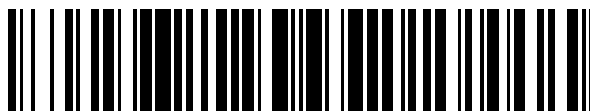


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 959**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04811367 .4**
96 Fecha de presentación: **10.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1687283**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Método y composición útiles para determinar FK-506**

30 Prioridad:
21.11.2003 US 719868

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:
**WANG, Chengrong;
WEI, Tie, Q. y
TENG, Zhu**

74 Agente/Representante:
Zuazo Araluze, Alexander

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 2 379 959 T3

DESCRIPCIÓN

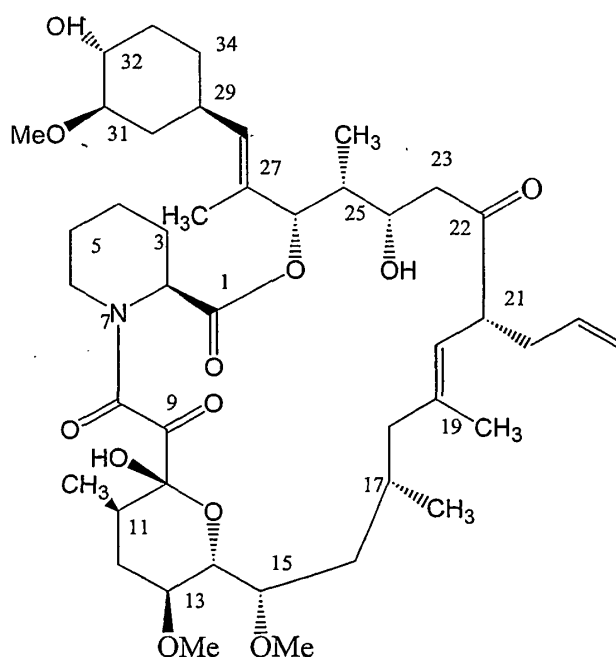
Método y composición útiles para determinar FK-506

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un método para determinar los niveles de FK-506 u otras sustancias de unión a macrofilina en la sangre, particularmente sangre no extraída en presencia de proteínas de unión específica para FK-506. El método usa derivados de FK-506 para desplazar el FK-506 de las proteínas de unión específica para FK-506.

FK-506 (o tacrolimús) es un undecapéptido poli-N-metilado cíclico, que tiene actividad inmunosupresora. FK-506 es un inmunosupresor macrolídico que se produce por *Streptomyces tsukubaensis* n.º 9993. La estructura de FK-506 se muestra en la figura 1.

Figura 1



Además, también se conocen un gran número de compuestos relacionados que conservan la estructura básica y las propiedades inmunológicas de FK-506. Estos compuestos se describen en varias publicaciones, por ejemplo los documentos EP 184162, EP 315973, EP 323042, EP 423714, EP 427680, EP 465426, EP 474126, WO 91/13889, WO 91/19495, EP 484936, EP 532088 y WO 93/5059.

Se usan compuestos de FK-506, por ejemplo, en la prevención del rechazo de trasplantes. Sin embargo, estos compuestos de FK-506 tienen efectos secundarios a dosis superiores y por tanto su concentración en la sangre debe mantenerse dentro de determinados intervalos terapéuticos. Además, las biodisponibilidades y las tasas de conversión metabólica tienden a ser específicas del paciente y por tanto la dosificación es específica del paciente. La potencia y el espectro de toxicidad de FK-506 requieren métodos sensibles, reproducibles y fiables para monitorizar la concentración en sangre de estos compuestos. Por tanto, es necesario monitorizar la concentración de estos fármacos inmunosupresores en la sangre a intervalos regulares. La rapamicina y ciclosporina son otros compuestos usados en la prevención del rechazo de trasplantes. Estos fármacos pueden usarse individualmente o en combinación.

Se ha encontrado que una parte del compuesto de FK-506 presente en la sangre existe en forma de un complejo FK-506-inmunofilina. Las inmunofilinas son una familia de proteínas de unión intracelular que se unen a ciclosporinas, rapamicinas o compuestos de FK-506. Actualmente se conocen dos familias distintas de inmunofilinas; ciclofilinas que se unen a ciclosporinas y macrofilinas que se unen a rapamicinas (sirolimús) y sus derivados tales como everolimús y compuestos de FK-506. Las estructuras de determinadas inmunofilinas se describen en Walkinshaw *et al*; 1992; Transplantation Proceedings, 24, 4 (2), 8-13. Las macrofilinas que se unen a FK-506 se denominan proteínas de unión a FK-506. Hasta la fecha, se han notificado cinco miembros: FKBP - 12, FKBP - 12.6, FKBP - 13, FKBP-25 y FKBP - 52.

Dada la importancia de ciclosporinas, rapamicinas y compuestos de FK-506 como productos farmacéuticos, existe una necesidad de ensayos sensibles, sencillos para determinar sus concentraciones en sangre.

Para FK-506, se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos y procedimientos de ensayo basados en los anticuerpos proporcionados. Documentos WO 95/07468, US 5.532.137. Sin embargo, estos procedimientos de ensayo disponibles requieren que se extraiga en primer lugar la muestra de sangre o plasma con un disolvente (tal como metanol) que entonces se elimina mediante evaporación o dilución para liberar el FK-506 de su proteína de unión. Entonces se añade el anticuerpo a la muestra y se detecta el complejo FK-506-Ac. El procedimiento de ensayo basado en el anticuerpo monoclonal específico funciona bien pero la necesidad de la etapa de extracción y la eliminación posterior del disolvente puede dar como resultado que el ensayo sea menos sensible y menos preciso si no se tiene cuidado. Por tanto, el ensayo debe llevarse a cabo por técnicos expertos y es un procedimiento que lleva mucho tiempo.

Se conoce a partir de estudios realizados *in vitro* que concentraciones en exceso de rapamicina previenen los efectos de FK-506 desplazando FK-506 de FKBP. Fruman, David *et al.*, Calcineurin fosfatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK-506 and cyclosporin A, PNAS (1992) 89(9), 3683-90. Además, el documento EP 717850 da a conocer un método de ensayo para FK-506 que usa un competidor de unión, concretamente rapamicina, para desplazar FK-506 de su proteína de unión. Por tanto, no es necesaria una etapa de extracción. Sin embargo, puesto que rapamicina, FK-506 y ciclosporina pueden usarse individualmente o en combinación, se prefiere que el competidor de unión sea un compuesto diferente de uno de los fármacos inmunosupresores de manera que pueda controlarse la cantidad de competidor de unión en la muestra.

El documento US-B-6 187 547 da a conocer un método de medición de los niveles en sangre de productos farmacéuticos de unión a inmunofilina, incluyendo ciclosporinas, rapamicinas y compuestos de FK-506, que incluye la etapa de desplazar el producto farmacéutico de su inmunofilina usando un competidor de unión. Por ejemplo, puede usarse rapamicina como competidor de unión en ensayos para FK-506 o, viceversa, puede usarse FK-506 como competidor de unión en ensayos para rapamicina.

Sumario de la invención

La presente invención describe derivados de FK-506. Estos derivados pueden actuar como competidor de unión para desplazar FK-506 o rapamicina de sus complejos de inmunofilina. Los derivados también se denominan en el presente documento competidores de unión.

Además, esta invención proporciona un procedimiento de ensayo para determinar la concentración de FK-506 o rapamicina en una muestra de sangre u otro fluido; comprendiendo el procedimiento añadir un competidor de unión que desplaza FK-506 o rapamicina de los complejos inmunosupresor-inmunofilina en la muestra; añadir un receptor que se une al producto farmacéutico pero no significativamente al competidor de unión; separar el complejo receptor-producto farmacéutico de la muestra; y determinar la cantidad del producto farmacéutico.

Descripción detallada de la invención

Los derivados de FK-506 se preparan mediante derivatización de tacrolímús. Los derivados se forman en los grupos

-OH de tacrolímús, en C-32 y/o C-24 para formar enlaces éter, (FK-OR), éster $\left(\begin{array}{c} \text{FK-O} \quad \text{C=O} \quad \text{R} \\ | \quad \quad \quad | \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \right)$, o carbamato

$\left(\begin{array}{c} \text{FK-O} \quad \text{C=O} \quad \text{N} \quad \text{R} \\ | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \right)$ proporcionando derivados de FK-506 en cualquiera o ambas de estas posiciones. En un aspecto, tanto el C-32 como C-24 se derivatizan y en otro aspecto los derivados son derivados de di-carbamato. Por tanto, las sustancias pueden ser por ejemplo los derivados ejemplificados en la figura 2. R (en C-32) y R' (en C-24) pueden seleccionarse independientemente de grupos alquilo o alilo desde C1 hasta C25, o bien lineales o bien ramificados o grupos aromáticos con o sin sustituciones. Además, el grupo alquilo, alilo o aromático puede contener otros grupos funcionales tales como éster, éteres, amidas, acilo, aminas, hidroxilo, sulfonatos, fosfatos, sulfatos, grupos fosfonato y similares. R puede no ser H. R' puede ser H. Muchos de estos derivados se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.665.727.

Figura 2

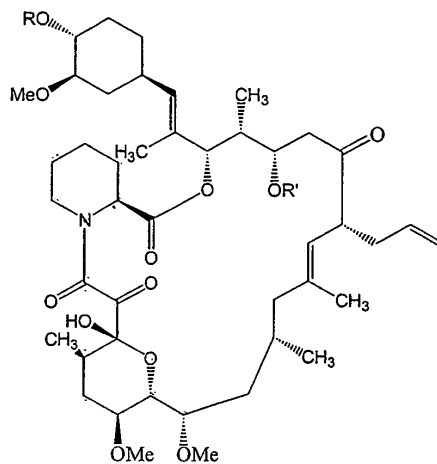
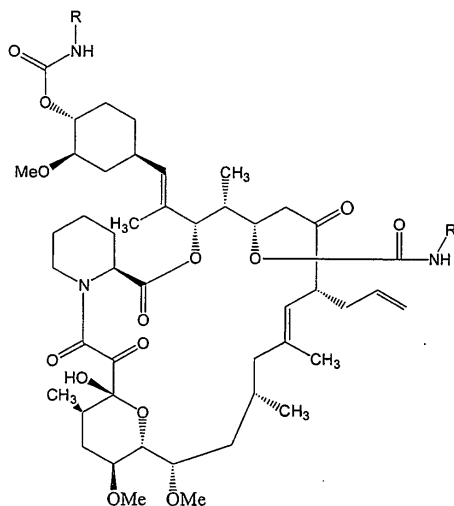


Figura 3

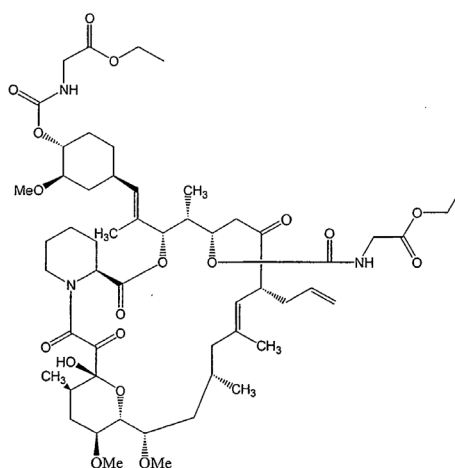


5

Otros aspectos de la invención se muestran en la figura 3 anteriormente. Estos derivados de carbamato se derivatizan tanto en C-24 como C-32. R y R' pueden seleccionarse independientemente de alquilo, alilo, acilo, arilo, además el grupo alquilo, alilo o aromático puede contener otros grupos funcionales tales como éster, éteres, amidas, acilo, sulfonatos, fosfatos, sulfatos, grupos fosfonato y similares. R puede ser H. R' puede ser H.

10

Figura 4



15

Se muestra anteriormente un derivado de carbamato particular en la figura 4. Este derivado de carbamato se derivatiza tanto en C-24 como C-32. En este ejemplo, R y R' son idénticos.

5 Los derivados de FK-506 usados en la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica y son útiles en inmunoensayos como competidores de unión de FK-506 o rapamicina.

10 En el método de la presente invención, se añade un competidor de unión de FK-506 o rapamicina a la muestra para liberar cualquier FK-506 o rapamicina de su complejo. El competidor de unión es un derivado o análogo de FK-506 tal como se muestra en las figuras 2, 3 y 4. El método de esta invención usa receptores que se unen al producto farmacéutico pero no significativamente al competidor de unión. El receptor, que reconoce y se une a FK-506 (o rapamicina si el producto farmacéutico que va a medirse es rapamicina), puede ser cualquier compuesto de unión específica tal como se usa en ensayos convencionales, por ejemplo anticuerpos recombinantes monoclonales, policlonales o fragmentos de anticuerpo. Es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

15 Una vez que el FK-506 se libera del complejo, la cantidad del FK-506 unido al receptor puede determinarse usando cualquier método de ensayo, preferiblemente un ensayo a base de anticuerpos monoclonales, por ejemplo un ensayo competitivo que mide la capacidad del producto farmacéutico para competir por la unión al anticuerpo o receptor, o un ensayo no competitivo, de la misma manera en un ensayo para rapamicina. Un ensayo competitivo usa preferiblemente por ejemplo FK-506 marcado (trazador) como competidor para el anticuerpo, en presencia y
20 ausencia de la muestra de prueba. El trazador puede marcarse con un marcador que puede proporcionar una señal adecuada, por ejemplo una señal radioactiva, fluorescente, luminescente o colorimétrica tal como es convencional en la técnica. Alternativamente, el competidor para el receptor puede ser un producto farmacéutico no marcado (opcionalmente el conjugado inmunogénico producto farmacéutico-proteína usado para generar el anticuerpo) recubierto sobre la superficie de la cámara de prueba, por ejemplo en un ensayo de inmunoabsorción ligado a
25 enzimas (ELISA) o en un sistema en el que el anticuerpo para el producto farmacéutico está marcado por sí mismo. El anticuerpo o receptor puede estar libre en la disolución de prueba o recubierto sobre la pared de la cámara de prueba, dependiendo del sistema de ensayo usado. En un ensayo competitivo, la señal (por ejemplo cantidad de trazador unido al anticuerpo o receptor) es inversamente proporcional a la cantidad de producto farmacéutico en la muestra de prueba. Pueden usarse disoluciones patrón que contienen concentraciones conocidas de FK-506 para
30 normalizar el ensayo tal como es convencional, de la misma manera para rapamicina si éste es el producto farmacéutico de interés.

Un receptor que se une a FK-506 pero no significativamente al competidor de unión significa que el grado de reactividad cruzada del receptor entre FK-506 y el competidor de unión no es suficiente para afectar
35 significativamente a la sensibilidad del ensayo o la significación clínica de los resultados del ensayo. La cantidad precisa de reactividad cruzada entre el competidor de unión y FK-506 (y/o el competidor de unión y el trazador en un ensayo competitivo) que puede tolerarse varía por supuesto en algún grado según la afinidad relativa del competidor de unión con la inmunofilina en comparación con FK-506: cuanto mayor sea la afinidad, menor será la concentración necesaria para desplazar FK-506 y mayor será la reactividad cruzada del receptor que por tanto puede tolerarse sin
40 afectar a la precisión del ensayo. En la práctica, la significación de la reactividad cruzada se mide de la mejor manera comparando las curvas patrón usando diferentes cantidades de competidor de unión; una vez que se alcanza la concentración mínima de competidor de unión para el desplazamiento de FK-506, las curvas patrón no deben variar significativamente a medida que la concentración del competidor de unión aumenta hasta el nivel más alto contemplado para su uso en el ensayo, demostrando de ese modo que cualquier reactividad cruzada con el
45 anticuerpo es insignificante en el contexto del ensayo (si había reactividad cruzada con el anticuerpo, la presencia de alta concentración de competidor de unión tendería a inflar la medición observada de niveles de fármaco debido a que el ensayo mediría FK-506 más competidor de unión). La significación de cualquier variación entre las curvas patrón en presencia y ausencia de competidor de unión puede evaluarse usando métodos estadísticos convencionales, por ejemplo una prueba de la t. Como directriz, sin embargo, debido a que el competidor de unión
50 está presente habitualmente en una concentración muy superior a FK-506 en la muestra de prueba, la reactividad cruzada del receptor entre el producto farmacéutico y el competidor de unión debe ser, por ejemplo, inferior al 1%, preferiblemente inferior al 0,1%, tal como se mide en un ensayo competitivo en tampón.

En la invención, el competidor de unión es un compuesto que es un derivado adecuado de FK-506 que se une a
55 proteínas de unión a FK-506, en particular FK BP 12. Puede usarse cualquier compuesto de FK-506 adecuado derivatizado en C-32 y/o C-24 que pueda desplazar el compuesto de FK-506 o rapamicina, preferiblemente los compuestos mostrados en las figuras 2. Se muestran competidores de ejemplos en las figuras 3 y 4. El competidor de unión también se selecciona basándose en su solubilidad en disoluciones a base de agua. Los grupos o funcionalidades R y R' preferidos confieren hidrofiliidad o solubilidad en agua al competidor de unión. Tales grupos
60 funcionales o funcionalidad pueden ser un sustituyente que tiene de 1 a 50 o más átomos y pueden incluir un grupo que tiene un fosfato, sulfonato, sulfato, amidinas, fosfonatos, carboxilatos, hidroxilo (particularmente polioles), amina, éteres, amidas y similares.

65 Para preparar el reactivo de desplazamiento los derivados de FK-506 usados en la presente invención se disuelven en disolventes orgánicos tales como metanol o similares y se formulan en un reactivo de desplazamiento en un ensayo para el fármaco. Por ejemplo, para preparar una disolución madre, se disuelve un éster de FK-506

derivatizado en R-24 y/o R-32 en metanol y se diluye además con un tampón a aproximadamente un pH neutro. El tampón puede contener proteínas portadoras tales como albúmina sérica bovina, gelatina, gamma globulina y similares, sales, conservantes o detergentes. Una disolución madre típica puede tener éster de FK-506 desde 0,2 hasta 2 mM. Normalmente para preparar el reactivo, la disolución madre se diluiría hasta el intervalo micromolar tal como 1-100 μ M en un tampón similar al tampón de disolución madre o agua. La razón eficaz típica de derivado de FK-506 con respecto a FK-506 de muestra usada en un ensayo es de aproximadamente 200:1, pero esta razón eficaz puede oscilar entre 10-10.000:1.

En el ensayo, una parte (por ejemplo 1-200 μ l) del reactivo de desplazamiento se combina con una parte de (por ejemplo 1-200 μ l) la muestra líquida que contiene FK-506. La disolución, normalmente sangre completa para una muestra de un paciente, se incuba para liberar el FK-506 de la proteína de unión. Normalmente, y por comodidad del usuario, el tiempo de incubación es de desde aproximadamente 0,5 hasta 5 minutos. Una vez que se libera el FK-506 de la proteína de unión, es accesible a la pareja de unión, tal como un anticuerpo, que se usa para su detección.

Pueden usarse anticuerpos frente al compuesto FK-506 adecuados para la detección; se describen determinados anticuerpos específicos en el documento EP-A 0 293 892. Cuando se usa un ensayo competitivo, el competidor para el anticuerpo puede ser un compuesto de FK-506 unido a una fase sólida tal como una perla, papel, tubo de ensayo, placa de ensayo o similares. El derivado marcado de FK-506 puede ser un derivado marcado con enzimas tal como FK-506 marcado con beta galactosidasa o fosfatasa alcalina u otro derivado marcado.

El procedimiento de ensayo de la invención tiene las ventajas de que puede llevarse a cabo de manera rápida y sencilla usando equipo bionalítico convencional para proporcionar resultados precisos y reproducibles. Además, puede usarse sangre completa sin la necesidad de extracción.

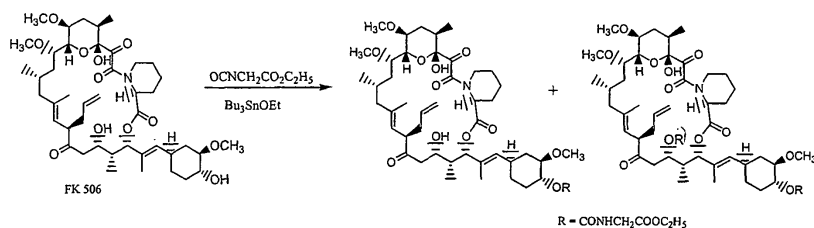
La descripción también proporciona un kit de ensayo adecuado para detectar la cantidad de FK-506 en sangre, comprendiendo el kit un competidor de unión a macrofilina que desplaza FK-506 de los complejos de FK-506 en la sangre; y un anticuerpo que se une al producto farmacéutico pero no significativamente al competidor de unión a macrofilina. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que es específico para FK-506.

Puede usarse el mismo competidor de unión a macrofilina de una manera similar para liberar rapamicina de la macrofilina.

El kit puede comprender además un trazador apropiadamente marcado, un patrón e instrucciones de uso. El marcador para el trazador puede ser cualquier marcador adecuado, por ejemplo un marcador radioactivo, fluorescente, quimioluminescente, enzimático o colorimétrico. Cuando sea conveniente, los componentes del kit pueden estar en forma liofilizada.

Ejemplo 1

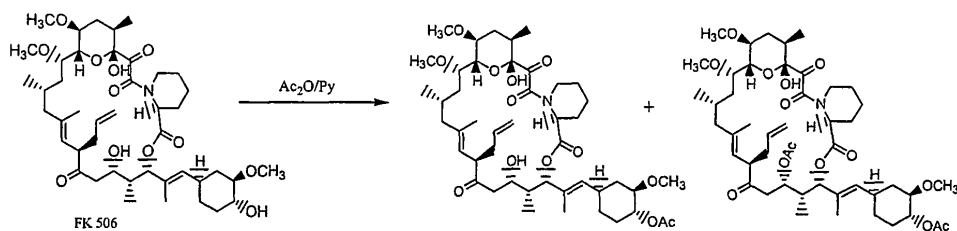
Preparación de derivados de carbamato de FK-506



Se disolvieron 50 mg de FK-506 en aproximadamente 0,5 ml de cloruro de metileno. Se añadieron aproximadamente 44 μ l de isocianoacetato de etilo y 42 μ l de etóxido de tributilestaño a la disolución de FK-506 y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. Se transfirió la mezcla de reacción a un embudo separador usando aproximadamente 10 ml de cloruro de metileno y se lavó tres veces con aproximadamente 15 ml de agua desionizada. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria, entonces se secó a alto vacío. Se purificaron adicionalmente los ésteres de FK-506 formados en la reacción usando cromatografía en columna. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria.

Ejemplo 2

Preparación de un derivado de éster de FK-506



Se disolvieron 50 mg de FK-506 en una disolución de 50 μ l de piridina en 500 μ l de cloruro de metileno. Se añadieron aproximadamente 12 μ l de anhídrido acético a la disolución de FK-506 y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 h. Se transfirió la mezcla de reacción a un embudo separador usando aproximadamente 10 ml de cloruro de metileno y se lavó tres veces con aproximadamente 15 ml de NaHCO_3 (ac). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria, entonces se secó a alto vacío. Se aisló adicionalmente el residuo de FK-506 usando cromatografía en columna.

Ejemplo 3

Preparación de disolución de pretratamiento de carbamato de FK-506

Se preparó una disolución madre que contenía éster de FK-506 0,45 mg/ml mediante dos etapas: 1) disolver 4 mg de carbamato de FK-506 en 2 ml de metanol. Entonces se diluye el carbamato de FK-506 disuelto 1:4,5 con un tampón que contiene albúmina sérica bovina libre de proteasa 30 mg/ml, MgCl_2 0,126 mg/ml, 0,03 ml/ml de etilenglicol, sal de sodio de PIPES 1,5 35,14 mg/ml, NaCl 50 mg/ml y beta-gal muteína (beta galactosidasa inactivada), pH 6,5 para preparar la disolución madre. Entonces se diluye la disolución madre para que contenga 2,7 μ g/ml de carbamato de FK con agua desionizada para preparar la disolución de pretratamiento de trabajo.

Preparación de conjugado de anticuerpo anti-FK-506- β -galactosidasa

Se conjugó el anticuerpo anti-FK-506 monoclonal con β -galactosidasa usando conector de SMCC convencional (trans-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimido). La disolución de conjugado de anticuerpo de trabajo contiene conjugado de anticuerpo anti-FK-506- β -galactosidasa aproximadamente 7,5 μ g/ml, albúmina sérica bovina libre de proteasa 30 mg/ml, MgCl_2 0,126 mg/ml, 0,03 ml/ml de etilenglicol, sal de sodio de PIPES 1,5 35,14 mg/ml, NaCl 50 mg/ml y beta-gal muteína (beta galactosidasa inactivada), pH 6,5.

Preparación de partículas de cromos magnéticas

La producción de partículas de cromo de FK-506 (fase sólida del inmunoensayo) se realiza mediante la preparación del conjugado de FK-506-BGG (gammaglobulina bovina)-dextrano, preparando una suspensión con las partículas de cromo y luego preparando comprimidos a partir de las partículas recubiertas. Cada comprimido de FK-506 contiene aproximadamente 2 mg de suspensión de cromo de FK-506, 10,5 mg de albúmina sérica bovina (BSA) al 30%, 30,4 mg de trehalosa dihidratada y 3,6 mg de carbocera 100 μ m.

Preparación de disolución de pretratamiento de rapamicina

También se preparó rapamicina para que sirviese como reactivo de pretratamiento para comparar con el carbamato de FK-506. La disolución de trabajo final tiene los mismos componentes y concentraciones que la disolución de trabajo de carbamato de FK-506 excepto porque se usó rapamicina 2,7 μ g/ml en lugar de carbamato de FK-506.

Ejemplo 4

Ensayo de FK-506

La medición de FK-506 usó el formato de ensayo conocido como ACMIA y tal como se describe en las patentes anteriores (documentos US 5147529, US 5128103, US 5158871, US 4661408, US 5151348, US 5302532, US 5422284, US 5447870, US 5434051). El principio y funcionamiento del método de FK-506 son los siguientes: se añade reactivo de pretratamiento que contiene el carbamato de FK-506 descrito en esta invención al recipiente de reacción sobre el instrumento Dimension[®] chemistry RxL/HM. A continuación se añaden 35 μ l de sangre completa que contiene FK-506. Se toman muestras de sangre completa a partir de un vaso convencional mezclando en primer lugar la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. El mezclado de la muestra de sangre completa con la disolución de pretratamiento de carbamato de FK-506 garantiza la lisis de la sangre completa y el desplazamiento de las moléculas de FK-506 unidas a proteína de sus sitios de unión por las moléculas de carbamato de FK-506. Por tanto, las moléculas de FK-506 liberadas serán accesibles al anticuerpo anti-FK-506 en la mezcla de reacción. A continuación se añade el conjugado de anticuerpo anti-FK-506- β -galactosidasa (80 μ l) y se deja que reaccione con

FK-506 en la muestra. Se añaden las partículas de cromo con FK-506-BGG (gammaglobulina bovina)-dextrano inmovilizado (75 μ l) y se deja que se una al conjugado sin reaccionar. El conjugado de anticuerpo anti-FK-506- β -galactosidasa unido a FK-506 no se une al cromo pero permanece en el sobrenadante cuando se aplica un campo magnético a la mezcla de reacción anterior para separar la disolución de las partículas de cromo. Se detecta el conjugado unido a FK-506 transfiriendo el sobrenadante del recipiente de reacción a una cubeta fotométrica, y midiendo la velocidad enzimática del conjugado en presencia de rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido (CPRG). La velocidad se mide bicromáticamente a 577 y 700 nm. El método esquemático se proporciona en la figura a continuación. Se comparan curvas de calibración típicas con y sin el pretratamiento con carbamato de FK-506 tal como se muestra en la figura 5.

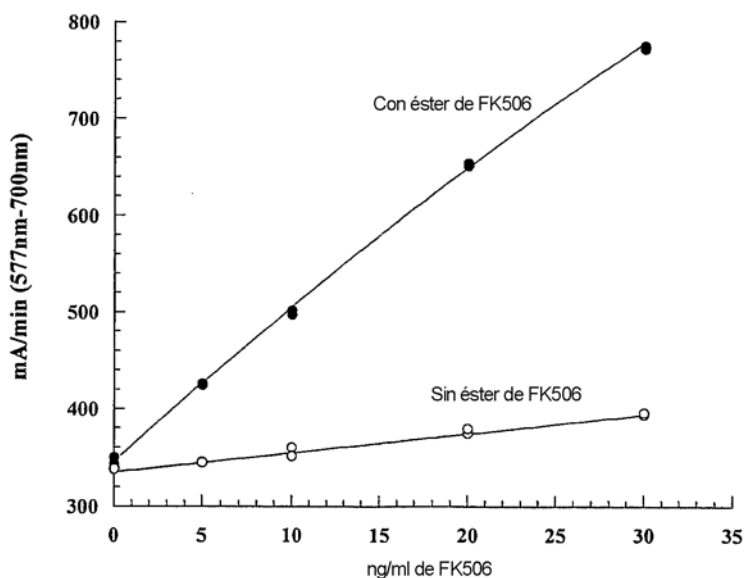


Figura 5. Curvas de calibración representativas que representan el ensayo DIMENSION® tratado con o sin el pretratamiento con carbamato de FK-506.

Ejemplo 5

Comparación de diferentes regimenes de pretratamiento

Se usó carbamato de FK-506, rapamicina o diluyente de pretratamiento para preparar disoluciones de pretratamiento para el ensayo DIMENSION® para medir los patrones de FK-506 que contenían FK-506 0, 5, 10, 20 y 30 ng/ml. También se trató otro conjunto de patrones de FK-506 con las disoluciones de pretratamiento Syva EMIT® (se extraen 200 μ l de muestra con 200 μ l de metanol y entonces se precipita la proteína en la mezcla con 50 μ l de disolución de sulfato cúprico. Se usa el sobrenadante centrifugado como muestra). Se pretrataron los patrones no tratados mediante los reactivos Syva EMIT® *in situ* mediante carbamato de FK-506, rapamicina o el diluyente de pretratamiento sólo y se analizaron en el analizador de química clínica DIMENSION® usando el ensayo ACMIA. Se sometió a prueba el patrón pretratado con los reactivos Syva EMIT® mediante el ensayo ACMIA en un instrumento DIMENSION® usando cartuchos de reactivo que contenían sólo el diluyente de pretratamiento como disolución de pretratamiento. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos sometiendo a prueba estos enfoques de pretratamiento.

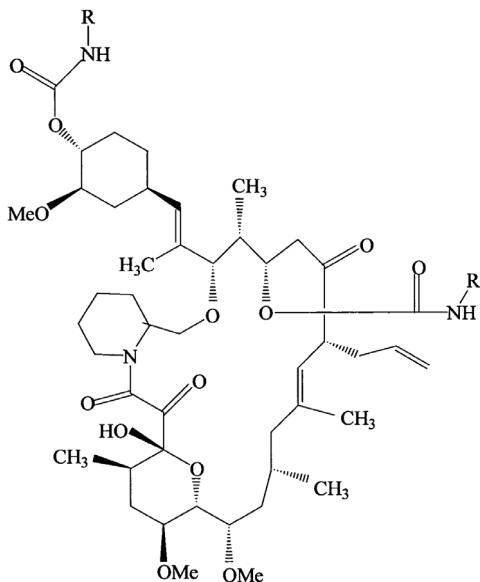
Tabla 1

Patrones de FK-506, ng/ml	ABS del éster de FK x 10 ⁻³	ABS de rapamicina x 10 ⁻³	Emisión de ABS del pretratamiento x 10 ⁻³	ABS del diluyente del pretratamiento x 10 ⁻³
0	313,7	340,2	305,9	338,2
5	415,6	421,3	346,3	345,2
10	555,6	504,4	379,1	355,8
20	780,2	661,3	460,2	377,2
30	916,2	793,1	545,6	394,6

ABS = Absorbancia

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la presencia de una composición farmacéutica de unión a macrofilina en una muestra que comprende: añadir un competidor de unión a la muestra teniendo el competidor de unión la fórmula:



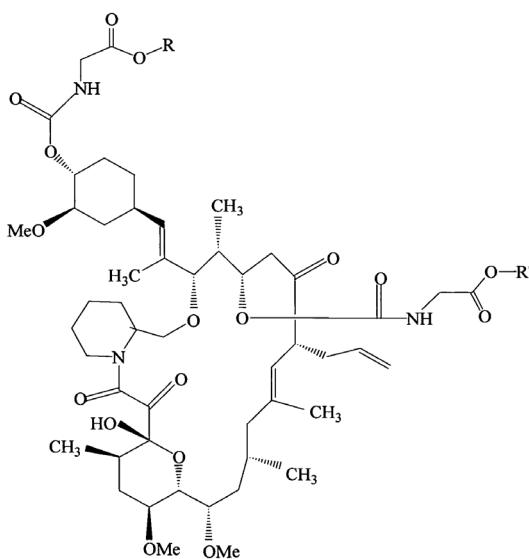
o solvato del mismo, en el que

R es alquilo, arilo, alilo, teniendo cada uno menos de 25 carbonos y en el que

R' es alquilo, arilo, alilo, teniendo cada uno menos de 25 carbonos o H; añadir un receptor que une al producto farmacéutico pero no significativamente al competidor de unión; detectar el receptor-composición farmacéutica y determinar la cantidad del producto farmacéutico.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el producto farmacéutico es rapamicina (sirolimús), everolimús o tacrolimús (FK-506).

3. Método para determinar la presencia de una composición farmacéutica de unión a macrofilina en una muestra que comprende: añadir un competidor de unión a la muestra teniendo el competidor de unión la fórmula:



o solvato del mismo, en el que

R es alquilo, arilo, alilo, teniendo cada uno menos de 25 carbonos y

R' es alquilo, arilo, alilo, teniendo cada uno menos de 25 carbonos o H; añadir un receptor que se une al producto farmacéutico pero no significativamente al competidor de unión; detectar el receptor-composición farmacéutica y determinar la cantidad del producto farmacéutico.

- 5 4. Método según la reivindicación 3, en el que el producto farmacéutico es rapamicina (sirolimús), everolimús o tacrolimús (FK-506).
5. Método según la reivindicación 4, en el que R o R' es etilo.
- 10 6. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R o R' comprenden además al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en ésteres, éteres, amidas, fosfatos, sulfonatos, sulfato, amidinas, fosfonatos o grupos funcionales carboxilato.