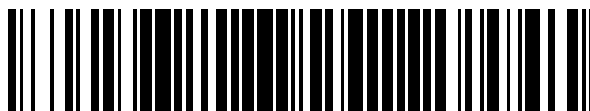


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 167**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08769692 .8**  
96 Fecha de presentación: **23.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2174137**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Inmunoensayos que muestran reactividad cruzada reducida con metabolitos de analito de fármacos hidrófobos**

30 Prioridad:  
**24.05.2007 US 940062 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.03.2012**

73 Titular/es:  
**ABBOTT LABORATORIES  
100 ABBOTT PARK ROAD  
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064, US**

72 Inventor/es:  
**BRATE, Elaine, M.;  
FINLEY, David, M.;  
HOLETS-MCCORMACK, Shelley, R.;  
PACENTI, David, P.;  
PIKTEL, Ryan, E.;  
SHIELDS, Michelle;  
SPRING, Thomas, G. y  
WANG, Philip, P.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

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).

ES 2 377 167 T3

## DESCRIPCIÓN

Inmunoensayos que muestran reactividad cruzada reducida con metabolitos de analito de fármacos hidrófobos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a inmunoensayos que muestran reactividad cruzada reducida con metabolitos de analito. Entre otras cosas, la divulgación se refiere a inmunoensayos de diagnóstico para determinar la concentración o nivel, en una muestra de ensayo, de un fármaco hidrófobo que metaboliza *in vivo* o *in vitro* para formar metabolitos de reacción cruzada, en los que se reduce la reactividad cruzada con estos metabolitos del analito del fármaco. En particular, la divulgación se refiere a estos inmunoensayos en los que el fármaco hidrófobo es un inmunosupresor.

15 **Antecedentes**

Los fármacos inmunosupresores tales como sirolimus (también conocido como rapamicina), tacrolimus (también conocido como FK506), y ciclosporina ("CsA") son eficaces para el tratamiento del rechazo de órganos o tejidos después de una cirugía de trasplante, de enfermedad de injerto contra hospedador y de enfermedades autoinmunes en humanos. Durante la terapia con fármacos inmunosupresores, es un aspecto importante del cuidado clínico controlar los niveles de concentración en sangre de los inmunosupresores porque niveles insuficientes de fármaco conducen al rechazo del injerto (órgano o tejido) y niveles excesivos conducen a efectos secundarios indeseados y toxicidad. Por ejemplo, el tacrolimus exhibe algo de toxicidad similar a la de la CsA, que incluye nefrotoxicidad, complicaciones del tracto intestinal y neurotoxicidad. (Véase, Murthy, J.N., et al., *Clinical Biochemistry*, 31 (8):613-617 (1998)). Por lo tanto, se miden los niveles en sangre de inmunosupresores de tal manera que las dosis puedan ajustarse para mantener el nivel de fármaco a la concentración apropiada. Los ensayos de diagnóstico para la determinación de los niveles en sangre de inmunosupresores han encontrado de esta manera un uso clínico amplio.

Tacrolimus es el nombre genérico para un inmunosupresor macrólido producido por la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*, en el suelo (véase, Inamura, N., et al., *Transplantation*, 45(1):206-209 (1988)). El Tacrolimus se ha usado por vía intravenosa y por vía oral para la prevención de rechazo de órganos, particularmente en pacientes que reciben trasplantes de hígado, riñón o médula ósea.

La ciclosporina es un fármaco inmunosupresor a partir de hongos del suelo (*Tolypocladium inflatum*). Aunque principalmente se usaban para prevenir el rechazo de órganos después de un trasplante, la CsA también se ha usado para tratar otras enfermedades tales como anemia aplásica, o para prevenir la enfermedad de injerto contra hospedador. El modo de acción de la CsA es bloquear la activación de los linfocitos T impidiendo la transcripción del gen de IL-2.

El tacrolimus tiene una potencia *in vivo* 50-100 veces mayor que la ciclosporina CsA (véase, Murthy, J.N., et al., *supra* (1998)). El efecto inmunosupresor del tacrolimus es similar al de la CsA y se cree que es a través de la inhibición selectiva de la generación de linfocitos T citotóxicos. *Id.*

Otros fármacos inmunosupresores incluyen sirolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ácido micofenólico.

La diana principal de sirolimus, everolimus (RAD-001), temsorolimus y zotarolimus es mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos), una proteína específica reguladora del ciclo celular, cuya inhibición conduce a la supresión de la proliferación linfocitos T dirigida por citocinas. El everolimus se usa como un inmunosupresor para prevenir el rechazo de órganos transplantados y como fármaco supresor del cáncer. La contra-indicación en el uso de everolimus es un cierto aumento en los niveles de colesterol y, por lo tanto, un incremento en el riesgo cardiovascular.

El micofenolato de mofetilo (MMF) es un éster derivado del ácido micofenólico (AMF) y está aprobado como un fármaco inmunosupresor en pacientes de trasplantes renales. El profármaco MMF se transforma rápidamente *in vivo* en el inmunosupresor activo AMF, que inhibe la inosina monofosfato deshidrogenasa 2. Por lo tanto, el MMD elimina la síntesis de novo de nucleótidos de guanósina, especialmente en linfocitos T y B, y detiene su proliferación.

Una diversidad de diferentes inmunoensayos de diagnóstico están disponibles en el mercado para controlar las concentraciones sanguíneas de fármacos inmunosupresores. Aunque los inmunoensayos están disponibles en varios formatos, todos usan la unión de un anticuerpo o proteína de unión (por ejemplo FKBP) al fármaco inmunosupresor. Un inmunoensayo de la técnica anterior que se usa comúnmente es un ensayo que implica la unión de un primer anticuerpo al fármaco inmunosupresor y la unión de un inmunosupresor marcado (por ejemplo, sirolimus o tacrolimus acridinilado) a los sitios de unión de anticuerpo libres restantes, seguido de la cuantificación a través de la detección del marcador de acridinio.

Varios de estos inmunoensayos usan disolventes orgánicos para extraer el tacrolimus de las muestras de sangre entera. El disolvente orgánico aumenta la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) y/o disminuye la actividad

funcional del anticuerpo que se usa en los ensayos. La actividad reducida del anticuerpo conduce a una menor sensibilidad del ensayo y potencialmente reduce la precisión y solidez. De esta manera, la eficacia de estos inmunoensayos se ve afectada por el disolvente particular para la extracción y la desnaturalización para el inmunosupresor que se usa.

5 Igualmente, la generación *in vivo* de metabolitos para el fármaco inmunosupresor puede repercutir en los resultados del ensayo. La bibliografía actual sugiere que la generación de metabolitos M17 de CsA (también conocidos como AM1) y M1 (también conocidos como AM9) pueden enmascarar la concentración de fármaco precursor activo (CsA). Se sabe que el tacrolimus y el sirolimus forman metabolitos *in vivo*. Los metabolitos principales de primera  
10 generación de tacrolimus son tacrolimus 13-O-desmetilado ("M-I"), tacrolimus 31-O-desmetilado ("M-II"), y tacrolimus 15-O-desmetilado ("M-III").

El inmunoensayo para la determinación de AMF en suero (por ejemplo, después del tratamiento con MMF) produce resultados que son mayores que los obtenidos con los métodos de HPLC. Se cree que esto es debido a la reactividad cruzada de los metabolitos de AMF con los anticuerpos monoclonales. El AMF se metaboliza principalmente a un derivado de glucurónido (MPAG), que se cree que es inactivo. Recientemente, se han  
15 identificado otros dos metabolitos de AMF, incluyendo el acil glucurónido de AMF.

No hace falta decir que la dosificación adecuada del fármaco inmunosupresor es crítica para pacientes de trasplante de órganos y necesita medirse de manera exacta y reproducible en presencia de metabolitos.

El documento EP 0 487 289 A, en nombre de Syntex INC, describe un inmunoensayo para medir la cantidad de ciclosporina en una muestra, poniendo en contacto dicha muestra con ciclosporina conjugada con un marcador y con anticuerpos capaces de unirse al conjugado de ciclosporina-marcador y midiendo la cantidad de conjugado de ciclosporina-marcador unido a los anticuerpos.  
25

En Emeruwa A.C. et al., Canadian Journal of Microbiology, vol. 16, nº 10, 1970, páginas 917-921, se desvela un ensayo de anticuerpo fluorescente, para identificar cepas de *C. Botulinum*, en el que se prepararon conjugados de inmunoglobulina-isotiocianato de fluoresceína y se diluyeron para eliminar la tinción no específica y la reactividad cruzada con serotipos relacionados. Rajkowski K.M et al., Advances in Steroid Analysis '90, Proc. of the 4th Symposium on the Analysis on Steroids, Pecs, Hungary, April 24-26, 1990, S. Gorog ed., proporciona una demostración de que los efectos de las interferencias de la reactividad cruzada en un inmunoensayo pueden incrementarse mediante la dilución las muestras biológicas, en contra de la práctica de dilución de las muestras biológicas para reducir el problema de las interferencias por los reactivos cruzados.  
35

Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de nuevos inmunoensayos que proporcionen medidas exactas de analitos de los fármacos, por ejemplo, inmunosupresores en presencia de sus metabolitos de reacción cruzada. Es un objetivo de la divulgación proporcionar dichos inmunoensayos. Es un objetivo adicional proporcionar inmunoensayos que, de manera óptima, eviten los problemas que acompañan a la modificación de la composición del reactivo de extracción al generar una reactividad cruzada reducida con los metabolitos. Es aún otro objetivo proporcionar inmunoensayos que eviten de manera óptima las consideraciones de coste y trabajo que acompañan a la selección de un anticuerpo u optimización del anticuerpo para una reactividad cruzada reducida con metabolitos del fármaco con reacción cruzada. De la descripción del presente documento se desprenden otros objetivos y realizaciones adicionales.  
45

## Sumario

En una realización, la divulgación se refiere a un inmunoensayo para evaluar la cantidad de un analito de interés en una muestra de ensayo, en el que el analito es un fármaco hidrófobo que se metaboliza para formar uno o más metabolitos de reacción cruzada, en el que el inmunoensayo tiene menos de un 10% de reactividad cruzada (opcionalmente, menos de un 5% de reactividad cruzada) con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra. La muestra de ensayo puede ser una variedad de muestras de pacientes, incluyendo sangre entera.  
50

El fármaco hidrófobo es uno que es soluble en detergentes o disolventes orgánicos. En una realización, el fármaco hidrófobo es un inmunosupresor, especialmente es un inmunosupresor seleccionado entre el grupo que consiste en tacrolimus, sirolimus y ciclosporina. En un aspecto, el inmunosupresor es tacrolimus y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en M-I, M-II, M-III, y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el inmunosupresor es ciclosporina y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en M1 (también conocido como AM9), M8, M9, M13, M17 (también conocido como AM1), M18, M21 y combinaciones de los mismos. En otro aspecto más, el inmunosupresor es ciclosporina y los metabolitos son AM1 y AM9. En otro aspecto más, el inmunosupresor es sirolimus y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en 11-Hidroxi-sirolimus, 41-O-desmetil-sirolimus, 7-O-desmetil-sirolimus y/u O-desmetil-hidroxi-sirolimus y combinaciones de los mismos.  
60

65 En la invención como se define en las reivindicaciones, el inmunoensayo comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con uno o más reactivos de pretratamiento para formar una primera mezcla, en la que dichos uno o más reactivos de pretratamiento lisan cualquier célula y solubilizan cualquier analito presente en la muestra de ensayo;

(b) poner en contacto la primera mezcla con un anticuerpo específico para el analito para formar una segunda mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con analito o metabolito;

(c) lavar la segunda mezcla para eliminar cualquier analito y cualquier metabolito que no haya formado complejos con el anticuerpo y para formar una tercera mezcla en la que la concentración de analito desciende en un orden de magnitud, es decir, un punto decimal de la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) del anticuerpo para analizar;

(d) poner en contacto la tercera mezcla con un compañero de unión específico del anticuerpo marcado con un marcador detectable ("indicador") para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo de anticuerpo con indicador ("complejo anticuerpo-indicador");

(e) lavar la cuarta mezcla para eliminar cualquier indicador que no haya formado complejos con el anticuerpo;

(f) detectar el complejo anticuerpo-indicador como medida de la cantidad de analito presente en la muestra. En una realización, el anticuerpo específico para el analito en la etapa (b) está unido a una fase sólida.

En un aspecto de este inmunoensayo, dichos uno o más reactivos de pretratamiento precipitan en la etapa (a) cualquier proteína de unión a analito presente en la muestra. De manera opcional, el ensayo además comprende eliminar cualquier proteína de unión a analito de la primera mezcla. Dichos uno o más reactivos de pretratamiento pueden seleccionarse entre una variedad de diferentes reactivos de pretratamiento, incluyendo en un aspecto uno o más reactivos de pretratamiento que comprenden saponina, metanol y sulfato de cinc. En otro aspecto, dichos uno o más reactivos de pretratamiento comprenden saponina (por ejemplo, presente de manera opcional en un primer reactivo de pretratamiento), junto con metanol, etilenglicol y sulfato de cinc (por ejemplo, presente de manera opcional en un segundo reactivo de pretratamiento).

En otro aspecto de este inmunoensayo, de manera opcional el anticuerpo específico para el analito se inmoviliza en una fase sólida. El anticuerpo puede seleccionarse entre una variedad de diferentes anticuerpos. En un aspecto, un anticuerpo puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un  $F(ab)_2$ , un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo madurado por afinidad. La fase sólida puede ser una variedad de fases sólidas diferentes, incluyendo en un aspecto una fase sólida seleccionada entre el grupo que consiste en una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, una molécula de armazón, película, papel de filtro, disco y microplaca.

En otro aspecto más de este inmunoensayo, el marcador detectable empleado para el indicador puede ser una variedad de marcadores detectables diferentes, incluyendo en un aspecto en el que el marcador detectable se selecciona entre el grupo que consiste en un marcador radiactivo, un marcador enzimático, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador termométrico, y un marcador de reacción de cadena de inmuno-polimerasa. De manera opcional, el indicador puede comprender múltiples compañeros de unión.

En este inmunoensayo, en una realización, la segunda mezcla además comprende un diluyente de ensayo. De manera opcional, el diluyente de ensayo comprende un tampón, sal, detergente o combinaciones de los mismos. Además, de manera opcional el diluyente de ensayo comprende un tampón, sal, detergente, disolvente o combinaciones de los mismos. En otra realización, la cuarta mezcla en la etapa (d) además comprende un detergente. De manera opcional, el detergente es Triton® X-100, en forma aromática o reducida químicamente. En una realización, el Triton® X-100 es Triton® X-100 reducido.

En un aspecto de este inmunoensayo, el anticuerpo en la etapa (b) tiene una  $K_D$  para el metabolito de reacción cruzada que es entre 10 veces y 1000 veces mayor que la del analito.

En un aspecto adicional de este inmunoensayo, la cantidad de anticuerpo en la etapa (b) está entre un 0,1% y un 10% de la cantidad de analito en la muestra de ensayo. Adicionalmente, en otro aspecto adicional, las concentraciones de analito y metabolito descienden en la tercera mezcla en la etapa (c) de 10 veces a 500 veces comparado con la muestra de ensayo. Además, en otro aspecto, en la etapa (d) la cantidad de analito presente en un complejo con anticuerpo varía entre 1,0 y 10,0 nM, y el indicador está presente en una cantidad entre 0,1 y 1,0 nM.

En aún otro aspecto de este inmunoensayo, de manera opcional, el inmunoensayo además comprende: (i) incubar la primera mezcla en la etapa (a) durante un primer período de incubación; (ii) incubar la segunda mezcla en la etapa (b) durante un segundo período de incubación; y (iii) incubar la cuarta mezcla en la etapa (d) durante un tercer período de incubación. El primer período de incubación de manera opcional comprende un período de 2 minutos a 60 minutos. El segundo período de incubación de manera opcional comprende un período de 2 minutos a 30 minutos. El tercer período de incubación de manera opcional comprende un período de 2 minutos a 30 minutos.

En aún otro aspecto de este inmunoensayo, de manera opcional el inmunoensayo se refiere a una cantidad del complejo anticuerpo-indicador formado con respecto a la cantidad del analito en la muestra de ensayo mediante el uso de una curva patrón para el analito o mediante comparación con un patrón de referencia.

## 5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura del tacrolimus.

La figura 2 muestra la estructura de la ciclosporina A ("CsA" a la izquierda) y un metabolito de CsA (a la derecha), que se denomina en el presente documento "AM1 o M 17". La fórmula molecular y peso molecular de la CsA y el metabolito M 17 (AM1) se enumeran a continuación de la estructura correspondiente.

Las figuras 3A y 3B muestran la estructura del sirolimus (Fig. 3A) y la diferencia estructural del everolimus (RAD) con el sirolimus (Fig. 3B).

La figura 4 muestra un inmunoensayo ejemplar de 2 etapas de acuerdo con la divulgación que además se describe en la sección II (Inmunoensayos de diagnóstico) "A. Inmunoensayo ejemplar."

La figura 5 es un gráfico del efecto de la concentración del indicador Triton® X-100 sobre la señal en unidades relativas de luz (URL) como se describe en el Ejemplo 3. Abscisas: % de Triton® X-100 ("TX100") e indicador. Ordenadas: señal URL. Símbolos: rombos, Calibrador A (0 ng/ml de CsA); cuadrados, Calibrador F (1500 ng/ml de CsA).

La figura 6 es un gráfico del efecto de la concentración del indicador TX100 sobre el % de concentración de CV como se describe en el Ejemplo 3. Abscisas: % de TX100 en el indicador. Ordenadas: Significa % de CV. Símbolos: Puntos de datos obtenidos para los Calibradores de la Serie 1 (Calibrador A que contiene 0 ng/ml de CsA).

La figura 7 es un gráfico que muestra el efecto del procedimiento de extracción sobre la forma de la curva, como se describe en el Ejemplo 4. Abscisas: Concentración de CsA en ng/ml. Ordenadas: Señal en URL. Símbolos: rombos, resultados del ensayo usando pretratamiento ARCHITECT®; cuadrados, resultados del ensayo usando pretratamiento con AxSYM®; círculos, resultados del ensayo usando pretratamiento con TDx.

La figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de la adición de TX100 al diluyente de ensayo, como se describe en el Ejemplo 5. Abscisas: Concentración de CsA en ng/ml. Ordenadas: Señal en URL. Símbolos: cuadrados, añadiendo TX100; rombos, sin añadir TX100

## Descripción detallada

La presente divulgación proporciona inmunoensayos que muestran reactividad cruzada reducida con metabolitos de analito en los que el analito es un fármaco hidrófobo que se metaboliza *in vivo* o *in vitro*. En particular, la divulgación proporciona inmunoensayos de diagnóstico para determinar la concentración o nivel de un fármaco hidrófobo en una muestra de ensayo, en los que se reduce la reactividad cruzada con metabolitos del analito del fármaco. En una realización, el fármaco hidrófobo es un inmunosupresor.

### I. Definiciones

**a. Fármaco hidrófobo que se metaboliza *in vivo* o *in vitro*.** Como se usa en el presente documento, un "fármaco hidrófobo" es uno que tiene una tendencia termodinámica a reducir el área superficial de la molécula de fármaco expuesta al agua, dando como resultado una baja solubilidad en soluciones acuosas, por ejemplo, un fármaco poco soluble o insoluble en agua. Se describen fármacos hidrófobos en diversas farmacopeas tales como la Farmacopea de Estados Unidos (U.S.P.), farmacopeas de otros países y otros trabajos médicos. La solubilidad puede evaluarse mediante diversos medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el coeficiente de reparto entre agua o tampón y n-octanol o ciclohexano. Un "fármaco hidrófobo que se metaboliza *in vivo* o *in vitro*" es un fármaco hidrófobo que, a través de una modificación bioquímica o degradación (por ejemplo, a través de sistemas enzimáticos especializados), se convierte en otro compuesto, normalmente un compuesto químico lipófilo que se excreta más fácilmente como un producto polar. La presente divulgación atañe sólo a los fármacos hidrófobos que se metabolizan para formar metabolitos de reactividad cruzada (como se describe en el presente documento). Los ejemplos incluyen inmunosupresores así como fármacos esteroides (por ejemplo, prednisona, prednisolona, cortisona y similares).

**b. Inmunosupresor.** Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco inmunosupresor," "agente inmunosupresor" o "inmunosupresores" se refiere a un fármaco que ralentiza o detiene la actividad del sistema inmune en un sujeto. Los agentes inmunosupresores se pueden administrar a un sujeto para impedir que el sistema inmune monte una respuesta inmune después de un trasplante de órganos o para tratar una enfermedad causada por un sistema inmune hiperactivo. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no limitado a, un inhibidor de calcineurina tal como, pero no limitado a, ciclosporina, tacrolimus, una diana de rapamicina (mTOR), tal como, pero no limitado a, sirolimus, everolimus, zotarolimus, o temsorolimus, o un inhibidor de inosinmonofosfato deshidrogenasa, tal como micofenolato de mofetilo, un inhibidor de ácido dihidrofólico reductasa, tal como, pero no limitado a, metotrexato, un corticosteroide, tal como, pero no limitado a, prednisolona y metilprednisolona, o un antimetabolito inmunosupresor, tal como, pero no limitado a, azatioprina.

**c. Anticuerpo.** Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (completamente o parcialmente humanizados), anticuerpos de animales tales como, pero sin limitación, un ave (por ejemplo, un pato o ganso), un tiburón o ballena, un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámster, cobaya, gato, perro, rata, ratón, etc.) o un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un chimpancé, etc.), anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenario ("scFv"), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab') incluyendo F(ab')<sub>2</sub>, Fv unidos a disulfuro ("sdFv"), y anticuerpos anti-idiotípicos ("anti-Id") (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la presente divulgación), y fragmentos de unión a epítipo funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos de moléculas de inmunoglobulina activos inmunológicamente, particularmente, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase.

Como se usa en el presente documento, la expresión anticuerpo "humanizado" se refiere a una variante de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende regiones marco conservadas que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Normalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos procedentes de una fuente que no es humana. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco conservadas ("FR") son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina ("Fc"), normalmente de una inmunoglobulina humana. Normalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de los dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas entra dentro del conocimiento de los expertos en la materia.

**d. Anticuerpo de captura.** Un anticuerpo empleado para la captura (por ejemplo, separación) de un analito de una muestra en un inmunoensayo se denomina "anticuerpo de captura". Un anticuerpo de captura como se describe en el presente documento incluye un anticuerpo que es un compañero de unión específico de un analito (por ejemplo, un fármaco hidrófobo tal como un inmunosupresor).

**e. Especificidad.** Como se usa en el presente documento, "específico" o "especificidad" en el contexto de una interacción entre miembros de un par de unión específico (como se define en el presente documento, por ejemplo, un antígeno y anticuerpo) se refiere a la reactividad selectiva de la interacción. Como ejemplo, la expresión "específico para un analito" y expresiones análogas de la misma se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen específicamente a un analito tal como un agente inmunosupresor (incluyendo, pero no limitado a, tacrolimus, sirolimus, everolimus y CsA) y que no se unen específicamente a otros competidores de unión (tales como, pero no limitado a, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes o fármacos). Un péptido, polipéptido, proteína o anticuerpo que se une específicamente a un agente inmunosupresor puede unirse a otros metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes o fármacos con menor afinidad de unión como se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos de diagnóstico, BIAcore®, KinExA® u otros ensayos conocidos en la técnica. Los Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen inmuno-específicamente a un agente inmunosupresor pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos de diagnóstico, BIAcore®, KinExA® u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Un anticuerpo se une inmuno-específicamente a un agente inmunosupresor con una mayor afinidad de unión que a cualquier antígeno de reactividad cruzada como se determina usando técnicas experimentales, tales como, pero no limitadas a, radioinmunoensayos ("RIA") y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima ("ELISA") (véase, por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, 2ª ed., Raven Press, New York, páginas 332-336 (1989)).

**f. Constantes de unión** (por ejemplo, K<sub>D</sub>, k<sub>a</sub>, y k<sub>d</sub>). Como se usa en el presente documento, la expresión "constante de disociación de equilibrio" o "K<sub>D</sub>", como se usa de manera intercambiable, en el presente documento, se refiere al valor obtenido dividiendo la constante de la velocidad de disociación (k<sub>off</sub>) entre la constante de velocidad de asociación (k<sub>on</sub>). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación de equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno.

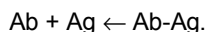
La expresión "constante de velocidad de asociación", "k<sub>on</sub>" o "k<sub>a</sub>", como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere al valor que indica la velocidad de unión de un anticuerpo a su antígeno diana o la velocidad de formación del complejo entre un anticuerpo y un antígeno como se muestra mediante la siguiente ecuación:



Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un ensayo BIAcore® (Suecia). Adicionalmente, también se puede usar un ensayo KinExA® Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

La expresión "constante de la velocidad de disociación", " $k_{off}$ " o " $k^d$ " como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere al valor que indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno diana o la separación de un complejo Ab-Ag en el tiempo en Ab libre y antígeno como se muestra mediante la siguiente ecuación:

5



Los métodos para determinar las constantes de velocidad de disociación se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) (por ejemplo, instrumento disponible en BIAcore International AB, GE Healthcare company, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, también se puede usar un ensayo KinExA® (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

10

g. **Competidor de unión (por ejemplo, Metabolito de Reacción Cruzada).** Como se usa en el presente documento, la expresión "competidor de unión" se refiere a cualquier molécula que compite o que reacciona de forma cruzada con una molécula que contiene un epítipo de interés y de esta manera impide que la molécula interaccione o se una con su compañero de unión específico. Preferentemente, la molécula que compite o reacciona de forma cruzada con la molécula que contiene el epítipo de interés se une al compañero de unión específico con una menor afinidad (tal como, pero no limitado a, una  $K_D$  mayor, una  $k_d$  mayor o una  $k_a$  menor) que la molécula que contiene el epítipo de interés.

15

Los ejemplos de un metabolito competidor de unión incluyen, por ejemplo, metabolitos de fármacos, incluyendo pero sin limitación metabolitos de agentes inmunosupresores: tales como tacrolimus 13-O-desmetilado ("M-I"), tacrolimus 31-O-desmetilado ("M-II") y tacrolimus 15-O-desmetilado ("M-III"), que son metabolitos de tacrolimus; o M1, M8, M9, M13 M17, M18 o M21, que son los metabolitos de ciclosporina. CsA y sus metabolitos se describen en detalle en la bibliografía (por ejemplo, en Kahan et al., "Consensus Document: Hawk's Cay Meeting on Therapeutic Drug Control of Ciclosporina" Clin. Chem., 36/8:1510-1516 (1990)). Por ejemplo, el anticuerpo de ciclosporina tiene una  $K_D$  para el fármaco precursor de ciclosporina de  $9,5 \times 10^{-10}$  M y una  $K_D$  para el metabolito M17 de  $1,45 \times 10^{-8}$  M. Los competidores de unión también pueden incluir: haptenos; hormonas; fármacos; enzimas; receptores; proteínas; péptidos; polipéptidos; oligonucleótidos; o polinucleótidos.

20

25

h. **Reactividad cruzada.** Como se usa en el presente documento, la expresión "reacciona de forma cruzada" o "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de dos epítopos, moléculas o ligandos para reaccionar con el mismo sitio en el mismo compañero de unión específico, normalmente con afinidades diferentes.

30

i. **Epítipo.** Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" o "epítopos" y la expresión "epítopos de interés" se refieren a un sitio o sitios en cualquier molécula que se reconocen y son capaces de unirse a un sitio o sitios complementarios en su compañero de unión específico. La molécula y el compañero de unión específico son parte de un par específico de unión. Por ejemplo, un epítipo puede ser un polipéptido, proteína, hapteno, antígeno de hidrato de carbono (tal como, pero no limitado a, glucolípidos, glucoproteínas o lipopolisacáridos) o polisacáridos, y su compañero de unión específico puede ser, pero no está limitado a, un anticuerpo.

35

j. **Tampón.** Los ejemplos de tampones que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico ["MES"], ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico ["MOPS"], (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico) ["HEPES"], 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol [trishidroximetilaminometano o "TRIS"], tampones fosfato, citrato, borato o combinaciones de los mismos. En una realización, MES es un tampón preferido,

40

k. **Sal.** Son ejemplos de sales que pueden usarse cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato de cinc o combinaciones de los mismos. Una sal preferida es cloruro sódico.

l. **Proteína.** Son ejemplos de proteínas que pueden usarse albúmina de suero bovino ("BSA"), gelatina de pescado, gamma globulina bovina, o combinaciones de los mismos. Una proteína preferida es la gamma globulina bovina.

45

m. **Disolventes.** Los ejemplos de disolventes que se pueden usar son disolventes orgánicos. Los ejemplos de disolventes orgánicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, propilenglicol, etilenglicol, metanol, etanol o combinaciones de los mismos. Los disolventes preferidos son metanol y etilenglicol.

n. **Diluyente de ensayo.** Como se usa en el presente documento, la expresión "diluyente de ensayo" se refiere a cualquier material líquido o sólido que puede emplearse para las condiciones de reacción de un inmunoensayo de diagnóstico. La composición del diluyente de ensayo variará dependiendo de cómo se vaya a usar el diluyente de ensayo (por ejemplo, puede optimizarse adicionalmente para diferentes ensayos de fármaco hidrófobo). Por ejemplo, un diluyente de ensayo puede comprender al menos un tampón, opcionalmente al menos una sal, opcionalmente al menos un detergente, y/u opcionalmente al menos un disolvente (por ejemplo, agua). En algunas realizaciones, el diluyente de ensayo además comprende uno o más aditivos orgánicos sólidos o líquidos, por ejemplo, incluyendo pero no limitado a metanol, etilenglicol o propilenglicol, o detergente. Además, un diluyente de ensayo puede comprender cualquier combinación de al menos un tampón, opcionalmente al menos una sal, opcionalmente al menos un detergente, y opcionalmente al menos un disolvente. A modo de otro ejemplo, un diluyente de ensayo puede comprender un tampón que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 (por ejemplo, tampón MES) y una sal que tiene una concentración de aproximadamente 1 M a aproximadamente 4,5 M (por ejemplo, especialmente NaCl aproximadamente 1,9 M, o NaCl aproximadamente 4,5 M). El diluyente de ensayo puede usarse a partir de un ensayo disponible en el mercado, por ejemplo, un ensayo para analizador ARCHITECT®, TDx o AxSYM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Normalmente los diluyentes de ensayo se adaptan para cada ensayo.

50

55

60

65

o. **Reactivos de pretratamiento (por ejemplo, reactivos de lisis, precipitación y/o solubilización).** Los reactivos de pretratamiento que se usan en ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento son los que lisan cualquier célula y solubilizan cualquier analito que está presente en una muestra de ensayo. Entre otras cosas, la solubilización del analito implica la liberación del analito de cualquier proteína de unión endógena ("proteínas de unión a analito") presente en la muestra. Generalmente, pueden usarse uno o más reactivos de pretratamiento, por ejemplo un reactivo de pretratamiento individual puede usarse solo, o puede usarse un primer reactivo de pretratamiento con un segundo, o tercer, etc. reactivo de pretratamiento. Un reactivo de pretratamiento, por ejemplo, el uso de uno o más reactivos de pretratamiento, puede ser homogéneo (no requiriendo una etapa de separación) o heterogéneo (requiriendo una etapa de separación). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo hay una eliminación adicional de cualquier proteína de unión a analito de la muestra de ensayo antes de proceder a la siguiente etapa del ensayo. Los reactivos de pretratamiento pueden comprender: (a) uno o más disolventes y sal, (b) uno o más disolventes, sal y detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal.

p. **Tampón de lavado.** Se emplea tampón de lavado para las etapas de lavado del ensayo y se refiere al tampón de lavado ARCHITECT® disponible en el mercado (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), aunque también pueden emplearse opcionalmente otros tampones de lavado (por ejemplo, tampón salino con una pequeña cantidad de detergente).

q. **Detergentes.** Los ejemplos de detergentes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no-iónicos o detergentes zwitteriónicos. Un disolvente de ensayo que contiene uno o más detergentes puede usarse para estabilizar y/o solubilizar proteínas u otros analitos de interés contenidos en una muestra, tal como una muestra de ensayo, para prevenir uniones no específicas durante el curso de un inmunoensayo de diagnóstico, para romper células contenidas en una muestra, etc. Los detergentes aniónicos incluyen, pero no se limitan a, ácido quenodesoxicólico, sal sódica del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshidrocolico, digitonina, digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, sal sódica de docusato, sal sódica del ácido glicoquenodesoxicólico, ácido glicocólico hidrato, sal sódica de ácido glicocólico hidrato, ácido glicodesoxicólico monohidrato, sal disódica de 3-sulfato del ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, solución de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, solución de lugol, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato sódico, 1-decanosulfonato sódico, 1-dodecanosulfonato sódico, 1-heptanosulfonato sódico anhidro, 1-nonanosulfonato sódico, 1-propanosulfonato sódico monohidrato, 2-bromoetanosulfonato sódico, colato sódico hidrato, coleato sódico, desoxicolato sódico, desoxicolato sódico monohidrato, dodecilsulfato sódico, hexano sulfonato sódico anhidro, octilsulfato sódico, pentanosulfonato sódico anhidro, taurocolato sódico, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico monohidrato, sal sódica del ácido taurodesoxicólico hidrato, sal disódica de 3-sulfato del ácido tauroglicolítico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma Aldrich, St. Louis, MI.

Los detergentes catiónicos incluyen, pero no se limitan a, bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro de bencildimetilhexadecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiodecildiamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodecitrimeilamonio, bromuro de etilhexadeciltrimetilamonio, reactivo T de Girard, bromuro de hexadeciltrimetilamonio o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma-Aldrich, St. Louis, MI.

Los detergentes no-iónicos incluyen, pero no se limitan a, BigCHAP, bis(polietilenglicol bis[imidazoil carbonilo]), Brij®35, Brij®56, Brij®72, Cremophor® EL, monododecil éter de decaetilenglicol, N-decanoil-N-metilglucamina,  $\alpha$ -D n-decil-maltósido, no-dodecil  $\beta$ -D-maltósido, monododecil éter de heptaetilenglicol, monododecil éter de hexaetilenglicol, monododecil éter de octaetilenglicol, monododecil éter de octaetilenglicol, monohexadecil éter de octaetilenglicol, monoheptadecil éter de octaetilenglicol, monooctadecil éter de octaetilenglicol, monotetradecil éter de octaetilenglicol, monododecil éter de pentaetilenglicol, monododecil éter de pentaetilenglicol, monohexadecil éter de pentaetilenglicol, monohexil éter de pentaetilenglicol, monooctadecil éter de pentaetilenglicol, diglicidil éter de polietilenglicol, éter W-1 de polietilenglicol, polioxietileno 10 tridecileter, estearato de polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, saponina, Span®20, Span®40, Span®60, Span®65, Span®80, Span®85, Tergitol, Triton® CF-21, Triton® CF-32, Triton® DF-12, Triton® DF-16, Triton® GR-5M, Triton® QS-15, Triton® QS-44, Triton® X-15, Triton® X-100, Triton® X-102, Triton® X-114, TWEEN®20, TWEEN®21, TWEEN®40, TWEEN®60, TWEEN®61, TWEEN®65, TWEEN®80, TWEEN®81, TWEEN®85 o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma-Aldrich, St. Louis, MI.

Los detergentes zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de (dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-dimetiltilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma-Aldrich, St. Louis, MI.

Un detergente preferido es Triton® X-100, con el anillo aromático convencional, o con el anillo alifático reducido químicamente en la región hidrófoba del detergente ("forma reducida").

r. **Par/compañero de unión específico.** Como se usa en el presente documento, la expresión "compañero de unión específico" significa un miembro de un par de unión específico. Los miembros de un par de unión específico comprenden al menos dos moléculas cada una de las cuales tiene al menos una estructura complementaria a la estructura de la otra molécula, donde dichas al menos dos moléculas son capaces de unirse a través de una unión de las estructuras complementarias. La expresión también incluye complejos de molécula tales como, por ejemplo enzimas que consisten en apoenzimas y coenzimas, proteínas que consisten en una pluralidad de subunidades, lipoproteínas que consisten en proteínas y lípidos, etc. Los compañeros de unión específicos pueden ser sustancias que se producen naturalmente o, si no, que se han preparado, por ejemplo, mediante síntesis química, técnicas



microbiológicas y/o métodos de manipulación genética. Los ejemplos de compañeros de unión específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, antígenos, haptenos, enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, represores, oligonucleótidos y polinucleótidos, proteína A, proteína G, avidina, estreptavidina, biotina, componente del complemento C1q, proteínas de unión a ácidos nucleicos, etc. Los pares de unión específicos incluyen, pero no se

5 limitan a, anticuerpo-antígeno, anticuerpo-hapteno, operador-represor, nucleasa-nucleótido, biotina-avidina, lectina-polisacárido, proteína de unión a esteroide-esteroide, receptor de fármaco-fármaco, receptor de hormona-hormona, enzima-sustrato, IgG-proteína A, oligonucleótidos o polinucleótidos complementarios, etc.

s. **Indicador.** Los compañeros de unión específicos del anticuerpo empleado para la captura en un inmunoensayo (también llamado anticuerpo de captura) incluyen un también llamado "indicador". Un indicador como se describe en el presente documento incorpora un marcador detectable tal como se conoce en la técnica que lo hace capaz de ser detectado y además es capaz de unirse (reaccionar con) el anticuerpo de captura. Un indicador incluye (a) un analito marcado (por ejemplo, un fármaco hidrófobo marcado tal como un inmunosupresor); y (b) un antígeno marcado o una región antigénica de un analito (por ejemplo, un fármaco hidrófobo de antígeno marcado tal como un inmunosupresor). Un indicador también se refiere en el presente documento a un compañero de unión específico marcado, un "compañero de unión específico de detección" y un "sbp de detección".

10 t. **Proteína de unión a analito.** Como se usa en el presente documento, "proteína de unión a analito" se refiere a una proteína endógena presente en una muestra de ensayo que es capaz de unirse al analito de interés. Como tal proteína de unión a analito puede interferir con un inmunoensayo, generalmente se elimina de la unión al analito, por ejemplo mediante pretratamiento de la muestra con un reactivo de pretratamiento.

20 u. **Sujeto.** Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable independientemente de si el sujeto tiene o está recibiendo actualmente cualquier forma de tratamiento. Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, en un aspecto, un ave (por ejemplo, un pato u oca), en otro aspecto, un tiburón o ballena, o en un aspecto adicional, un mamífero que incluye un no-primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámster, cobaya, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, chimpancé, y un humano).

25 v. **Muestra de ensayo.** Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de ensayo" se refiere a un componente, tejido o fluido del cuerpo de un sujeto que es la fuente del analito de fármaco inmunosupresor. Estos componentes se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser cualquier muestra biológica derivada de suero, plasma, sangre entera, linfa, fluido del SNC, orina, líquido linfático, u otros fluidos corporales de un sujeto. En una realización de acuerdo con la divulgación, la muestra de ensayo es sangre entera. La muestra de ensayo puede obtenerse usando técnicas rutinarias que conocen los expertos en la materia.

## 35 II. Inmunoensayos de diagnóstico

Al menos que se remedie mediante el uso de un anticuerpo específico que no reaccione de forma cruzada con metabolitos (es decir, competidores de unión), o mediante la divulgación como se describe en el presente documento, uno o más competidores de unión presentes en una muestra de ensayo pueden competir con una o más de otras moléculas por la unión a un epítipo de interés o pueden interferir con la unión de una o más de otras moléculas a un epítipo de interés en la muestra de ensayo. Específicamente, uno o más competidores de unión pueden alterar las características de ensayo de una muestra de ensayo desplazando o evitando la unión de un analito de interés con otro componente de la muestra de ensayo. Para determinar si esto está ocurriendo, puede usarse un diluyente de ensayo que comprenda uno o más competidores de unión como se describe en el presente documento para determinar el grado de reactividad cruzada que tiene un anticuerpo para uno o más competidores de unión, y puede usarse para proporcionar condiciones para un inmunoensayo con reactividad cruzada mejorada (es decir, reducida) para uno o más competidores de unión. A lo largo de estas líneas, la presente divulgación proporciona, entre otras cosas, la mejora de la cuantificación de ensayo del fármaco precursor activo (por ejemplo, inmunosupresor, tal como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus o everolimus) en presencia de uno o más de sus metabolitos principales respectivos (por ejemplo, M-I, M-II y/o M-III para tacrolimus.; por ejemplo M1, M8, M9, M13, M17, M18 y/o M21 para ciclosporina; por ejemplo 11-Hidroxi-sirolimus, 41-O-desmetil-sirolimus, 7-O-desmetil-sirolimus y/o 41-O-desmetil-hidroxi-sirolimus para sirolimus).

El entendimiento de la divulgación se facilitará haciendo referencia a las siguientes secciones "Inmunoensayo Ejemplar" e "Inmunoensayos en General".

### 55 A. *Inmunoensayo ejemplar*

En la Figura 4 se representa un ensayo de dos etapas ejemplar preferido de acuerdo con la divulgación, e implica una etapa de captura de anticuerpo (Etapa 1), y una etapa de competición con indicador (Etapa 2). El diagrama en la Figura 4 pertenece al inmunosupresor CsA (una realización de la divulgación), pero se aplica y se adapta fácilmente a otros inmunosupresores (por ejemplo, tacrolimus, sirolimus, everolimus, zotarolimus, temsorolimus MMF, AMF, y similares) y otros fármacos hidrófobos que se metabolizan *in vivo* o *in vitro* para formar metabolitos de reacción cruzada.

65 Todos los disolventes orgánicos y detergentes presentes en la muestra pretratada (por ejemplo, metanol, etilenglicol, saponina) ayudan a solubilizar el fármaco hidrófobo (por ejemplo, CsA) y metabolitos de reacción cruzada (por

ejemplo, "CsA + Metab") en la muestra de sangre extraída. La muestra de sangre extraída se diluye adicionalmente en la etapa de captura del anticuerpo, en la que el entorno del disolvente cambia de un disolvente orgánico a una mezcla acuosa principalmente. El fármaco insoluble en agua y los metabolitos quedan secuestrados ahora en la fase del detergente soluble en agua. En estas condiciones, se sabe que los detergentes forman estructuras micelares, cuya concentración de sal, tipo de detergente y temperatura influyen en el tamaño y estructura. También pueden estar presentes otros componentes del reactivo hidrófobo tales como antiespumantes (por ejemplo, Poli Dimetil Siloxanos) y pueden participar en el secuestro del fármaco. La unión al anticuerpo del fármaco y metabolitos ocurre en este entorno acuoso, rico en detergente.

En la primera etapa, el anticuerpo monoclonal presente en las micropartículas (representado como estructuras en forma de Y sobre esferas) preferentemente está presente en una cantidad de aproximadamente 0,2 nM para el ensayo de la muestra de ensayo que se prevé que comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nM de analito inmunosupresor tal como CsA, y hasta cuatro veces la cantidad del inmunosupresor del metabolito. Sólo aproximadamente un 1% del inmunosupresor (CsA) y metabolito de la muestra puede unirse al anticuerpo en las micropartículas. El inmunosupresor y metabolito que permanecen sin unirse se eliminan en una etapa de lavado.

La etapa de competición con indicador (Etapa 2) opcionalmente incluye NaCl y antiespumante presente en la reacción que además comprende un indicador (inmunosupresor marcado tal como CsA acridinilada, "CsA-Acr"), y detergente (Triton® X-100 reducido, "TX-100(R)"). El Triton® X-100 reducido es Triton® X-100 en el que el anillo de benceno se ha reducido a un anillo ciclohexano. Opcionalmente se pueden usar en la invención tanto Triton® X-100 como Triton® X-100 reducido. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de Triton® X-100. En la segunda etapa, inmunosupresores, metabolito e indicador compiten por los sitios de anticuerpo disponibles, seguido de una etapa de lavado y medición de la señal. En esta segunda etapa, la cantidad de inmunosupresor (por ejemplo, CsA) presente en las micropartículas varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 nM, y se emplea una concentración de indicador de aproximadamente 0,5 nM. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que en el formato de dos etapas, la reducción de las concentraciones de inmunosupresor (por ejemplo, CsA) y metabolito aproximadamente 100 veces en la etapa de competición con indicador, permite la selectividad de unión a fármaco, debido a diferencias favorables en las constantes de disociación del anticuerpo para el fármaco y metabolito. En particular, esto significa que el inmunosupresor (tales como CsA), el metabolito y el indicador están todos compitiendo a muy bajas concentraciones (menores de 1 nM), cerca de la concentración  $K_D$  para el inmunosupresor (tal como CsA) en la que tiene lugar el 50% de unión. Se podría esperar que la  $K_D$  para la unión de metabolito fuera mucho mayor (es decir, un reflejo de una unión más débil). A concentraciones de metabolito muy por debajo de la  $K_D$  del metabolito, muy poco metabolito se unirá al anticuerpo, particularmente en una situación competitiva, en la que está presente una unión fuerte de CsA e indicador. Esto daría como resultado una reactividad cruzada (o interferencia) no significativa o muy pequeña por los metabolitos.

### **B. Inmunoensayos en general**

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a inmunoensayos de diagnóstico que pueden usarse para la cualificación y/o cuantificación de un fármaco hidrófobo como analito (por ejemplo, un agente inmunosupresor) en una muestra de ensayo. Los inmunoensayos de diagnóstico de la presente divulgación pueden realizarse usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, un formato de inhibición competitiva. Un formato preferido es un ensayo de competición de dos etapas que implica la captura de anticuerpo en una primera etapa, y competición de indicador en una segunda etapa, e incluye al menos una etapa de lavado. El ensayo de competición óptimamente está precedido por un pretratamiento de muestra como se describe en el presente documento.

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a inmunoensayos de diagnóstico que pueden usarse para la cualificación y/o cuantificación de un fármaco hidrófobo como analito (por ejemplo, un agente inmunosupresor) en una muestra de ensayo. En particular, la divulgación se refiere a inmunoensayos para un fármaco hidrófobo que se metaboliza para formar uno o más metabolitos de reacción cruzada *in vivo* (es decir, antes del aislamiento de la muestra de ensayo) o *in vitro* (por ejemplo, después del aislamiento de la muestra de ensayo, tal como durante la manipulación y/o almacenaje de la muestra). Los inmunoensayos de diagnóstico de la presente divulgación pueden realizarse usando cualquier formato de anticuerpo inmovilizado conocido en la técnica.

Óptimamente, el ensayo de competición está precedido por un pretratamiento de muestra como se describe en el presente documento (por ejemplo, Ejemplos y Sección IV). El pretratamiento de muestra normalmente comprende poner en contacto la muestra de ensayo con uno o más reactivos de pretratamiento de tal manera que se forme una primera mezcla. El reactivo de pretratamiento lisa cualquier célula y libera el analito de cualquier proteína de unión a analito presente en la muestra de ensayo. Opcionalmente, se elimina de la primera mezcla cualquier proteína de unión a analito (por ejemplo, usando uno o más reactivos de pretratamiento para precipitar proteínas de la primera mezcla). En una realización se eliminan las proteínas de unión a analito precipitadas (pretratamiento heterogéneo) mientras que, en otra realización, las proteínas de unión a analito son solubles y no se eliminan (pretratamiento homogéneo). Sin embargo, se realiza la liberación de las proteínas de unión a analito del analito de fármaco, para prevenir cualquier posibilidad de interferencia en el inmunoensayo.

En estos inmunoensayos competitivos para la detección de analito en una muestra de ensayo sospechosa de contener o que se sabe que contiene analito (por ejemplo, agente inmunosupresor), la muestra de ensayo se pone en contacto con al menos un anticuerpo que se une a al menos un epítipo del analito para formar un complejo inmune anticuerpo-analito. El anticuerpo empleado (también llamado "anticuerpo de captura") opcionalmente se inmoviliza en una fase sólida. El anticuerpo es específico (es decir, es un compañero de unión específico) del analito. Este anticuerpo no necesita optimizarse para tener reactividad cruzada reducida para cualquier metabolito de reacción cruzada que pueda estar presente en la muestra. En virtud de los sorprendentes e inesperados resultados descritos en el presente documento, es posible realizar el inmunoensayo de tal modo que la reactividad cruzada con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra se reduzca a menos de un 10%, incluso en una situación en la que en otros ensayos no realizados como se recomienda en el presente documento, el anticuerpo de captura reacciona de forma cruzada con el metabolito a un nivel mayor del 10%.

Los anticuerpos descritos en la Sección III en el presente documento pueden usarse en estos inmunoensayos para formar estos complejos anticuerpo-analito (por ejemplo, agente inmunosupresor) en una segunda mezcla derivada de una muestra de ensayo pretratada (primera mezcla). Opcionalmente, la cantidad de anticuerpo en la segunda mezcla está entre un 0,1% y un 10% de la cantidad de analito presente en la muestra de ensayo, especialmente entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 2%, particularmente aproximadamente un 1%.

Por supuesto, el anticuerpo específico para el analito también puede formar en la segunda mezcla un complejo con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra de ensayo. Por consiguiente, el lavado de la segunda mezcla se realiza para eliminar cualquier analito y metabolito que no ha formado complejos con el anticuerpo. Todas las etapas de lavado descritas en el presente documento están hechas de la manera conocida en la técnica usando un tampón de lavado apropiado. Como consecuencia de este lavado, se forma una tercera mezcla en la que la concentración de analito desciende en un orden de magnitud de la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) del anticuerpo para el analito, es decir, cambia aproximadamente un punto decimal. Opcionalmente la concentración de analito disminuye aproximadamente la mitad de un orden de magnitud de la  $K_D$  del anticuerpo para el analito, es decir, un cambio de aproximadamente medio punto decimal.

Además, como una consecuencia de este lavado, las concentraciones de analito (por ejemplo, CsA) y metabolito descienden en la tercera mezcla de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 1000 veces, especialmente de 10 veces a 500 en comparación con la muestra de ensayo. Opcionalmente, estas concentraciones disminuyen de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 250 veces, o de aproximadamente 75 veces a aproximadamente 200 veces, o aproximadamente 100 veces. Por supuesto, la divulgación también abarca otros intervalos, ya que el intervalo depende de la relación entre las  $K_D$  del fármaco hidrófobo y metabolito, así como de la concentración inicial fármaco hidrófobo/metabolito presente antes de la etapa de captura del anticuerpo.

Posteriormente, la tercera mezcla se pone en contacto con un compañero de unión específico del anticuerpo marcado con un marcador detectable (por ejemplo, un también llamado "sbp de detección" o "indicador") para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo de compañero de unión específico de anticuerpo. En esta cuarta mezcla, el compañero de unión específico se une solo a los sitios en el anticuerpo de captura que no están ocupados/formando complejo con el analito o metabolito. Después del lavado de la cuarta mezcla para eliminar el compañero de unión específico que no ha formado complejo con el anticuerpo, el complejo de compañero de unión específico de anticuerpo se detecta como una medida de la cantidad de analito presente en la muestra. La cantidad de complejo de compañero de unión específico de anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. En este inmunoensayo, hay menos de un 10% de reactividad cruzada con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra. Opcionalmente hay menos de aproximadamente un 7% de reactividad cruzada, menos de un 5% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 4% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 3% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 2% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 1% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 0,5% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 0,3% de reactividad cruzada, menos de aproximadamente un 0,2% de reactividad cruzada, o menos de aproximadamente un 0,1% de reactividad cruzada. En la mayoría de los casos, la detección de la menor cantidad de reactividad cruzada está limitada por la sensibilidad (es decir, límite de detección) del ensayo, que en el caso del ensayo de CsA descrito en el presente documento parece ser de aproximadamente un 0,1%. Sin embargo, el límite más bajo puede variar en otro ensayo de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, basándose en la precisión del ensayo, la cantidad de señal y otros factores (por ejemplo, acceso a tecnologías de detección desarrolladas posteriormente y potencialmente más sensibles).

Además, debido a la manera en la que se realiza el inmunoensayo, preferentemente en la cuarta mezcla en la que tiene lugar la competición de indicador, el volumen se reduce si se compara con la segunda mezcla en la que se realiza la captura de anticuerpo, de tal manera que la concentración del anticuerpo presente en la cuarta mezcla de la etapa de competición con indicador desciende de aproximadamente 8 veces a aproximadamente 3 veces, especialmente de aproximadamente 7 veces a aproximadamente 4 veces, particularmente dentro de aproximadamente 5 veces del anticuerpo presente en la segunda mezcla de la etapa de captura de anticuerpo. En la cuarta mezcla en la que se realiza la competición de indicador, el volumen de la mezcla varía de aproximadamente 20  $\mu$ l a aproximadamente 80  $\mu$ l, especialmente de aproximadamente 30  $\mu$ l a aproximadamente 70  $\mu$ l, opcionalmente

de aproximadamente 40 µl a aproximadamente 60 µl, y particularmente aproximadamente 50 µl. En la segunda mezcla en la que tiene lugar la captura del anticuerpo, el volumen de la mezcla varía de 100 µl a aproximadamente 400 µl, especialmente de aproximadamente 150 µl a aproximadamente 350 µl, opcionalmente de aproximadamente 200 µl a aproximadamente 300 µl, y particularmente aproximadamente 250 µl, aproximadamente 225 µl, aproximadamente 200 µl, o aproximadamente 175 µl.

En una realización, la cantidad de analito presente en un complejo con anticuerpo varía de aproximadamente 0,01 a 10 nM (especialmente de aproximadamente 0,1 a 1,0 nM), y el compañero de unión específico (indicador) está presente en una cantidad entre 0,1 y 1,0 nM (especialmente aproximadamente 0,5 nM).

La detección de estos complejos inmunes se hace usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el compañero de unión específico de la presente divulgación puede marcarse con un marcador detectable para detectar la presencia del complejo anticuerpo-analito (es decir, una relación inversamente proporcional). Los marcadores detectables y su unión a un compañero de unión específico tal como una porción antigénica de un analito de fármaco hidrófobo (por ejemplo, agente inmunosupresor) se analizan con mayor detalle más adelante.

En una realización preferida, se usa una alícuota de un antígeno marcado de al menos un agente inmunosupresor de una concentración conocida para competir con al menos un agente inmunosupresor y cualquier metabolito de reacción cruzada del mismo en una muestra de ensayo para unirse a un anticuerpo (tal como un anticuerpo de captura de la presente divulgación) en un formato de ensayo competitivo. Los antígenos de agentes inmunosupresores y procedimientos de fabricación de antígenos son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. El agente inmunosupresor o antígeno del agente inmunosupresor puede marcarse con cualquier marcador detectable conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, pero sin limitación, el marcador detectable puede ser un marcador radiactivo tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ , un marcador enzimático tal como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc., un marcador quimioluminiscente, tal como, ésteres de acridinio, luminal, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc., un marcador fluorescente, tal como, fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (seleniuro de cadmio protegido terminalmente con sulfuro de cinc), un marcador termométrico o un marcador de reacción en cadena de inmunopolimerasa. Una introducción a los marcadores, procedimientos de marcado y detección de marcadores se encuentra en Polak and Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que es un manual combinado y catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos en el presente documento, puede usarse el antígeno acridinio-CsA u otro inmunosupresor marcado (por ejemplo, CsA biotinilada u otro inmunosupresor) en el formato competitivo.

En una realización, el inmunoensayo se refiere a una cantidad del complejo anticuerpo-compañero de unión específico (es decir, indicador) formado con respecto a la cantidad del analito en la muestra de ensayo bien sea usando una curva patrón para el analito, o comparando con un patrón de referencia. Puede emplearse cualquier medio bien conocido para determinar la cantidad de analito (por ejemplo, como se define en los Ejemplos).

El agente inmunosupresor (o antígeno del agente inmunosupresor) puede marcarse con cualquier marcador detectable conocido por los expertos en la materia para abarcar el también llamado indicador. En una realización, el anticuerpo de captura de la presente divulgación puede inmovilizarse en un soporte sólido. Además, si es necesario o se desea, el soporte sólido puede modificarse para permitir reactividad con diversos grupos funcionales en el anticuerpo. Esta modificación implica opcionalmente el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no se limitan a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Como alternativa, el anticuerpo de captura de la presente divulgación puede acoplarse con otro anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que se ha inmovilizado en un soporte sólido, tal como una micropartícula (véanse, por ejemplo, los Ejemplos). Esta aproximación es un ejemplo de un anticuerpo (un compañero de unión específico particular) que comprende múltiples compañeros de unión. El compañero de unión específico marcado (por ejemplo, indicador), como el anticuerpo de captura, puede comprender múltiples compañeros de unión. Con el uso de un indicador que comprende múltiples compañeros de unión, puede ser posible hacer uso de compañeros de unión que tengan diferentes fuerzas de unión o afinidad para alterar las características del ensayo.

El compañero de unión específico marcado (por ejemplo, agente inmunosupresor marcado o antígeno del agente inmunosupresor, o también llamado indicador), el analito de la muestra de ensayo y el anticuerpo se incuban para permitir la formación del complejo anticuerpo-analito. En términos generales, las diversas incubaciones en el inmunoensayo (por ejemplo, la incubación de la primera mezcla durante un primer período de incubación, incubación de la segunda mezcla durante un segundo período de incubación, e incubación de la cuarta mezcla durante un tercer período de incubación) pueden realizarse a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C (especialmente de aproximadamente 33 °C a aproximadamente 38 °C), y durante un período de al menos aproximadamente dos (2) minutos a aproximadamente

dieciocho (18) horas, preferentemente de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 24 minutos, más preferentemente de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 18 minutos.

5 Preferentemente, el primer período de incubación (es decir, la etapa de pretratamiento) comprende un período de 2 minutos a 60 minutos. Preferentemente, el segundo período de incubación (es decir, etapa de captura de anticuerpo) comprende un período de 2 minutos a 30 minutos, especialmente de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 25 minutos, particularmente de aproximadamente 22 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 18 minutos, o aproximadamente 16 minutos. Preferentemente, el tercer período de incubación (es decir, etapa de competición con indicador) comprende un período de 2 minutos a 30 minutos, especialmente de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 8 minutos, particularmente de aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 4 minutos o aproximadamente 3 minutos.

15 Normalmente se generan al menos dos especies diferentes de complejo de anticuerpo en la etapa de captura de anticuerpo y en la etapa de competición con indicador. Específicamente, en la etapa de captura de anticuerpo uno de los complejos de anticuerpo generados es con el analito y otro es con cualquier metabolito de analito de reacción cruzada. En la etapa de competición con indicador, estos dos tipos de complejos pueden estar presentes en alguna cantidad, y adicionalmente, también se forma un complejo de indicador (compañero de unión específico que tiene un marcador detectable) con el anticuerpo. Preferentemente, el indicador no unido se separa del resto de la mezcla y la cantidad del marcador detectable que ha formado complejo con el anticuerpo después se cuantifica por un medio radiactivo, fluorescente, quimioluminiscente, enzimático u otros medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se usa un marcador enzimático, el complejo marcado se hace reaccionar con un sustrato para el marcador que proporciona una reacción cuantificable tal como el desarrollo de color. Si el marcador es un marcador radiactivo, el marcador se cuantifica usando un contador de centelleo. Si el marcador es un marcador fluorescente, el marcador se cuantifica estimulando el marcador con una luz de un color (que se conoce como "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que es conocido como "longitud de onda de emisión") que emite el marcador en respuesta a la estimulación. Si el marcador es un marcador quimioluminiscente (por ejemplo, acridinio, como se describe en los Ejemplos), el marcador se cuantifica detectando la luz emitida bien sea visualmente o mediante el uso de luminómetros, película de rayos-x, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. La concentración del analito (por ejemplo, agente inmunosupresor) en la muestra de ensayo puede determinarse después comparando la cantidad de marcador detectable que ha formado complejo con el anticuerpo con una curva patrón. La curva patrón puede generarse usando diluciones seriadas del analito (por ejemplo, agente inmunosupresor) de concentración conocida, mediante espectroscopía de masas, gravimétricamente y mediante otras técnicas conocidas en este campo.

35 En la etapa de captura de anticuerpo que preferentemente precede la competición del indicador, el complejo anticuerpo-analito (por ejemplo, agente inmunosupresor) puede separarse de la mezcla de muestra de ensayo uniendo el anticuerpo a un soporte sólido, y eliminando después el resto de la muestra de ensayo del contacto con el soporte sólido. Por ejemplo, si el anticuerpo de captura se une a un soporte sólido tal como un pocillo o una perla, la separación puede realizarse eliminando el fluido (de la mezcla de la muestra de ensayo) del contacto con el soporte sólido. Opcionalmente, la separación se realiza lavando con un tampón de lavado. Opcionalmente, el soporte sólido (por ejemplo, también llamado "fase sólida") es cualquier fase o soporte sólido adecuado tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, opcionalmente, la fase sólida se selecciona entre el grupo que consiste en una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, una molécula armazón, cinta, papel de filtro, disco y microplaca. El lavado de las fases sólidas entre reacciones puede realizarse usando soluciones de lavado y técnicas de fluidica conocidas en la técnica. La fase sólida preferida es una micropartícula magnética y un tampón de lavado preferido contiene sal y detergente no iónico.

50 Así pues, en una realización, en el presente documento se proporciona un inmunoensayo para evaluar la cantidad de ciclosporina en una muestra de ensayo en la que también pueden estar presentes uno o más metabolitos de reacción cruzada de ciclosporina, comprendiendo el inmunoensayo las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con uno o más reactivos de pretratamiento para formar una primera mezcla, en la que dichos uno o más reactivos de pretratamiento lisan cualquier célula y solubilizan cualquier analito presente en la muestra de ensayo;
- 55 (b) poner en contacto la primera mezcla con un anticuerpo específico para ciclosporina y que se inmoviliza en una fase sólida para formar una segunda mezcla que comprende un complejo de anticuerpo con ciclosporina o un metabolito de ciclosporina;
- (c) lavar la segunda mezcla para eliminar cualquier analito y cualquier metabolito de ciclosporina que no ha formado complejo con el anticuerpo y para formar una tercera mezcla en la que la concentración de ciclosporina desciende en un orden de magnitud de la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) del anticuerpo para ciclosporina;
- 60 (d) poner en contacto la tercera mezcla con ciclosporina marcada con un marcador detectable tal como acridinio ("indicador") para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con indicador ("complejo anticuerpo-indicador");
- 65 (e) lavar la cuarta mezcla para eliminar cualquier indicador que no ha formado complejo con anticuerpo; y
- (f) detectar el complejo anticuerpo-indicador como medida de la cantidad de ciclosporina presente en la

muestra, en la que el inmunoensayo tiene menos de un 10% de reactividad cruzada (o como alternativa menos de un 5% de reactividad cruzada) con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada de ciclosporina presentes en la muestra.

- 5 En un aspecto de este inmunoensayo, opcionalmente la cantidad de anticuerpo en la etapa (b) está comprendida entre un 0,1 % y un 10% de la cantidad de ciclosporina presente en la muestra de ensayo. Además, opcionalmente las concentraciones de ciclosporina y metabolito disminuyen en la tercera mezcla en la etapa (c) de 10 veces a 500 veces si se compara con la muestra de ensayo. Adicionalmente, opcionalmente in la etapa (d), la cantidad de ciclosporina presente en un complejo con anticuerpo varía de 1,0 a 10,0 nM, y el indicador está presente en una cantidad de entre 0,1 y 1,0 nM. Además, opcionalmente el anticuerpo en la etapa (b) tiene una  $K_D$  para metabolito de ciclosporina de reacción cruzada que es entre 10 veces y 1000 veces mayor que para el analito.

15 En otro aspecto del inmunoensayo, la muestra de ensayo es sangre entera. Opcionalmente, el metabolito de ciclosporina se selecciona entre el grupo que consiste en M1, M8, M9, M13, M17, M18, M21 y combinaciones de los mismos. En particular, el metabolito de ciclosporina puede ser M1 o M9.

20 Los inmunoensayos descritos en el presente documento (es decir, el inmunoensayo de ciclosporina o los otros inmunoensayos de fármaco inmunosupresor) pueden realizarse opcionalmente para controlar pacientes que reciben terapia inmunosupresora (por ejemplo, para el tratamiento de rechazo de órganos o tejidos después de una cirugía de trasplante, enfermedad de injerto contra hospedador o enfermedad autoinmune), y además opcionalmente pueden emplearse para ayudar al médico a tomar decisiones terapéuticas. A lo largo de estas líneas, la presente divulgación también proporciona un método de control del curso de tratamiento de un sujeto con un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) que se metaboliza para formar uno o más metabolitos de reacción cruzada, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 25 (a) proporcionar una muestra de ensayo;  
 (b) determinar la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) en la muestra de ensayo de acuerdo con el inmunoensayo descrito en el presente documento; y  
 30 (c) comparar la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) en la muestra de ensayo determinada en la etapa (b) con un nivel predeterminado (bien conocido para fármacos inmunosupresores).

En otro aspecto, este método comprende las etapas de:

- 35 (a) proporcionar una primera muestra de ensayo del sujeto antes de que se le haya administrado al sujeto un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina);  
 (b) determinar la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) en la primera muestra de ensayo;  
 40 (c) comparar la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) determinada en la etapa (b) con un nivel predeterminado;  
 (d) tratar al sujeto con un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) durante un período de tiempo si la comparación de la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) determinada en la etapa (c) con el nivel predeterminado así lo justifica;  
 45 (e) proporcionar una segunda y/o muestras de ensayo posteriores del sujeto después de que se le haya administrado al sujeto un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina);  
 (f) determinar la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) en la segunda y/o muestras de ensayo posteriores;  
 50 (g) comparar las concentraciones de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) determinadas en la etapa (f) con la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) determinada en la etapa (b).

De acuerdo con estos métodos, el tratamiento puede alterarse si la concentración de fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina) medida es mayor o menor que un nivel predeterminado recomendado, o si una tendencia en los niveles (incremento o descenso) basada en un nivel medido previamente sugiere que debe alterarse el tratamiento.

### III. Anticuerpos

60 Los anticuerpos para uso en los inmunoensayos de la presente divulgación pueden prepararse usando técnicas rutinarias conocidas para los expertos en la materia, o disponibles en el mercado.

65 Por ejemplo, opcionalmente puede realizarse un ensayo de CsA usando como anticuerpo de captura los anticuerpos descritos en el presente documento, usando cualquiera de los anticuerpos descritos en la extensa bibliografía sobre ensayos de CsA, usando cualquiera de los anticuerpos específicos para CsA disponibles en el mercado, o usando componentes que contienen anticuerpo de cualquiera de los kits disponibles en el mercado para realizar ensayos de CsA. Igualmente, se puede realizar un ensayo inmunosupresor de tacrolimus, sirolimus u otros ensayos de acuerdo

con la divulgación usando como anticuerpo de captura cualquiera de los anticuerpos descritos en la extensa bibliografía sobre tacrolimus, sirolimus y otros ensayos inmunosupresores, usando cualquiera de los anticuerpos disponibles en el mercado específicos para tacrolimus, sirolimus u otros inmunosupresores, o usando componentes que contienen anticuerpos de cualquiera de los kits disponibles en el mercado para realizar ensayos de tacrolimus, sirolimus u otros inmunosupresores.

En particular, otros anticuerpos monoclonales de Anti-Ciclosporina que pueden emplearse incluyen anti-ciclosporina A monoclonal de ratón [número de catálogo RDI-TRK3C13-CSZ.22, RDI Division of Fitzgerald Industries Intl, Concord, MA]. Otros anticuerpos monoclonales Anti-Tacrolimus que pueden emplearse incluyen el anticuerpo monoclonal FKBP1B (M01), clon 4H5-1B6 [número de catálogo H00002281-M01, Abnova Corporation, Taipei City, Taiwan] y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FK506 [número de catálogo 4FK42, HyTest Ltd., Turku Finland]. Otros anticuerpos monoclonales anti-sirolimus que pueden emplearse incluyen anticuerpo monoclonal mTOR [número de catálogo 2972 Cell Signaling Technology, Beverly, MA].

Los anticuerpos útiles en los métodos del inmunoensayo de la divulgación incluyen tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales se inducen inyectando (por ejemplo, por inyección subcutánea o intramuscular) un inmunógeno en un mamífero no humano adecuado (por ejemplo, un ratón, cabra o conejo). Generalmente, el inmunógeno debería inducir la producción de altas titulaciones de anticuerpo con relativamente alta afinidad por el antígeno diana.

Si se desea, el antígeno endógeno (es decir, analito de interés) puede conjugarse con una proteína de transporte mediante técnicas de conjugación que son bien conocidas en la técnica. Los vehículos usados comúnmente incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina, albúmina de suero bovino (BSA) y toxoide tetánico. El conjugado después se utiliza para inmunizar al animal.

Después se obtienen los anticuerpos de las muestras de sangre tomadas del animal. Las técnicas usadas para producir anticuerpos policlonales se describen extensamente en la bibliografía (véase, por ejemplo Methods of Enzymology, "Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections," Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981)). Los anticuerpos policlonales producidos por los animales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por unión y elución de una matriz a la que se ha unido el antígeno diana. Los expertos en la materia conocerán varias técnicas comunes en el campo de la inmunología para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como monoclonales, véase, por ejemplo, Coligan, et al. (1991) Unidad 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience.

Para muchas aplicaciones, se prefieren los anticuerpos monoclonales (mAb) porque su especificidad de unión es constante y puede caracterizarse bien. El método general que se usa para la producción de hibridomas que secretan mAb se conoce bien. (Véase, Kohler, et al., Nature, 256:495 (1975)). En resumen, como describe Kohler y Milstein, la técnica implicaba aislar linfocitos de ganglios linfáticos de drenaje regionales de cinco pacientes de cáncer separados, con melanoma, teratocarcinoma o cáncer de cuello uterino, glioma o de pulmón (donde las muestras se obtuvieron de especímenes quirúrgicos), agrupar las células, y fusionar las células con SHFP-1. Los Hibridomas se seleccionaron para la producción de anticuerpo que se una a las líneas celulares de cáncer. La confirmación de la especificidad entre los mAb se puede lograr usando técnicas rutinarias de selección (tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, o "ELISA") para determinar el patrón de reacción elemental del mAb de interés.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, por ejemplo anticuerpos de cadena simple (scFv u otros), que pueden producirse/seleccionarse usando tecnologías conocidas de presentación en fagos o presentación en levaduras (es decir, mediante maduración de afinidad del anticuerpo *in vitro*). La capacidad para expresar fragmentos de anticuerpo sobre la superficie de virus que infectan bacterias (bacteriófagos o fagos) hace posible aislar un solo fragmento de unión a anticuerpo, por ejemplo, de una biblioteca de más de 1010 clones sin unión. Para expresar fragmentos de anticuerpo sobre la superficie de fagos (presentación en fagos), se introduce un gen de fragmento de anticuerpo en el gen que codifica una proteína de superficie de fago (por ejemplo, pIII) y la proteína de fusión pIII-fragmento de anticuerpo se presenta sobre la superficie del fago (McCafferty et al. (1990) Nature, 348: 552-554 (1990); Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137 (1991)). La maduración de afinidad de la presentación de levaduras se describe, por ejemplo, en el documento PCT WO 2007/056507.

En un aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación pueden prepararse mediante la expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en células hospedadoras. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula hospedadora se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que llevan moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de tal manera que las cadenas ligera y pesada se expresan en las células hospedadoras y, preferentemente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras, medio del que pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías convencionales de ácido nucleico (ADN) recombinante para obtener genes de cadena ligera y pesada de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989), Ausubel, F. M. et al.

(eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989) y en la patente de Estados Unidos N° 4.816.397.

5 Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen las células CHO (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 (1980), usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, Mol. Biol. 159:601 -621 (1982)), células de mieloma NSO, células COS, células HEK-293, y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, se producen los anticuerpos mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación de proteínas.

15 Las células hospedadoras también pueden usarse para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab') o moléculas scFv. Se entenderá que dentro del alcance de la presente divulgación se incluyen variaciones en los procedimientos anteriores. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifique la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente divulgación. También puede usarse la tecnología de ADN recombinante para eliminar algunas o todas las moléculas del ácido nucleico que codifican cualquiera o tanto la cadena ligera como la cadena pesada, que no son necesarias para la unión a al menos un epítipo en al menos un agente inmunosupresor. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas truncadas de ácido nucleico también se incluyen por los anticuerpos de la divulgación.

#### 25 IV. Procedimientos de pretratamiento de muestra y composiciones de componente de ensayo

La muestra usada en el método es la fuente de un analito que contiene al menos un epítipo de interés. La muestra puede ser una muestra de ensayo de un sujeto o puede no proceder de un sujeto, pero sin embargo comprende el analito que contiene el epítipo de interés (por ejemplo, una muestra predeterminada, o muestra de una fuente biológica distinta de un sujeto, tal como agua). La muestra puede comprender además (aparte del analito de interés) otros componentes que incluyen pero no se limitan a, anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos de interés. Por ejemplo, la muestra puede ser un agente inmunosupresor, tal como tacrolimus o ciclosporina (por ejemplo, una fuente del propio fármaco, tal como una fuente comercial). Como alternativa, la muestra puede ser una muestra de sangre entera obtenida de un sujeto que contiene tacrolimus o ciclosporina. Una muestra preferida de acuerdo a la divulgación es una muestra de ensayo, particularmente sangre entera, especialmente sangre entera que ha sido tratada como se describe en el presente documento, por ejemplo con un reactivo de pretratamiento.

40 Pueden emplearse uno o más reactivos de pretratamiento para ciertos de los análisis de fármaco hidrófobo (por ejemplo, inmunosupresores), pero pueden no ser necesarios para otros. El reactivo de pretratamiento puede ser un agente heterogéneo o un agente homogéneo.

45 Con el uso de uno o más reactivos de pretratamiento heterogéneos de acuerdo con la divulgación, el o los reactivos de pretratamiento precipitan cualquier proteína de unión a analito presente en la muestra. Dicho ensayo comprende eliminar cualquier proteína de unión a analito de la primera mezcla separando el sobrenadante de la primera mezcla de la proteína de unión a analito precipitada. En tal ensayo, el sobrenadante de la primera mezcla carente de cualquier proteína de unión se usa en la siguiente etapa del ensayo, la etapa de captura de anticuerpo.

50 Con el uso de uno o más reactivos de pretratamiento homogéneos no hay esta etapa de separación. La primera mezcla de muestra de ensayo entera y uno o más reactivos de pretratamiento se ponen en contacto con el anticuerpo de captura en la etapa de captura de anticuerpo. Dichos uno o más reactivos de pretratamiento en tal ensayo normalmente se diluyen en la mezcla de muestra de ensayo pretratada, ya sea antes de la etapa de captura de anticuerpo o durante el encuentro con el anticuerpo en la etapa de captura de anticuerpo. A pesar de esta dilución, está todavía presente (o queda) una cierta cantidad de dichos uno o más reactivos de pretratamiento (por ejemplo, metanol 5 M y/o etilenglicol 0,6 M) en la mezcla de muestra de ensayo durante la captura de anticuerpo.

60 Dichos uno o más reactivos de pretratamiento comprenden: (a) uno o más solventes y sal, (b) uno o más solventes, sal y detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal. Los disolventes incluyen metanol y etilenglicol. Las sales incluyen sulfato de cinc y cloruro sódico. Un detergente preferido para un reactivo de pretratamiento es saponina. Un reactivo de pretratamiento preferido comprende aproximadamente un 70% de metanol, aproximadamente un 20% de etilenglicol, y una concentración aproximadamente 50 mM de sulfato de cinc.

65 La composición de reactivos de pretratamiento opcionalmente contiene uno o más disolventes orgánicos y detergentes, así como otros componentes según se necesite para un método de ensayo específico. Por consiguiente, en una realización del inmunoensayo, dichos uno o más reactivos de pretratamiento comprenden saponina, metanol, etilenglicol y sulfato de cinc, como se describe en los Ejemplos y en la bibliografía. También



pueden emplearse los reactivos de pretratamiento de ensayo que contienen uno o más disolventes orgánicos, tales como una combinación de metanol y etilenglicol (y opcionalmente sulfato de cinc). Pueden usarse reactivos de pretratamiento que comprenden saponina, con o sin sal añadida. Además, pueden emplearse reactivos de pretratamiento para su uso en ensayos con analizadores TDx, AxSYM® y ARCHITECT® (especialmente cuando se optimizan para un ensayo dado), por ejemplo, como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Yatscoff et al., Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin Chem, 36:1969-1973 (1990) y Wallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM® Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin Chem 45: 432-435 (1999)), y/o como están disponibles en el mercado (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

En el presente documento se describen métodos preferidos de pretratamiento de muestra (por ejemplo, en los Ejemplos). Adicionalmente, el pretratamiento puede hacerse como se describe en la Patente de Estados Unidos de Abbott 5.135.875, documento EP 0 471 293, Solicitud de Patente de Estados Unidos 60/878.017 presentada el 29 de diciembre de 2006; y Solicitud de Patente de Estados Unidos 11/490624 presentada el 21 de Junio de 2006.

En otra realización, la segunda mezcla comprende un diluyente de ensayo. Preferentemente el diluyente de ensayo es uno que puede usarse sin impactar perniciosamente a las condiciones de reacción de un inmunoensayo de diagnóstico. Preferentemente, el diluyente de ensayo no altera sustancialmente la  $K_D$  del anticuerpo de captura. Opcionalmente, el diluyente de ensayo comprende al menos un tampón, opcionalmente una sal, opcionalmente un detergente, y/o combinaciones de los mismos. Además, el diluyente de ensayo puede ser uno de un ensayo comercializado, por ejemplo, un ensayo para ARCHITECT®, o un ensayo (por ejemplo, un ensayo de CsA) para TDx o AxSYM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), especialmente cuando se optimiza para un ensayo dado.

En otra realización, la cuarta mezcla empleada en el inmunoensayo en el presente documento comprende además un detergente. De manera óptima, el detergente es Triton® X-100.

El inmunoensayo y los métodos descritos en el presente documento también pueden adaptarse para su uso en una diversidad de sistemas automáticos y semiautomáticos (incluyendo aquellos en los que la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.089.424 y 5.006.309, y como, por ejemplo se comercializa por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo pero sin limitación Abbott's ARCHITECT®, AXSYM®, IMx®, PRISM®, e instrumentos Quantum™ II, así como otras plataformas. Además, la divulgación opcionalmente es adaptable para el sistema de inmunoensayo electroquímico (I-STAT®) del Punto de Cuidado comercial de Abbott Laboratories para realizar inmunoensayos de tipo sándwich. Los inmunosensores, y sus métodos de realización y operación en dispositivos de ensayo de un sólo uso se describen, por ejemplo, en la Patente de Estado Unidos N° 5.063.081, Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0170881, Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0018577, Solicitud de Patente de Estados Unidos 2005/0054078, y Solicitud de Patente de Estados Unidos 2006/0160164.

#### V. Kits

La presente divulgación también contempla kits para detectar la presencia de un analito de interés (por ejemplo, fármaco hidrófobo que se metaboliza para formar uno o más metabolitos de reacción cruzada) en una muestra de ensayo. Estos kits pueden comprender uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento. Más específicamente, el kit opcionalmente puede contener (1) al menos un anticuerpo que tiene una  $K_D$  para metabolito de reacción cruzada que es entre 10 veces y 1000 veces mayor que para el analito; y (2) una o más instrucciones para realizar el inmunoensayo. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden incluirse en dicho kit de ensayo como un anticuerpo de captura, como un anticuerpo de detección o como un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección. Como alternativa, puede emplearse un indicador para la detección. En el kit puede incluirse cualquier calibrador apropiado o control (por ejemplo, calibrador de ciclosporina para un ensayo de ciclosporina). Opcionalmente, el kit puede también contener al menos un tubo de recogida de muestras. Opcionalmente, el kit también puede contener al menos un reactivo de pretratamiento.

De este modo, la presente divulgación además proporciona kits para diagnóstico y control de calidad que comprenden un inmunoensayo de acuerdo con la presente divulgación. Opcionalmente, los ensayos, kits y componentes del kit de la divulgación se optimizan para su uso en plataformas comerciales (por ejemplo, inmunoensayos en las plataformas PRISM®, AxSYM® ARCHITECT® y EIA (Bead) de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, así como otros ensayos comerciales y/o ensayos de diagnóstico *in vitro*). Adicionalmente, los ensayos, kits y kit componentes del kit pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de ensayo electroquímicos u otros sistemas de ensayo portátiles o en el punto de atención. La presente divulgación es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico comercial en el punto de atención de Abbott (I-STAT®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que realiza inmunoensayos de tipo sándwich para diversos marcadores cardíacos, incluyendo Tnl, CKMB y BNP. Los inmunosensores y los métodos para operar con ellos en dispositivos de ensayo de un solo uso se describen, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078 y 2006/0160164. En la Patente de Estados Unidos 5.063.081 se encuentran antecedentes adicionales sobre la fabricación de inmunosensores electroquímicos y de otros tipos.

Opcionalmente, los kits incluyen reactivos de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad se conoce bien en la técnica, y se describe, por ejemplo, en una variedad de hojas de inserción de productos de inmunodiagnóstico.

- 5 Los kits pueden incluir opcionalmente otros reactivos requeridos para realizar un ensayo de diagnóstico o facilitar las evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, co-factores enzimáticos, sustratos, reactivos de detección, y similares. Otros componentes, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de ensayo (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), también pueden incluirse en el kit. El kit puede incluir adicionalmente uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit pueden
- 10 liofilizarse y el kit puede además comprender reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados. Como alternativa, los componentes de kit pueden proporcionarse en una forma lista para usar.

- Los diversos componentes del kit opcionalmente se proporcionan en envases adecuados. Como se ha indicado anteriormente, uno o más de los envases puede ser una placa de microtitulación. Preferentemente, sin embargo, los
- 15 kits se proporcionan para su uso en un ensayo comercial automático. El kit además puede incluir envases para guardar o almacenar una muestra (por ejemplo, un envase o cartucho para una muestra de sangre u orina). Cuando procede, el kit puede también contener opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que facilitan la preparación de los reactivos o la muestra de ensayo. El kit también puede incluir uno o más instrumentos para ayudar a obtener la muestra de ensayo, tales como una jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de
- 20 medida, o similares.

El kit puede además incluir opcionalmente instrucciones para su uso, que pueden proporcionarse en forma de papel o de forma legible en un ordenador, tal como un disco, CD, DVD o similar.

- 25 A continuación, a modo de ejemplo, y no como limitación, se proporcionarán ejemplos de la presente divulgación.

#### Ejemplo 1. Investigación de diversos formatos de ensayo

- Este ejemplo compara la reactividad cruzada de metabolitos en un inmunoensayo que combina un extracto de
- 30 sangre CsA con indicador (CsA acridinilada), anticuerpo (anticuerpo anti-CsA) unido a micropartículas magnéticas, y diluyente de ensayo (tampón y cloruro sódico) en diversos formatos, incluyendo un formato de una etapa o de dos etapas, y con o sin una o más etapas de lavado.

- Para los cuatro formatos de ensayo descritos en este ejemplo (es decir, Formatos 1-4), la extracción de CsA de las
- 35 muestras de sangre se realizó mezclando 200 µl de muestra de sangre (con o sin metabolito añadido) con 100 µl de un reactivo de saponina acuoso, seguido de 400 µl de reactivo de metanol/etilenglicol/sulfato de cinc en un tubo de centrifugación de plástico de 1,5 ml. La mezcla se agitó vorticialmente de forma vigorosa durante 5 -10 segundos y la suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar un precipitado. El sobrenadante se sometió a ensayo para CsA en un analizador automático ARCHITECT® i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois).
- 40

Otros materiales y métodos empleados en el presente documento y en ejemplos posteriores fueron como sigue:

- Anticuerpo.** El anticuerpo monoclonal anti-CsA usado en el ensayo ARCHITECT® se inmoviliza sobre
- 45 partículas magnéticas recubiertas de un anticuerpo de cabra anti-ratón (GAM). El mismo anticuerpo anti-CsA se usa en forma soluble en los ensayos Abbott TDx y AxSYM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois). El anticuerpo anti-CsA soluble de ratón se añade directamente a micropartículas GAM y se produce la unión no covalente mediante unión mediada por anticuerpo. El anticuerpo GAM se une pasivamente a micropartículas magnéticas de poliestireno y después se trata con una carbodiimida soluble en agua para fijar el anticuerpo
- 50 sobre la partícula. Las partículas GAM pueden prepararse usando conocimientos habituales en la técnica.

- Indicador.** El indicador CsA-Acridinio usado en el ensayo se basa en la química del acridinio usada en la familia de inmunoensayos ARCHITECT®. El marcador Acridinio se une covalentemente en la misma posición en la molécula de CsA que el marcador Fluoresceína en el indicador TDx y AxSYM® (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Europea 0 283 801 A2, pero difiriendo en que se emplea un marcador de acridinio, no fluoresceína; véase también, Mattingly et al., Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-Carboxamides and their Application in Clinical Assays, Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications (Dyke K.V. Ed., CRC Press, Boca Raton) 2002; pp. 77-105).
- 55

- Diluyente de ensayo.** El diluyente de ensayo para los siguientes estudios es el usado en la familia de inmunoensayos ARCHITECT® (es decir, que contiene tampón MES, NaCl y un conservante).

- Calibradores CsA y controles.** Las CsA usadas en calibradores son de calidad USP adquiridas en la Farmacopea de Estados Unidos (USP, Rockville, MD). Los calibradores se preparan en una matriz de sangre entera humana procesada, de ABT (American Biological Technologies, Inc., Seguin, Texas 78155). La CsA se disuelve en un disolvente orgánico y se añade gravimétricamente a la matriz de sangre. Las concentraciones de
- 60 Calibrador son 0 ng/ml de CsA (Calibrador A, o "CAL A"), 40 ng/ml de CsA (Calibrador B, o "CAL B"), 150 ng/ml de CsA (Calibrador C, o "CAL C"), 400 ng/ml de CsA (Calibrador D, o "CAL D"), 800 ng/ml de CsA (Calibrador E, o "CAL E") y 1500 ng/ml de CsA (Calibrador F, o "CAL F"). Las concentraciones se verifican en comparación
- 65

con patrones primarios que usan CsA altamente purificada. Los controles de la matriz de sangre humana liofilizada se realizaron por BioRad Laboratories, Clinical Diagnostics, 4000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547.

**Especímenes y muestras de capacitación.** Los especímenes sanguíneos de pacientes trasplantados se adquirieron en el Hospital General de Toronto. Los especímenes se codificaron numéricamente y se proporcionaron desligados de la información del paciente, siguiendo los procedimientos de ética del hospital. Los especímenes sanguíneos se almacenaron refrigerados durante más de 1 mes antes de su uso. Las muestras congeladas fueron almacenadas indefinidamente a -20 °C.

Las muestras de capacitación ensayadas previamente usadas por los laboratorios clínicos para fármacos de trasplante se obtuvieron a partir del Profesor David W Holt, Analytical Services International Ltd., 5 Lavender Close, Chaldon Common, CATERHAM, CR3 5DW, UK. Estas muestras eran alícuotas de grupos de especímenes de pacientes congeladas y enriquecidas, sangre sin fármaco, que se suministra congelada trimestralmente a los laboratorios de ensayo. Las concentraciones de CsA medidas mediante diferentes métodos de ensayo son los resultados medios inter-laboratorio presentados en la investigación de capacitación y publicados en Internet en <http://www.bioanalytics.co.uk/html>.

**Concentración de Inmunosupresor.** La concentración de CsA se calcula haciendo uso del sistema de óptica ARCHITECT®, esencialmente un tubo fotomultiplicador (PMT) que realiza el recuento de fotones sobre la luz emitida mediante una reacción quimioluminiscente. La cantidad de luz generada mediante la reacción quimioluminiscente es directamente proporcional a la cantidad de indicador de acridinio presente en la mezcla de reacción, y es indirectamente proporcional a la cantidad de CsA. La señal se mide en URL (Unidades Relativas de Luz), la designación para la unidad de medición óptica en el sistema ARCHITECT®.

La expresión unidades relativas de luz proviene de la relación entre el recuento de fotones y una cierta cantidad de acridinio. Cada módulo de óptica se calibra con un conjunto de patrones de acridinio. Cuando se produce la reacción quimioluminiscente, la luz se emite y se miden los fotones durante un período de tiempo de 3 segundos. El PMT convierte los fotones contados en una señal digital, que se manda después a una tarjeta de circuito para su procesamiento. La tarjeta de circuito óptica convierte la señal digital del PMT en una señal analógica que es proporcional a los fotones contados, que es a su vez proporcional a la cantidad de acridinio presente. Esta señal analógica después se procesa adicionalmente para producir un valor de URL. Esta relación se estableció para producir un patrón para calibrar los módulos de óptica, en los que los diferentes patrones de acridinio tienen valores URL asignados a ellos. De esta manera, mientras la unidad URL es arbitraria en sí misma, es proporcional (es decir, relativa) a cierta cantidad de acridinio.

**% de CV.** El % de Coeficiente de Variación es (CV) se define como la desviación típica de una medida (SD) dividida por la media de la concentración de analito y multiplicado por 100.

**Relaciones B/A y F/A.** B/A y F/A son las relaciones de señales URL proporcionadas por el analizador ARCHITECT® para los calibradores A, B y F.

**% de Reactividad cruzada.** Los resultados de reactividad cruzada se determinaron en base a la concentración de CsA medida en presencia y ausencia de metabolitos de reacción cruzada añadidos. El % de reactividad cruzada fue calculado como sigue:

$$(\text{ng/ml de CsA en una muestra enriquecida} - \text{ng/ml de CsA en Control}) / (\text{ng/ml de metabolito}) \times 100.$$

**Estudios de enriquecimiento de metabolito.** Las muestras de sangre se enriquecieron con 200 ng/ml de CsA y con 0 ("Control") o 1000 ng/ml de metabolito AM1 o AM9 (purificado en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL a partir de mezclas de metabolito generadas *in vivo*).

**Mediciones de  $K_D$ .** Las constantes de unión de CsA para albúmina humana, gamma globulina bovina y anticuerpo anti-CsA se determinaron midiendo la polarización fluorescente del indicador de CsA marcado con fluoresceína en soluciones que contenían diferentes concentraciones de proteína. Se hicieron las mediciones y las  $K_D$  se calcularon mediante métodos descritos en Tetin, S.Y. y Hazlett, T.L., *Optical Spectroscopy in Studies of Antibody-Hapten Interactions*. Methods 20: 341-361 (2000). La albúmina humana purificada y la gamma globulina se adquirieron en Celliance Corporation, Norcross, Georgia 30092 U.S.A. El anticuerpo anti-CsA se purificó en Abbott Laboratories mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, como se describe en Porous 50A Perfusion Chromatography Bulk Media for Proteína A Affinity Chromatography, Operating Instructions. PerSeptive Biosystems. Rev. 2, 1994. páginas 1-7.

**Métodos de ensayo FPIA.** Los inmunoensayos Abbott TDx Monoclonal y AxSYM® se midieron sobre especímenes y calibradores usando procedimientos descritos en los prospectos. Los especímenes se extrajeron con una combinación de saponina, disolvente orgánico y sulfato de cinc y se centrifugó la proteína precipitada. El sobrenadante transparente se ensayó usando reactivos de ensayo (indicador, anticuerpo y diluyente de ensayo). Sin embargo, en el Ejemplo 4, se emplearon los métodos de extracción diferentes (pretratamiento) de TDx y AxSYM®, pero todos los resultados se generaron en ARCHITECT®.

**Otros reactivos ARCHITECT®.** El tampón de lavado ARCHITECT®, las soluciones estimulantes y preestimulantes que se usan para los experimentos descritos son convencionales para los ensayos realizados en este instrumento.

Los cuatro formatos de ensayo ensayados (Formato 1, Formato 2, Formato 3, y Formato 4) se describen a continuación.

Formato 1 - Adición de indicador inmediata en un formato de ensayo de 1 etapa

Este formato combina un extracto de sangre con CsA con indicador y reactivos de anticuerpo en una primera etapa, seguida de la adición de diluyente y una etapa de lavado. El formato de ensayo 1 se realizó en un analizador automático ARCHITECT® i2000 mediante:

1. Mezcla de 15 µl de extracto de muestra con 90 µl de un Indicador y 50 µl de micropartículas cubiertas con anticuerpo de cabra anti-ratón (de Sigma, St Louis, Missouri) y anticuerpo de ratón anti-CsA (usando anticuerpo purificado para uso en inmunoensayos de polarización de fluorescencia en instrumentos TDx y AxSYM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).
2. Incubación de la mezcla de reacción durante 18 minutos a 33-38 grados C para permitir que se produzca la competición entre CsA, un metabolito de CsA e indicador de Acridinio-CsA para los sitios de unión de CsA en el anticuerpo.
3. Mezcla de 50 µl de un diluyente de ensayo con la mezcla de reacción micropartícula/indicador/muestra e incubación durante 4 minutos adicionales a 33-38 grados C.
4. Separación de las micropartículas magnéticamente de la mezcla de reacción y lavado de las mismas con el tampón de lavado ARCHITECT® para eliminar el indicador y otros reactivos líquidos.
5. Adición de preestimulante (solución ácida) y estimulante (solución básica) para provocar la captura del marcador acridinio-CsA para que emita luz, que se mide mediante los instrumentos como URL.
6. Comparación de la señal en URL de muestra desconocida con las URL generadas durante un ensayo de calibración que funciona usando patrones de CsA.
7. Cálculo de una concentración de CsA para la muestra desconocida usando procedimientos matemáticos ARCHITECT®.

Formato 2 - Adición de indicador inmediata en un formato de 2 etapas

Este formato combina un extracto de sangre con CsA con indicador y reactivos de anticuerpo en una primera etapa, seguida de una etapa de lavado. Esto va seguido de una etapa de incubación con diluyente de ensayo y una segunda etapa de lavado. El formato de ensayo 2 se realizó en un analizador automático ARCHITECT® i2000 mediante:

1. Mezcla de 75 µl de extracto de muestra con 90 µl de un Indicador y 50 µl de las micropartículas descritas anteriormente para el formato 1.
2. Incubación de la mezcla de reacción durante 18 minutos a 33-38 grados C para permitir que ocurra la competición entre CsA, un metabolito de CsA e indicador de Acridinio-CsA por los sitios de unión de CsA en el anticuerpo.
3. Separación de las micropartículas magnéticamente de la mezcla de reacción y lavado de las mismas con tampón de lavado ARCHITECT® para eliminar indicador y reactivos.
4. Resuspensión de las partículas lavadas en 50 µl de un diluyente de ensayo e incubación durante 4 minutos más a 33-38 grados C.
5. Separación de las micropartículas magnéticamente de la mezcla de reacción y lavado de las mismas de nuevo con tampón de lavado ARCHITECT® para eliminar los reactivos líquidos.
6. Comparación de la señal en URL medida de la muestra y patrones y determinar la concentración de CsA como se ha descrito para el formato 1.

Formato 3 - Adición de indicador retrasada en un formato de ensayo de 1 etapa

Este formato es como para el formato 1 con la excepción de que el indicador y el diluyente de ensayo se intercambian. De esta manera, se añaden 90 µl de diluyente de ensayo en la incubación inicial (etapa 1) y se añaden 50 µl de indicador en la segunda incubación (etapa 3). Este ensayo emplea una sola etapa de lavado como en el formato 1. El formato de ensayo 3 se realizó en un analizador automático ARCHITECT® i2000.

Formato 4 - Adición de indicador retrasada en un formato de ensayo de 2 etapas

Este formato es como el formato 2, con la excepción de que el indicador y el disolvente de ensayo se intercambian. De esta manera, se añaden 90 µl de diluyente de ensayo en la incubación inicial (etapa 1) y se añaden 50 µl de indicador en la segunda incubación (etapa 3). Este ensayo emplea dos etapas de lavado separadas. El formato de ensayo 4 se realizó en un analizador automático ARCHITECT® i2000.

Los diversos formatos de ensayo se resumen en la Tabla 1 en términos de concentraciones de Indicador, metabolito y sitios de unión de anticuerpo. La concentración de sitios de unión es el doble que la concentración de anticuerpo porque hay dos sitios de unión de anticuerpo. Puesto que las muestras extraídas contienen detergente saponina (Desert King, Lexington, KY) y el indicador contiene Triton® X-100 ("TX100" de Sigma, St Louis, MO) reducido químicamente, la presencia o ausencia de estos detergentes también está registrada en la Tabla 1. Los detergentes son responsables de solubilizar compuestos hidrófobos tales como CsA, metabolito e indicador. Estos pueden

también jugar un papel importante en el control de las cantidades de estos componentes que están libres en solución frente a los secuestrados en el detergente. La saponina está presente en concentraciones de 80-300 µM y el TX100 está en el intervalo de 140-1900 µM. Estas dos concentraciones están muy por encima de las concentraciones micelares críticas para los detergentes, por lo que se espera que la saponina y TX100 estén presentes en forma de micelas.

5

Tabla 1

		1ª incubación	2ª incubación	1ª incubación	2ª incubación
	Tipo de ensayo	<u>Formato 1</u> Una Etapa		<u>Formato 2</u> Dos Etapas	
Indicador	Anticuerpo, nM	0,32	0,24	0,23	1,0
Adición	Metabolito, nM	23	17	83	<1,0
Primera	Indicador, nM	0,29	0,22	0,21	<0,2
Incubación	Saponina	Presente	Presente	Presente	Ausente
Etapas	Triton® X-100	Presente	Presente	Presente	Ausente
	Tipo de ensayo	<u>Formato 3</u> Una Etapa		<u>Formato 4</u> Dos Etapas	
Indicador	Anticuerpo, nM	0,32	0,24	0,23	1,0
Adición	Metabolito, nM	23	17	83	<1,0
Retrasada	Indicador, nM	Ninguno	0,12	Ninguno	0,50
hasta 2º	Saponina	Presente	Presente	Presente	Ausente
Incubación	Triton® X-100	Ausente	Presente	Ausente	Presente

10 Los valores de reactividad cruzada observados con los diversos formatos de ensayo se resumen en la Tabla 2. Estos resultados confirman la reactividad cruzada reducida observada con el uso del formato de ensayo 4.

Tabla 2

	<u>Formato 1</u> Una etapa		<u>Formato 2</u> Dos etapas	
Reactividad cruzada	AM1	8%	AM 1	8%
	AM 9	22%	AM 9	17%
	<u>Formato 3</u> Una etapa		<u>Formato 4</u> Dos etapas	
Reactividad cruzada	AM1	45%	AM1	<1%
	AM9	88%	AM9	<1%

15

**Ejemplo 2. El efecto de los detergentes en el reactivo indicador ARCHITECT®**

Este ejemplo muestra que el detergente elegido para bloquear el indicador afecta tanto a la forma de la curva como a la precisión del ensayo.

20

El ensayo se realizó como en el ejemplo 1, formato 4 (Adición de indicador retrasada en un formato de ensayo de 2 etapas), usando un indicador que contiene diferentes detergentes a una concentración del 0,05%. Los detergentes se adquirieron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

25

Los resultados de estos experimentos se representan en la Tabla 3, que resume la señal en URL, la forma de la curva (relaciones B/A y F/A en URL), y la media de la precisión de la concentración del calibrador (coeficiente de variación, "CV"), expresado como un %CV. Las relaciones B/A bajas se correlacionan con la mejor sensibilidad del ensayo. Las relaciones F/A altas se correlacionan con altas uniones no específicas con indicador (NSB) a la superficie del recipiente de reacción de plástico y a micropartículas de poliestireno. Es razonable asumir que bajos

NSB serán favorables para la precisión del ensayo, mejorando la relación señal-ruido.

Tabla 3

	ng/ml de CsA	Triton® X-100	Triton® X-114	Igepal CA520	Triton® SP-135	Tetronic 1107	Brij 700
CAL A	0	736.795	637.497	688.088	480.075	694.375	351.879
CAL B	40	440.071	415.282	476.408	340.997	519.584	268.978
CAL C	150	251.156	257.303	321.951	210.246	401.285	216.236
CAL D	400	145.546	149.332	215.980	129.438	296.499	173.188
CAL E	800	96.478	105.218	148.882	95.797	238.658	150.633
CAL F	1500	70.707	74.121	106.614	78.521	203.810	137.096
	% CV	5,7	7,7	6,5	9,8	12,6	29,6
	B/A	0,60	0,65	0,69	0,71	0,75	0,76
	F/A	0,10	0,12	0,15	0,16	0,29	0,39

5 Como puede verse en la Tabla 3, los detergentes están enumerados en orden creciente de relaciones B/A y F/A (indicativo del incremento de NSB). Hay una clara tendencia de imprecisión según aumentan estas relaciones. Además, dos de los detergentes, Triton® SP-135 y Brij 700, causan una reducción significativa en la señal de ensayo Cal A. Tetronic 1107 y Brij 700 tuvieron la mayor relación F/A. Se observó que una cantidad menor de Triton® X 100 proporcionaba la mejor precisión y la menor relación B/A y F/A. Por consiguiente, todos los experimentos realizados en los siguientes ejemplos usaron como detergente indicador TX100.

### Ejemplo 3. El efecto de Triton® X-100 reducido sobre la realización del ensayo

15 Este ejemplo demuestra cómo la concentración de detergente afecta al rendimiento, usando el detergente preferido (TX100). Los ensayos se realizaron como en el ejemplo 1, formato 4 (Adición de indicador retrasada en un formato de ensayo de 2 etapas). Los datos muestran un fuerte efecto sobre la señal en URL y la precisión y se representan en la Tabla 4, y gráficamente en las figuras 5 y 6.

20

Tabla 4

	ng/ml CsA	0,01%	0,02%	0,04%	0,08%	0,12%	0,15%	0,20%	0,30%
CAL A	0	1.258.564	1.094.498	930.200	816.422	707.907	599.404	542.550	445.513
CAL B	40	845.584	686.082	572.351	509.191	425.507	372.974	365.371	314.560
CAL C	150	596.919	432.876	339.755	315.198	256.571	231.313	226.640	222.492
CAL D	400	430.981	286.878	210.908	189.764	160.982	159.249	156.030	145.701
CAL E	800	368.695	217.101	151.063	129.044	103.839	107.922	103.559	100.450
CAL F	1500	322.522	172.874	117.797	91.954	73.614	72.903	70.136	66.961
	% de CV	13,6	6,5	7,5	4,4	4,4	5,2	5,1	5,2
	B/A	0,67	0,63	0,62	0,62	0,60	0,62	0,67	0,71
	F/A	0,26	0,16	0,13	0,11	0,10	0,12	0,13	0,15

25 Como puede verse en la Tabla 4, TX 100 reduce la señal en URL y el %CV del ensayo espectacularmente en el intervalo del 0,01% al 12%. A intervalos mayores el efecto se nivela (véanse las figuras 5 y 6). Por consiguiente, todos los experimentos realizados en los siguientes ejemplos usaron una concentración de TX100 del 0,12%.

### Ejemplo 4. El efecto de diferentes composiciones de detergente en la etapa de extracción

30 Este ejemplo ilustra que las modificaciones en el detergente presente en la etapa de pretratamiento de sangre entera (denominada extracción, produciendo el extracto de sangre) pueden tener efectos marcados sobre la forma

de la curva de calibración.

Para estos experimentos se emplearon tres procedimientos de pretratamiento diferentes basados en las etapas de pretratamiento de sangre usadas en ensayos para tres instrumentos diferentes de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL): (1) el ARCHITECT® ("ARCH") como se ha descrito anteriormente; (2) el TDx ("TDx"), un sistema que usa inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) para medir concentraciones de fármaco en suero en un paciente; y (3) AxSYM® o AxSYM® Plus (colectivamente referido como "AXS"), que tiene tres tecnologías analíticas separadas para procesar inmunoensayos, es decir, inmunoensayo de enzimas en micropartículas, FPIA, e inmunoensayo de captura iónica.

La composición de componentes antes y después de la extracción usando los tres procedimientos de pretratamiento se muestran a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Pretratamiento de muestra	Composición de reactivo y muestra			Composición de muestra extraída		
	TDx	ARCH	AXS	TDx	ARCH	AXS
<b>Relaciones de volumen</b>						
(B/S/P)	150/50/300	200/100/400	150/50/300)	NQ <sup>1</sup>	NQ <sup>1</sup>	NQ <sup>1</sup>
<b>Muestra de sangre</b>						
Cal F, ng/ml	1500	1500	800	450	429	240
% de CsA	100%	100%	100%	30%	29%	30%
<b>Solubilización</b>						
% de saponina	2,0	1,0	0,2	0,20	0,14	0,02
% de tergitol	1,9	Ninguno	0,2	0,19	Ninguno	0,02
<b>Precipitación</b>						
% de Metanol	50	70	90	30	40	54
% de Etilenglicol	30	20	10	18	11	6
<b>Pretratamiento de muestra</b>	Composición de reactivo y muestra			Composición de muestra extraída		
	TDx	ARCH	AXS	TDx	ARCH	AXS
mm de sulfato de cinc	60	50	60	36	29	36
<sup>1</sup> La designación "NQ" indica que esto no se cuantificó.						

Los tres métodos de pretratamiento son bastante similares en composición, pero varían en el % de metanol y etilenglicol en la muestra extraída. En la tabla 5, el metanol aumenta en el paso de TDx a ARCHITECT® a AxSYM®, pero el polietilenglicol disminuye. Además, los reactivos de solubilización de TDx y AxSYM® contienen Tergitol, que no está presente en la etapa de pretratamiento de ARCHITECT®.

Estos tres métodos de extracción se usaron independientemente sobre tres series de calibradores de CsA, y los extractos resultantes se ejecutaron todos en el analizador ARCHITECT®. El efecto del reactivo de pretratamiento sobre CsA ARCHITECT® se evaluó en términos de señales en URL, relaciones de curvas y el %CV medio, mostrándose los resultados a continuación en la Tabla 6 y representándose gráficamente en la figura 7.

Tabla 6

<u>CsA ng/ml</u>	<u>URL</u>		
	TDx	ARCH	AXS
0	908.888	913.203	871.849
40	858.303	588.619	742.037
150	759.988	349.284	600.800
400	650.811	211.024	469.253
800	566.833	142.161	418.226
1,500	497.804	103.395	309.611
<b>%CV</b>	5,4	4,3	7,8
<b>B/A</b>	0,94	0,64	0,85
<b>F/A</b>	0,55	0,11	0,36

5 Como puede verse en la figura 7, la curva con peor forma de curva es la que resulta de la condición de pretratamiento de TDx, siendo la condición de pretratamiento de AxSYM® intermedia entre la de TDx y ARCHITECT®. Esta progresión no se correlaciona con el disolvente orgánico o la concentración de saponina, ni con la cantidad de CsA transferida a la reacción, que es del 29% al 30% de la CsA en sangre total (véase Tabla 5). Sin embargo, esta observación se correlaciona con la cantidad de Tergitol presente en el reactivo de solubilización empleado en la etapa de pretratamiento. Parece poco probable que el Tergitol aumente NSB y eleve la señal en URL del calibrador de CsA (en este caso Calibrador F que tiene 1500 ng/ml de CsA), ya que la precisión no cambia tan drásticamente como en los ejemplos de otros detergentes en la tabla 3. El Tergitol no debería tener efectos sobre la etapa de incubación del indicador, ya que tanto la saponina como el Tergitol se eliminan mediante la etapa de lavado antes de añadir el reactivo Indicador-TX1 00.

10 Una última posibilidad parece más probable, es decir, que el Tergitol no se una específicamente a CsA con más fuerza que la saponina. Como CsA es una molécula altamente insoluble en agua, es razonable proponer que sería preferentemente secuestrada en el interior hidrófobo de las micelas de detergente en lugar de en la masa de disolvente acuoso. Además, como el anticuerpo está en equilibrio con la CsA libre, no con la CsA total en la etapa de unión, el % de CsA total unida al anticuerpo en equilibrio se reducirá si el equilibrio de unión con el detergente disminuye la CsA libre. Esto no será un problema cuantitativo si el indicador y la CsA están presentes juntos y se unen en una proporción similar al detergente. Ésta es la situación descrita en tres de los formatos de ensayo indicados en la Tabla 1, particularmente formatos de ensayo 1-3. Por el contrario, en el cuarto ejemplo (es decir, formato de ensayo 4 que tiene una baja reactividad cruzada de metabolito), las etapas de unión a CsA e indicador se producen en entornos de detergente muy diferentes.

#### 25 **Ejemplo 5. Repetición del cambio de la forma de la curva usando otro detergente**

Este ejemplo ilustra que el efecto del Tergitol no es específico de detergente ni está relacionado con la extracción diferencial de sangre.

30 En este ejemplo, la extracción se realizó sólo con detergente saponina. Se añadió Triton® X-100 al diluyente de ensayo, para introducir TX100 durante la primera etapa de unión a anticuerpo, pero no durante la extracción. Se compararon las curvas de calibración con y sin un 0,05% de TX100 en el reactivo diluyente de ensayo. Los resultados de los estudios se muestran en la figura 8.

35 Como puede verse en la figura 8, la adición de TX100 desplazó la curva de calibración hacia arriba sin cambiar significativamente la precisión (es decir, el CV sin TX100 fue del 5,4%, mientras que con TX100 fue del 6,8%). Esta observación es consistente con la unión adicional de CsA por TX100, que se produce durante la primera incubación del ensayo, reduciendo de esta forma la cantidad de CsA libre disponible para unirse al anticuerpo. Los hallazgos confirman que esto no está relacionado con la etapa de extracción, que se realizó únicamente con saponina.

#### 40 **Ejemplo 6. Fundamento para conseguir baja reactividad cruzada de metabolito**

Este ejemplo demuestra las concentraciones relativas de componentes de ensayo y estima algunos de los equilibrios de unión que determinan la reactividad cruzada.



En la tabla 7 proporcionada a continuación se expone una lista de principios activos en la primera y segunda etapas del ensayo de baja reactividad cruzada.

Tabla 7

5

	<u>Primera etapa</u>	<u>Segunda etapa</u>
Volumen de reacción	215 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Componente	Concentraciones	
Metanol	14%	Ninguno
Saponina	3 mM	Ninguno
Sitios de unión de mAb	0,2 nM	1 nM
200 ng/ml de CsA	17 nM	~0,5 nM
1000 ng/ml de metabolito	83 nM	~2,5 nM
Indicador CsA-Acr	Ninguno	0,5 nM
TX-100	Ninguno	2 mM
Relación Detergente/CsA	~200.000	~2.000.000
Relación Anticuerpo/CsA	0,01	~2

Puede verse en la tabla 7 que existe un enorme exceso de detergente con respecto a la CsA en ambas etapas. Esto podría permitir que las micelas de detergente secuestraran pequeñas moléculas hidrófobas (CsA, metabolito, indicador) y las mantuvieran en solución durante la unión a anticuerpo y las reacciones de competición. En la primera etapa, únicamente aproximadamente un 1% de la CsA puede unirse mediante la pequeña cantidad de anticuerpo presente. Esto sugiere que el anticuerpo está en equilibrio con la pequeña fracción de CsA que no está unida al detergente, y que aproximadamente un 99% de la CsA se elimina en la primera etapa de lavado. Esto permite que participe en la etapa de competición con indicador una cantidad mucho menor de CsA. Esta concentración baja de CsA está ahora cerca de su constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) con anticuerpo. La  $K_D$  no se ha medido directamente, pero se ha estimado que es de aproximadamente 0,5 nM midiendo la unión al indicador CsA-Fluoresceína. Para estos experimentos se asume que la  $K_D$  del indicador está dentro de un orden de magnitud de la  $K_D$  de CsA. La  $K_D$  para el metabolito no se conoce exactamente, pero como el % de reactividad cruzada del metabolito calculado está únicamente en el intervalo de aproximadamente un 7-20%, la  $K_D$  de metabolito debe ser mayor en órdenes de magnitud. Sin conocer todas las constantes de unión para CsA, metabolito, e indicador a sus compañeros de unión, no es posible llegar a soluciones exactas para los equilibrios de unión, pero se pueden hacer estimaciones. Estas estimaciones se exponen en la tabla 8.

10

15

20

Tabla 8

Primera etapa de incubación	Conc.	$K_D$	% de unión
Metabolito	83 nM	750 nM	10%
Ciclosporina	17 nM	0,5 nM	97%
Relación	5	1500	~10%
Segunda etapa de incubación	Conc.	$K_D$	% de unión
Metabolito	2,5 nM	500 nM	0,3%
CsA	0,5 nM	0,5 nM	50%
Relación	5	1500	0,6%

25

30

Para los estudios en este ejemplo, se ha asumido que la concentración de metabolito es 1000 ng/ml, una concentración 5 veces mayor con respecto a la CsA. También se ha asumido que la  $K_D$  para el metabolito es 1500 veces mayor que la  $K_D$  para la CsA. El cálculo del % de unión en la tabla 8 representa la fracción de metabolito o CsA que se uniría en condiciones de equilibrio con un exceso de anticuerpo. En la situación de ensayo, el anticuerpo es, por supuesto, mucho menor, y la unión relativa del metabolito y la CsA pueden estimarse únicamente como la relación de números de % de unión. Debido a las grandes diferencias en  $K_D$  y las concentraciones de CsA y metabolito en la primera y segunda etapas, la unión relativa de metabolito/CsA se reduce de aproximadamente un

10% a menos de un 1%. Si se midiera esta unión diferencial mediante competición con un indicador marcado, se debería ver una gran diferencia en la reactividad cruzada del metabolito. De hecho, la competición de indicador en tres de los cuatro ejemplos de formatos de ensayo descritos en la tabla 1 (es decir, formatos 1-3) tiene lugar en condiciones de alta concentración de CsA y metabolito con respecto al indicador y anticuerpo. Estos tres formatos de ensayo también muestran reactividad cruzada de metabolito significativa, dependiendo de qué componentes de ensayo se añadan, y en qué orden. El único formato de ensayo en el que la reacción del indicador tiene lugar a bajas concentraciones de CsA, metabolito y anticuerpo es el que tiene reactividad cruzada baja (es decir, formato 4). Este y los ejemplos precedentes proporcionan de esta manera una justificación para explicar la baja reactividad cruzada del formato de ensayo 4.

#### 10 **Ejemplo 7. Comparaciones de reactividad cruzada**

Este ejemplo demuestra una comparación de reactividad cruzada del inmunoensayo ARCHITECT® de CsA expuesta en el presente documento con otros ensayos comerciales.

En presencia de 300 ng/ml de precursor de CsA, las reactividades cruzadas para AM1 (a 1000 ng/ml) fueron un 7% para AxSYM®, un 4% para CEDIA, y esencialmente ninguna para EMIT. Las reactividades cruzadas para AM9 (500 ng/ml) fueron un 12,6% para AxSYM®, un 25% para CEDIA, y un 6% para EMIT. La comparación con HPLC mostró en receptores de corazón y riñón una sobreestimación media con el EMIT y el CEDIA de ~ 22%, y una sobreestimación con AxSYM® de un 32%. En receptores de hígado, el grupo de pacientes más desafiantes, el CEDIA y los ensayos de AxSYM® CsA mostraron una sobreestimación media de un 43% y un 47%, respectivamente, y el EMIT difirió en un 31% comparado con HPLC (véase, Schutz et al., Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM®, CEDIA, and EMIT): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. Clinical Chemistry 44:2158-2164 (1998)).

Se midió la reactividad cruzada de Dade RxLFlex en presencia de 200 ng/ml de ciclosporina y se descubrió que era del 2-5% para AM1 (1000 ng/ml), del 2% para AM9 (1000 ng/ml), del 3-6% para AM4n (1000 ng/ml), del 2-3% para AM19 (1000 ng/ml), y del 1-2% para AM1c (1000 ng/ml).

Se midió la reactividad cruzada de Abbott ARCHITECT® en presencia de 200 ng/ml de ciclosporina y se descubrió que era del ~0,23% para AM1 (1000 ng/ml), del 0,28% para AM9 (1000 ng/ml), del 0,26% para AM4n (1000 ng/ml), del ~0,43% para AM19 (1000 ng/ml), y del 0,41 % para AM1c (1000 ng/ml).

Se midió la reactividad cruzada de Abbott TDx en presencia de 200 ng/ml de ciclosporina y se descubrió que era del 6,7% para 500 ng/ml de AM1, del 19,4% para 250 ng/ml de AM9, y no significativa estadísticamente para 250 ng/ml de AM4n, para 250 ng/ml de AM19, y para 250 ng/ml de AM1c.

Se midió la reactividad cruzada de Abbott AxSYM® en presencia de 200 ng/ml de ciclosporina y se descubrió que era del 6,9% para 500 ng/ml de AM1, del 10,8% para 250 ng/ml de AM9, y no significativa estadísticamente para 250 ng/ml de AM4n, para 250 ng/ml de AM19, y para 250 ng/ml de AM1c.

Se evaluó la reactividad cruzada de EMIT con los cuatro metabolitos principales de CsA en presencia de 200 ng/ml de CsA. De estos metabolitos, únicamente el M1 (AM9) mostró reactividad cruzada significativa al 7%.

#### 45 **Ejemplo 8. Comparaciones de especificidad**

Este ejemplo demuestra una comparación de especificidad del inmunoensayo ARCHITECT® de CsA expuesto en el presente documento con otros ensayos comerciales.

La especificidad de inmunoensayos monoclonales para CsA se trató en el pasado principalmente mediante comparación directa con HPLC o mediante la medición de metabolitos purificados. El inmunoensayo ARCHITECT® de CsA descrito en el presente documento se ha diseñado para proporcionar baja reactividad cruzada a los metabolitos de CsA AM1 y AM9. La baja reactividad cruzada se confirmó usando los grupos de pacientes de trasplante de los ensayos de capacitación del Dr. Holt y resultados predeterminados frente a HPLC

El ensayo ARCHITECT® de CsA mostró un sesgo <10% frente a los resultados de HPLC, mientras que el ensayo TDx de CsA mostró un sesgo positivo del 34,23% frente a los resultados de HPLC, y el ensayo AxSYM® de CsA mostró un sesgo positivo del 17,77% frente a HPLC. Esto parece ser debido al hecho de que los ensayos TDx y AxSYM® de CsA reaccionan de forma cruzada con AM1 y AM9 y muestran sesgos de concentración positivos variables principalmente en la región de CsA (<500 ng/ml) mientras que el ensayo ARCHITECT® de CsA muestra <1% de reactividad cruzada para todos los metabolitos de Ciclosporina.

El análisis de estos tres ensayos usando los grupos de pacientes de los ensayos de capacitación predeterminados del Dr. Holt frente a HPLC, mostró que los tres ensayos (ARCHITECT®, TDx, y AxSYM®) estaban en un +/-5% de sesgo debido al hecho de que las muestras predeterminadas no tenían ningún metabolito de Ciclosporina.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente divulgación está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma.

## REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para evaluar la cantidad de un analito de interés en una muestra de ensayo, en el que el analito es un fármaco hidrófobo que se metaboliza para formar uno o más metabolitos de reacción cruzada, comprendiendo el inmunoensayo las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con uno o más reactivos de pretratamiento para formar una primera mezcla, en la que dichos uno o más reactivos de pretratamiento lisan cualquiera de las células y solubilizan cualquier analito presente en la muestra de ensayo;
- (b) poner en contacto la primera mezcla con un anticuerpo específico para el analito para formar una segunda mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con analito o metabolito;
- (c) lavar la segunda mezcla para retirar cualquier analito y cualquier metabolito que no haya formado complejo con el anticuerpo y para formar una tercera mezcla en la que la concentración de analito disminuye dentro de un orden de magnitud, es decir, un punto decimal de la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) del anticuerpo para el analito;
- (d) poner en contacto la tercera muestra con un compañero de unión específico del anticuerpo marcado con un marcador detectable ("indicador") para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con el indicador ("complejo anticuerpo-indicador");
- (e) lavar la cuarta mezcla para retirar cualquier indicador que no haya formado complejo con el anticuerpo; y
- (f) detectar el complejo anticuerpo-indicador como una medida de la cantidad de analito presente en la muestra, en el que el inmunoensayo tiene menos de un 10% de reactividad cruzada con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra.
2. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el inmunoensayo tiene menos de un 5% de reactividad cruzada con uno cualquiera o más metabolitos de reacción cruzada presentes en la muestra.
3. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo específico para el analito se inmoviliza en una fase sólida.
4. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más de los reactivos de pretratamiento precipita en la etapa (a) cualquier proteína de unión a analito presente en la muestra.
5. El inmunoensayo de la reivindicación 4, que además comprende retirar cualquier proteína de unión a analito de la primera mezcla.
6. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que la cantidad de anticuerpo en la etapa (b) está entre el 0,1 % y el 10% de la cantidad de analito en la muestra de ensayo.
7. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que las concentraciones de analito y metabolito disminuyen en la tercera mezcla en la etapa (c) de 10 veces a 500 veces comparado con la muestra de ensayo.
8. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que en la etapa (d) la cantidad de analito presente en un complejo con anticuerpo varía de 1,0 a 10,0 nM, y el indicador está presente en una cantidad de entre 0,1 y 1,0 nM.
9. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo es sangre entera.
10. El inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el fármaco hidrófobo es un inmunosupresor seleccionado entre el grupo que consiste en tacrolimus, sirolimus y ciclosporina.
11. El inmunoensayo de la reivindicación 10, en el que
- (a) el inmunosupresor es tacrolimus y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en M-I, M-II, M-III y combinaciones de los mismos;
- (b) el inmunosupresor es ciclosporina y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en M1, M8, M9, M13, M17, M18, M21 y combinaciones de los mismos; o
- (c) el inmunosupresor es sirolimus y el metabolito se selecciona entre el grupo que consiste en 11-hidroxi-sirolimus, 41-O-desmetil-sirolimus, 7-O-desmetil-sirolimus, 41-O-desmetil-hidroxi-sirolimus y combinaciones de los mismos.
12. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichos uno o más reactivos de pretratamiento comprenden saponina, metanol, etilenglicol, y sulfato de cinc.
13. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la segunda mezcla además comprende un diluyente de ensayo.

14. El inmunoensayo de la reivindicación 13, en el que el diluyente de ensayo además comprende un tampón, sal, detergente, disolvente o combinaciones de los mismos.
- 5 15. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cuarta mezcla en la etapa (d) además comprende un detergente.
16. El inmunoensayo de la reivindicación 15, en el que el detergente es Triton® X-100 reducido.
- 10 17. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el analito es ciclosporina y el indicador comprende ciclosporina marcada con acridinio.
18. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo en la etapa (b) tiene una  $K_D$  para el metabolito de reacción cruzada que es entre 10 veces y 1000 veces mayor que para el analito.
- 15 19. El inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende:
- (i) incubar la primera mezcla en la etapa (a) durante un primer período de incubación;
  - (ii) incubar la segunda muestra en la etapa (b) durante un segundo período de incubación; y
  - (iii) incubar la cuarta mezcla de la etapa (d) durante un tercer período de incubación.
- 20 20. El inmunoensayo de la reivindicación 19, en el que:
- (i) el primer período de incubación comprende un período de 2 minutos a 60 minutos; o
  - (ii) el segundo período de incubación comprende un período de 2 minutos a 30 minutos; o
  - (iii) el tercer período de incubación comprende un período de 2 minutos a 30 minutos.
- 25

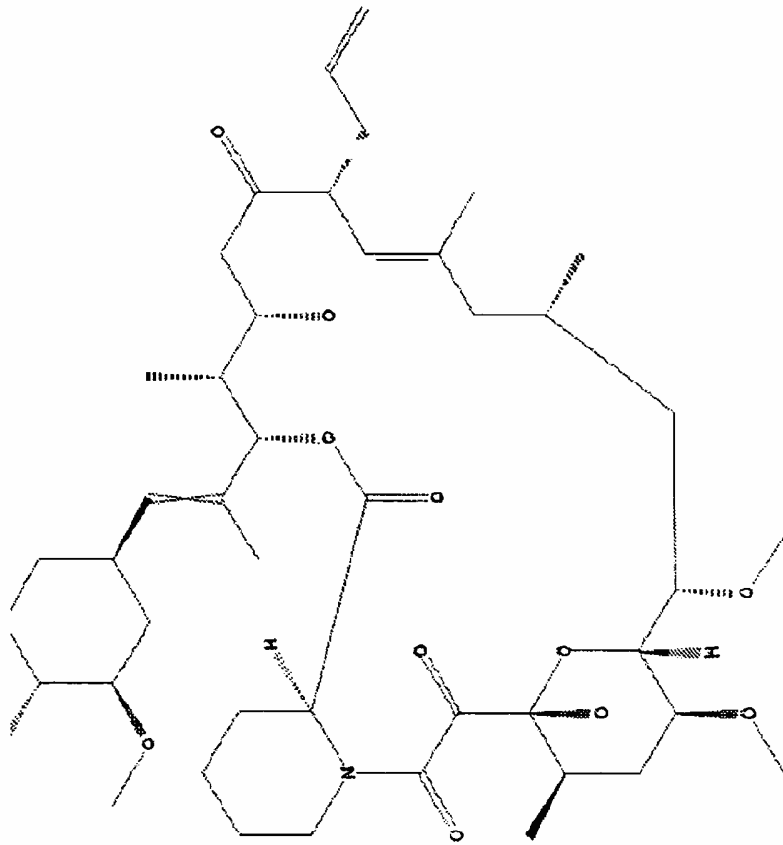


FIGURA 1

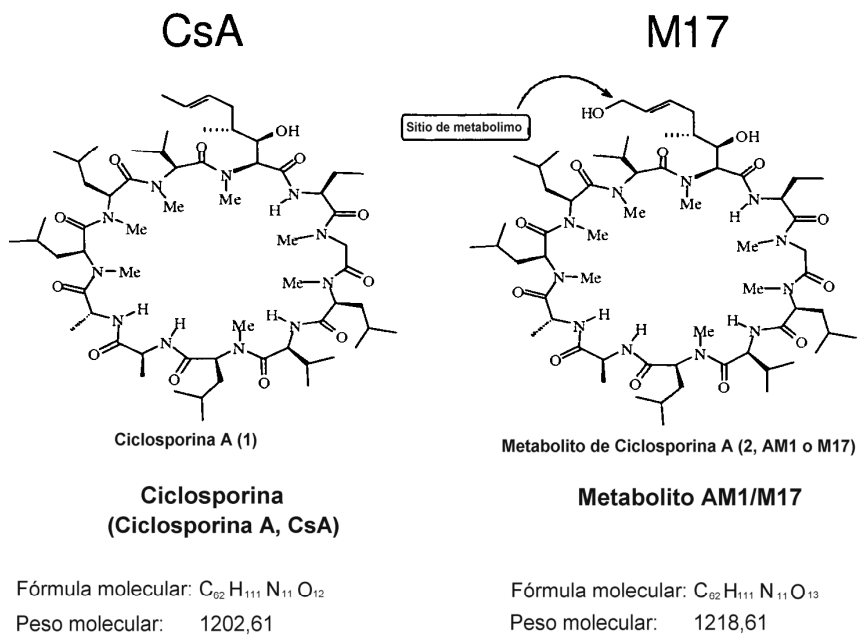


FIGURA 2

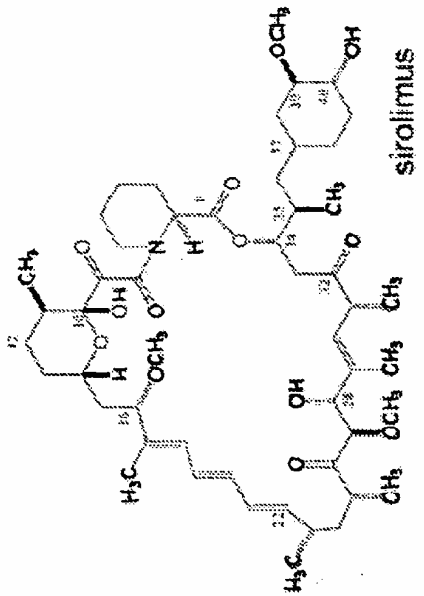


FIGURA 3A

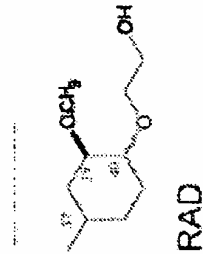


FIGURA 3B



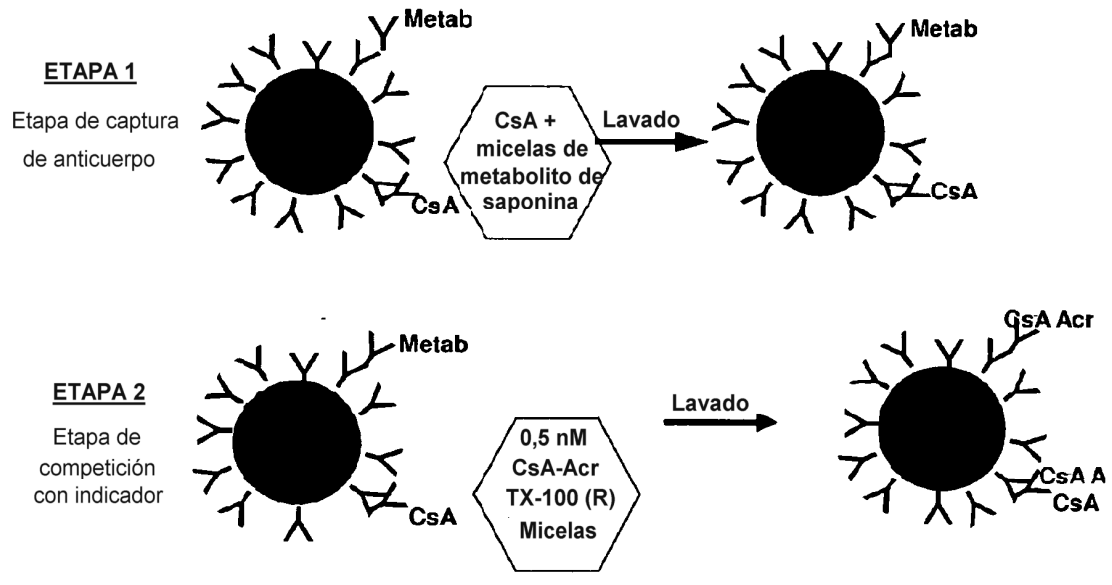


FIGURA 4A

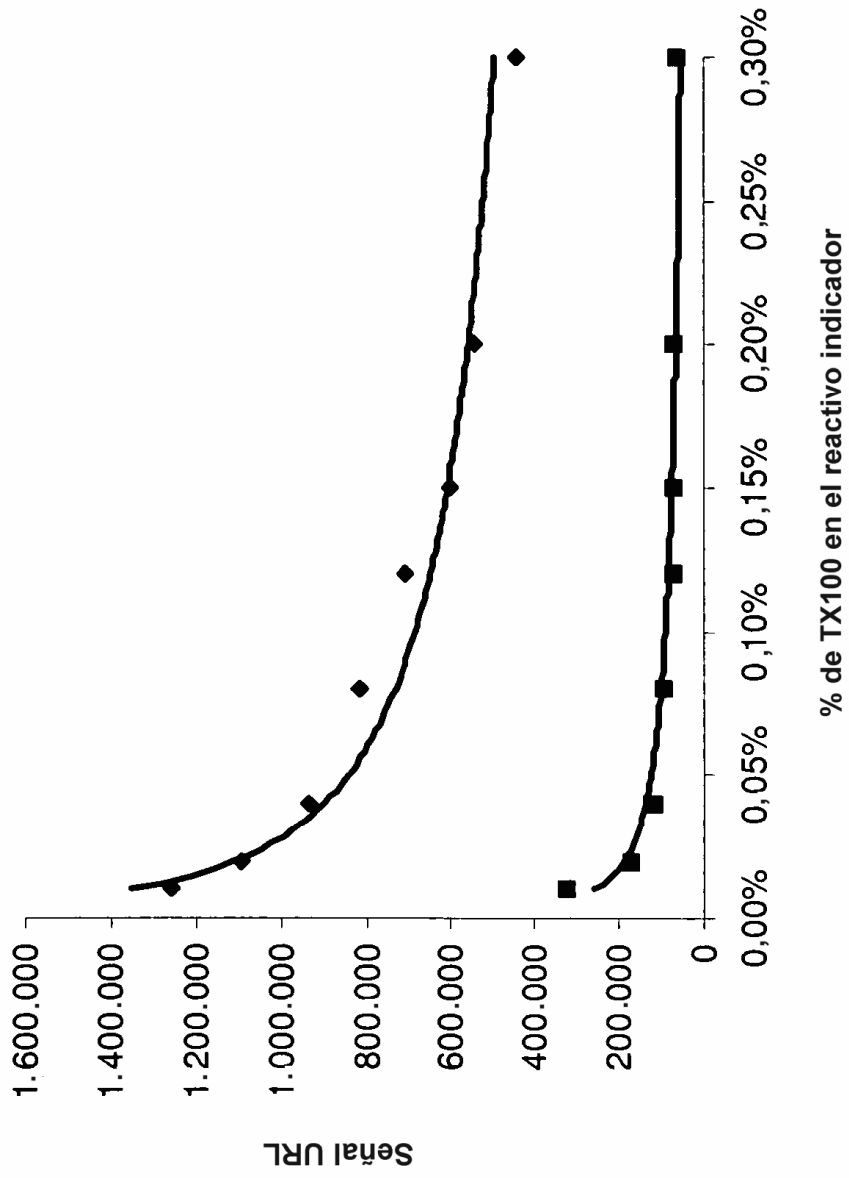


FIGURA 5

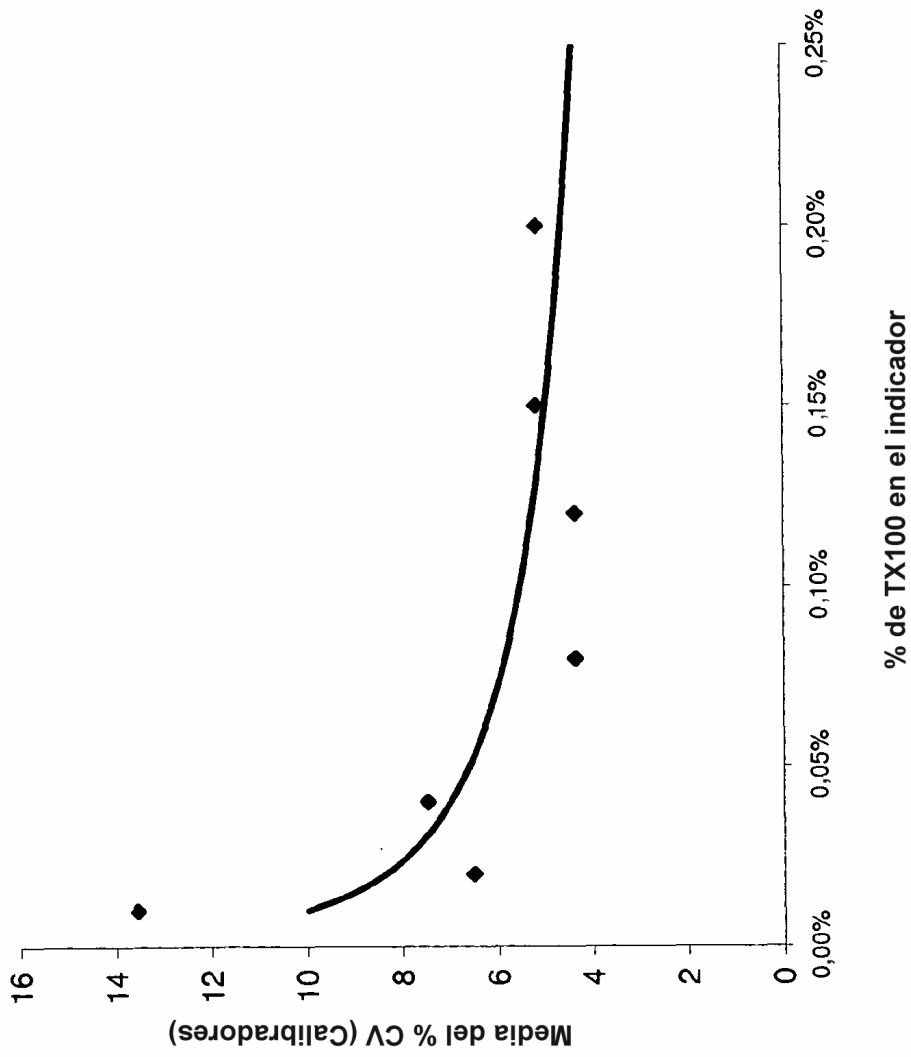


FIGURA 6

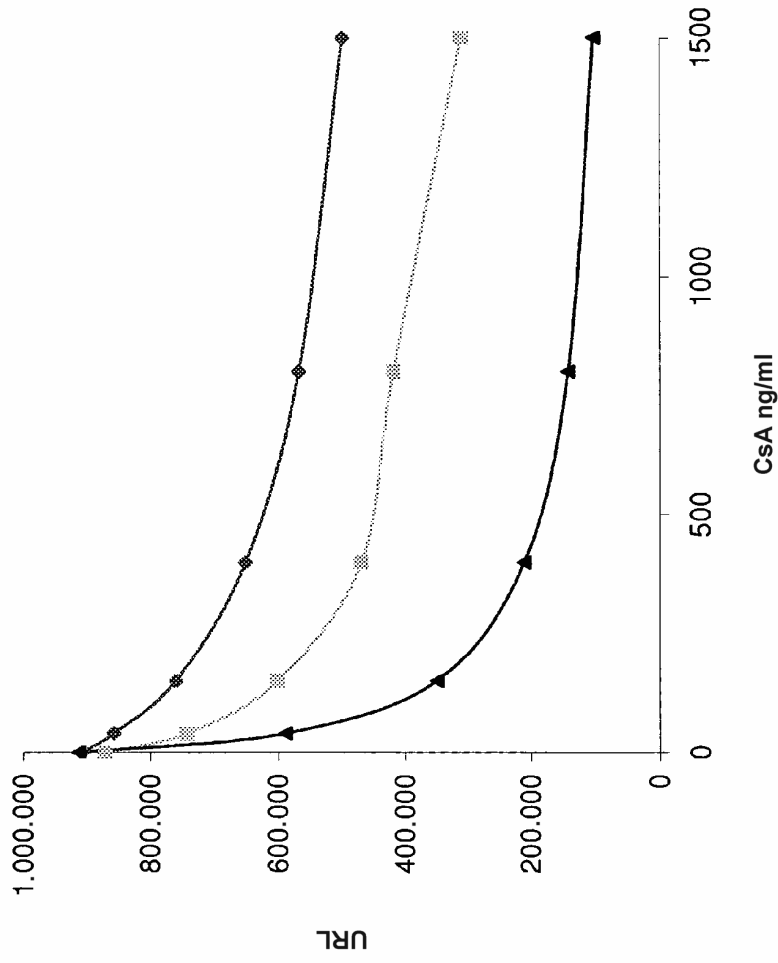


FIGURA 7

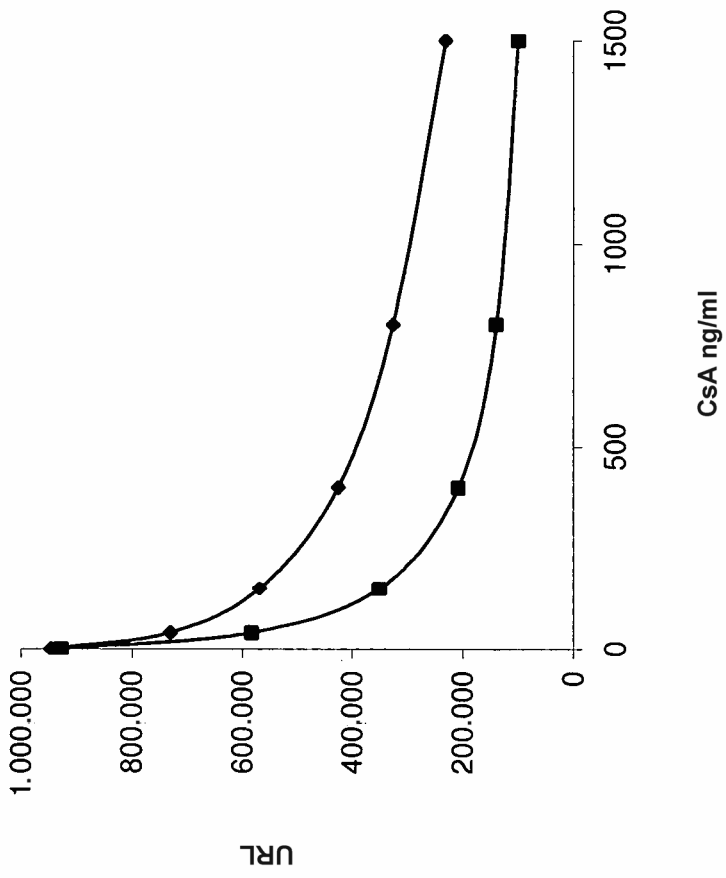


FIGURA 8