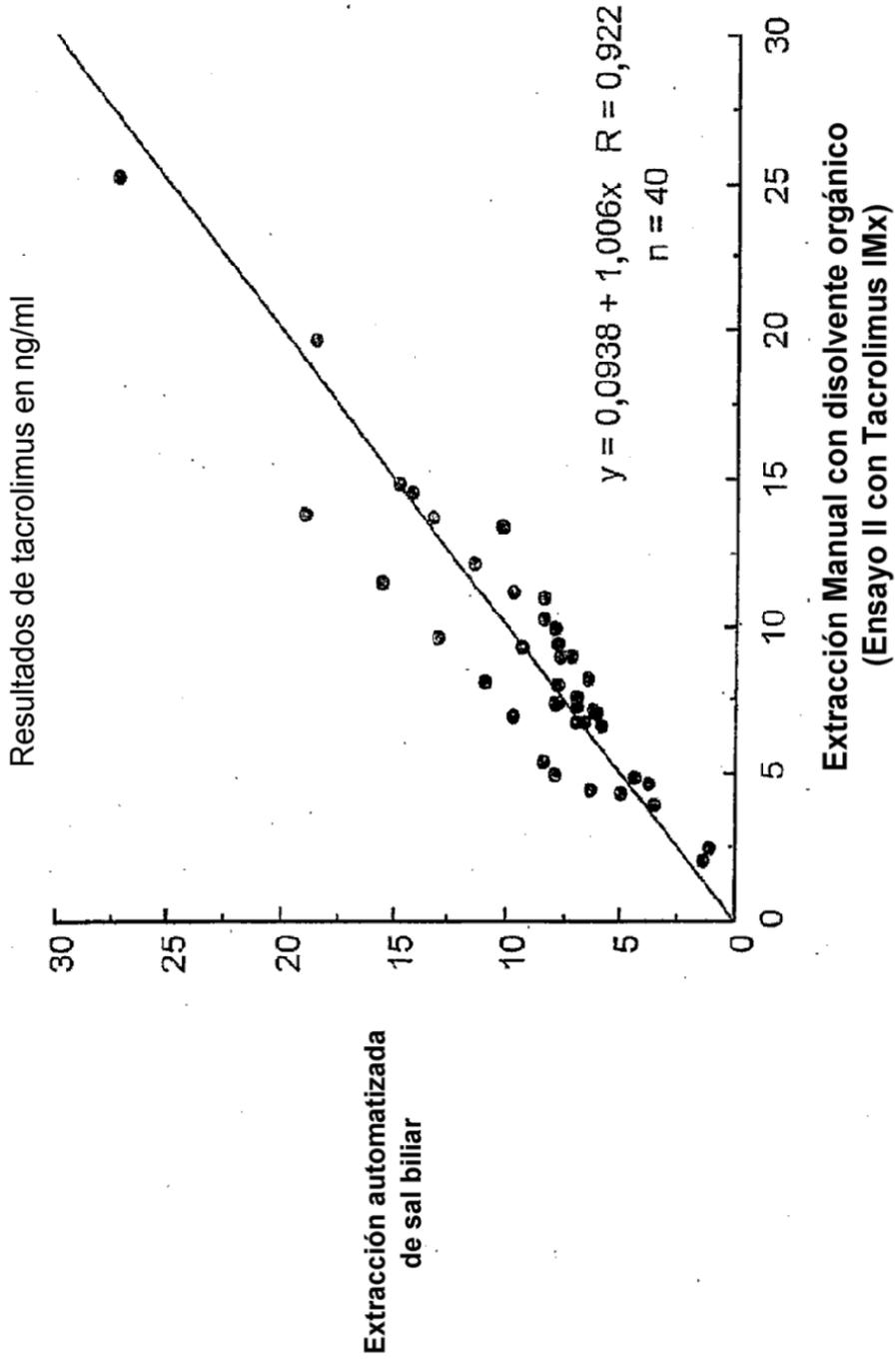


Dosis-respuesta de un ensayo de tacrolimus semi-automatizado realizado en el analizador Abbott ARCHITECT usando extracción de sal biliar



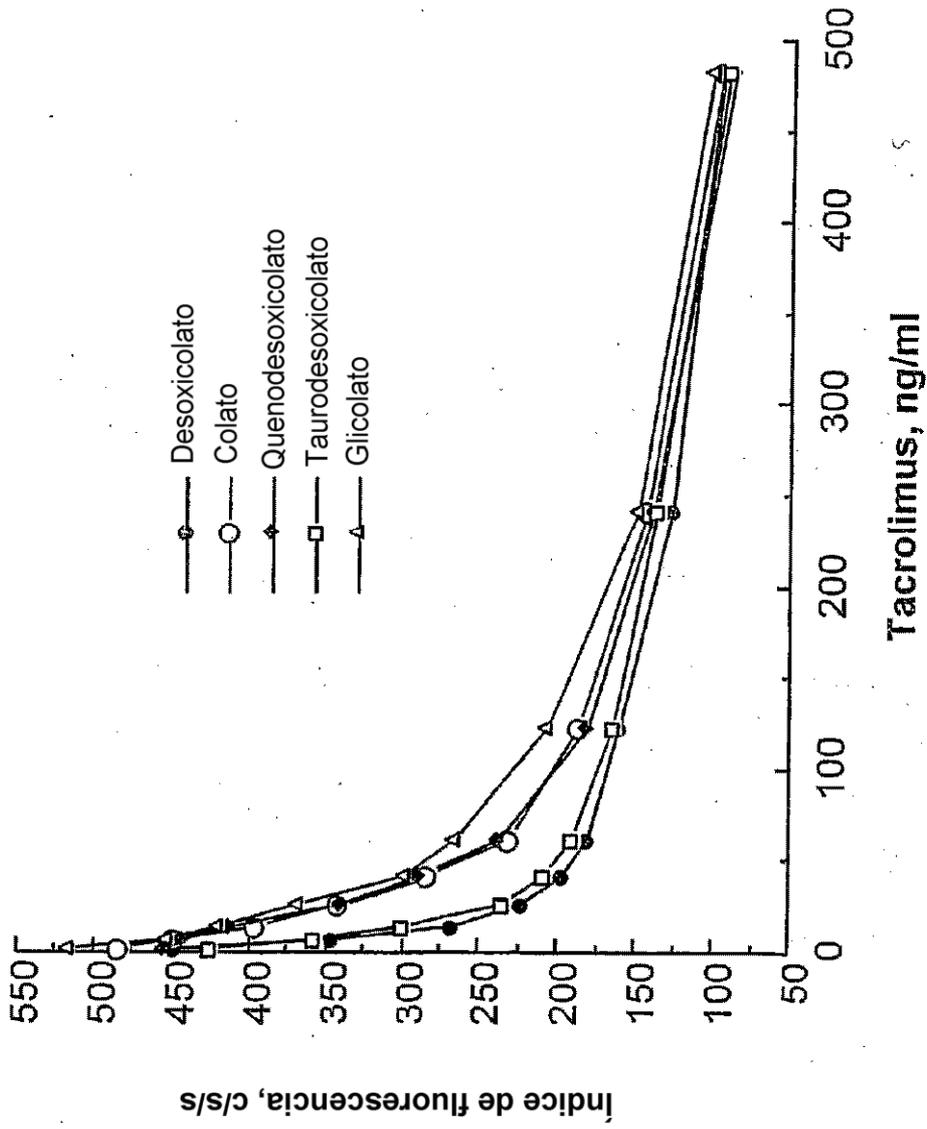
Dosis-respuesta de un ensayo de tacrolimus completamente automatizado realizado en el analizador Abbott IMx usando extracción de sal biliar

FIGURA 3



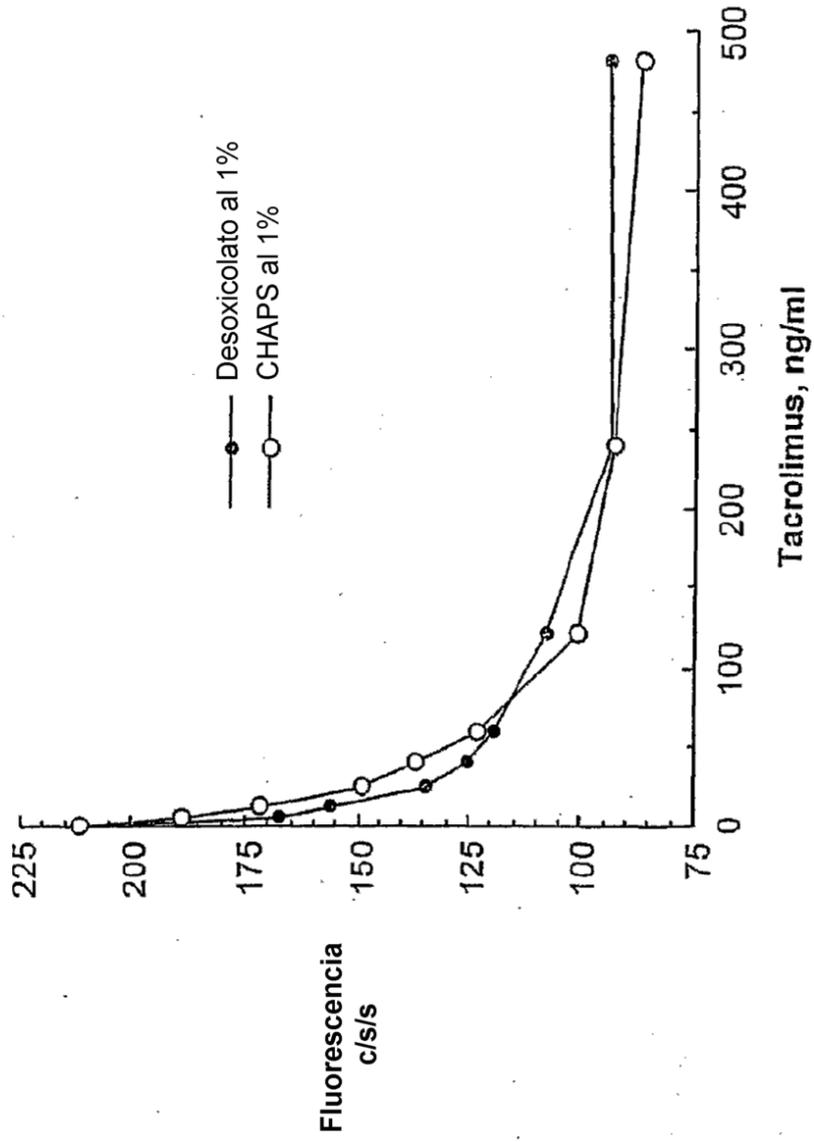
Comparación de los resultados obtenidos de muestras de pacientes a los que se ha administrado tacrolimus a partir de un ensayo de tacrolimus completamente automatizado usando extracción con sal biliar frente a los resultados obtenidos a partir de un ensayo disponible en el mercado utilizando extracción manual con disolvente orgánico

FIGURA 4



Dosis-respuesta de un ensayo de tacrolimus completamente automatizado realizado en el analizador Abbott IMx usando diferentes sales biliares para la extracción

FIGURA 5



Dosis-respuesta de extracción de tacrolimus con desoxicolato y CHAPS