

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 207**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10151541 .9**
- 96 Fecha de presentación: **05.04.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2180323**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Métodos para medir complejos inmunosupresores de tacrólimo, sirólimo, y ciclosporina A en una muestra de sangre**

30 Prioridad:
06.04.2005 US 668714

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2012

73 Titular/es:
**ABBOTT LABORATORIES
DEPARTMENT D377/AP6A-1 100 ABBOTT PARK
ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064-6008, US**

72 Inventor/es:
**Drengler, Susan M. y
Baugher, Bennet W.**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 380 207 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para medir complejos inmunosupresores de tacrólimo, sirólímo, y ciclosporina A en una muestra de sangre

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a métodos y análisis diagnósticos para determinar las cantidades de complejos inmunosupresores que contienen (individualmente o combinados) los fármacos inmunosupresores tacrólimo, sirólímo o ciclosporina A en una muestra de sangre.

10

Antecedentes de la Invención

La ciclosporina A (CsA), el tacrólimo (FK506, Prograf®) y el sirólímo (rapamicina) son fármacos inmunosupresores potentes que inhiben la proliferación de linfocitos T. La acción de estos fármacos está mediada por proteína intracelulares denominadas inmunofilinas. Estas inmunofilinas son rotamasas (enzimas implicadas en el plegamiento de las proteínas).

15

El Sirólímo y el tacrólimo comparten homología estructural, y un dominio de unión inhibitor sobre una familia de inmunofilinas, denominadas proteínas de unión FK506 o FKBP (Abraham et al., Ann Rev. Immunol. Vol. 14, 483 (1996)). La ciclosporina A se une a la ciclofilina, otra inmunofilina y la inhibe. Formando complejo con las proteínas de unión, estos fármacos inhiben las dianas secundarias que regulan las rutas de transducción de la señal y dan como resultado una inhibición del progreso del ciclo de las células inmunitarias. Estas rutas median y regulan la inmunosupresión deseada. Estos y otros factores y rutas también producen sistémicamente los efectos no deseables de los fármacos por medio de las células inmunitarias y otros tipos de células.

20

25

El sirólímo y tacrólimo interactúan ambos con FKBP12, un miembro de las inmunofilinas FKBP, que es expresada en la sangre humana. Los dímeros de sirólímo/FKBP12 y de tacrólimo/FKBP12 forman complejos e inhiben moléculas diana separadas. La diana del dímero sirólímo/FKBP12 se denomina Diana de Rapamicina en Mamíferos (mTOR). El dímero de tacrólimo/FKBP12 se dirige a la Calcineurina ((Abraham *et al.*, (más arriba); Chung et al., Cell Vol. 69, 1227 (1992)). El dímero de ciclosporina A-ciclofilina y el dímero de tacrólimo/FKBP12 por separado pueden formar un complejo pentamérico e inhiben una diana común, la Calcineurina, una serina/treonina fosfatasa.

30

La unión del dímero de sirólímo/FKBP12 a mTOR inhibe el progreso del ciclo celular de las células T. En las células T la Calcineurina/Calcio/Calmodulina unida al complejo de tacrólimo/FKBP12 o al complejo de Ciclosporina A/ciclofilina evita la desfosforilación, y de este modo, reduce la activación de numerosas moléculas de transducción de señales sistémicas, incluyendo NFAT que estimula la transcripción del modulador inmunitario interleuquina-2 (IL-2). Los efectos inmunosupresores de estos fármacos se logran por medio de los complejos multiméricos descritos previamente formados por estos fármacos con sus proteínas de unión, sus dianas (las enzimas que inhiben), y otros cofactores requisito.

35

40

El tacrólimo tiene un intervalo terapéutico reducido, debido a esto, el control de los niveles de tacrólimo en pacientes que experimentan una terapia inmunosupresora con tacrólimo es una práctica convencional. Los métodos actuales miden la concentración total de fármaco en sangre (formando complejo y sin formar complejo). La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.338.946 hace referencia a métodos para el análisis manual de fármacos inmunosupresores (con actividad inhibitora de calcineurina) *in vitro*, esto es, que forman un complejo de tacrólimo aislado con fármaco inmunosupresor con componentes de unión exógenos, inmunofilina específica implicada, calcineurina bovina, calmodulina, calcio), en un recipiente sólido y detectando el complejo con un anticuerpo anti-calcineurina etiquetado para un sistema de detección. Otros métodos disponibles extraen el tacrólimo de muestras de sangre obtenidas de pacientes que reciben tacrólimo, y miden la cantidad de tacrólimo extraído formando complejos *in vitro* como se ha descrito más arriba ((Amstrong et al., Clin. Chemistry Vol. 44, páginas 2516-2523 (1998)). Estas mediciones se comparan después con intervalos de concentración de toxicidad del fármaco determinadas demográficamente y se utilizan para estimar los efectos tóxicos potenciales.

45

50

Se ha demostrado que existe una carencia de correlación entre la concentración total de fármaco y la inmunosupresión; por lo tanto la medición de la concentración en sangre total del fármaco no es predictiva de respuestas de inmunosupresión individuales. La variabilidad en la respuesta al fármaco inmunosupresor se ha atribuido al descubrimiento de varios factores: metabolitos inactivos de los fármacos de origen que experimentan reacción cruzada con los anticuerpos específicos para los fármacos de origen en los análisis, metabolitos activos del fármaco de origen que no se unen al anticuerpo del análisis (y no se miden), y en gran parte al hecho de que estos análisis miden el fármaco de origen total en una muestra, en lugar de los complejos inmunosupresores funcionales. Se debe tener en cuenta que tacrólimo, sirólímo, y Ciclosporina A y sus metabolitos activos actúan como inmunosupresores solamente cuando forman complejos multiméricos con sus inmunofilinas de unión concretas y las enzimas diana implicadas en la inmunosupresión celular.

55

60

Cada paciente tiene diferentes concentraciones en sangre de estas proteínas de unión y componentes diana (debido a la edad, género, raza, afecciones, etc.). De este modo, la capacidad para formar complejos inmunosupresores y el número de complejos formados en presencia de cada uno de estos fármacos está determinado de manera única (genéticamente, y/o medioambientalmente) en cada paciente individual. Por lo tanto, cada paciente tiene un grado único de respuesta inmunosupresora, que depende en parte de la presencia y la abundancia de los componentes requeridos para formar los complejos inmunosupresores.

Cuando se tratan los pacientes con estos fármacos inmunosupresores hidrófobos, una parte del fármaco se une a proteínas de unión funcionales y afecta a las rutas de transducción de las señales inmunosupresoras, pero una fracción significativa de fármaco se une de manera no específica a proteínas, lípidos, y membranas, quedando aislada de las células inmunitarias en las que tiene lugar la acción inmunosupresora. La medición de la concentración total en sangre del fármaco inmunosupresor con los métodos disponibles en la actualidad conduce a una sobrestimación de la cantidad de fármaco funcional presente en la sangre debido a que estos métodos miden también el fármaco funcionalmente inactivo implicado en la inmunosupresión (Alak, A., Therap. Fármaco, Monit., Vol. 19, páginas 338-351 (1997). Adicionalmente, los métodos actuales que miden los metabolitos activos del fármaco de origen carecen de correlación entre su actividad farmacéutica y sus reactividades cruzadas inmunológicas (Amstrong et al., Clin. Chemistry Vol. 44, páginas 2516-2523 (1998)). También es importante mencionar que los métodos actuales que miden los fármacos inmunosupresores totales en la sangre de un paciente se utilizan para pronosticar los efectos tóxicos potenciales, no para medir efectos terapéuticos inmunosupresores.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de métodos de análisis que permitan la cuantificación de los complejos inmunosupresores funcionalmente activos, esto es, complejos formados en la propia sangre del paciente. Se piensa, sin estar vinculado a una teoría, que por medio de esta cuantificación, se proporcionará una estimación de las proteínas de unión específicas y los componentes diana, una estimación de la inmunosupresión potencial antes, o durante la terapia con el inmunosupresor. Específicamente, en pacientes que no han comenzado la terapia con el inmunosupresor, la cuantificación de los complejos inmunosupresores funcionalmente activos podría ayudar a seleccionar el tratamiento con el fármaco más apropiado específico para cada paciente basándose en la capacidad del paciente para formar complejos activos con tacrólimo, sirólímico o ciclosporina A, o combinaciones de los mismos, sin someter al paciente a efectos de fármacos tóxicos innecesarios causados por los métodos de selección de fármacos de prueba y error actuales. En los pacientes que ya se encuentran bajo terapia con inmunosupresores, la cuantificación de los complejos inmunosupresores máximos teóricos puede permitir una correlación más fiable entre la fracción farmacológicamente activa del fármaco en sangre y la inmunosupresión observada *in vivo* en el paciente. Por medio de la adición de cantidades saturantes de fármaco a una muestra de sangre de un paciente que está experimentando terapia y evaluando comparativamente los complejos formados en las muestras iniciales y en las muestras saturadas de fármaco, se obtiene información sobre el incremento potencial en la dosificación del fármaco inmunosupresor que dará como resultado un aumento de la inmunosupresión sin un aumento del riesgo de efectos negativos para el paciente. Además, los métodos que permiten la medición de la fracción de fármaco que forma complejos inmunosupresores funcionalmente activos se pueden adaptar para permitir una cuantificación de las proporciones de los complejos formados para cada fármaco inmunosupresor cuando un paciente está experimentando una terapia dual.

En el documento EP A 0750193 se describe un método para la cuantificación de la cantidad de un inmunosupresor en una muestra detectando la formación de un complejo inmunosupresor formado entre los fármacos y dos proteínas diana. Esto se logra haciendo reaccionar el inmunosupresor de la muestra con un exceso de proteínas diana añadido en forma purificada a la muestra. Cárdenas, M. et al describen "Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin" en Current Opinion en Nephrology y Hypertension, vol. 6, núm. 3, Mar 2005, páginas 479-487.

Compendio de la invención

La presente solicitud incluye un método para medir la cantidad de componentes del complejo inmunosupresor específicas para un fármaco inmunosupresor presente en una muestra de sangre de un paciente no tratado que necesita terapia con inmunosupresor. Este método comprende las etapas de recoger la muestra de sangre; lisar las células sanguíneas; añadir a las células de sangre lisadas un exceso del fármaco inmunosupresor para formar complejos inmunitarios específicos del fármaco; dejar que se unan los complejos a una superficie sólida ligada a un anticuerpo específico para uno de los componentes de la sangre que forma los complejos; añadir un anticuerpo conjugado con un marcador de detección, que es específico para uno de los componentes de la sangre que forma los complejos, y que no está directamente anclado a la superficie sólida; y medir la cantidad de marcador de detección conjugado en la mezcla final. La cantidad de marcador de detección será proporcional a la cantidad de componentes del complejo inmunosupresor presente en dicha muestra de sangre.

Se debe observar que la presente solicitud también incluye el uso de dicho método para seleccionar el fármaco inmunosupresor más eficaz terapéuticamente que se va a administrar a un paciente no tratado que lo necesite.

La presente invención incluye adicionalmente un método para la determinación de la cantidad máxima de complejos inmunosupresores formados por un fármaco inmunosupresor específico, que es capaz de formar un paciente bajo terapia inmunosupresora con el fármaco. Este método comprende las etapas de recoger la muestra de sangre; lisar las células sanguíneas de la muestra; dividir las células sanguíneas lisadas en alícuotas iguales en dos recipientes diferentes; añadir al segundo de los dos recipientes un volumen de matriz apropiado utilizando un exceso del mismo fármaco inmunosupresor en el tratamiento del paciente; añadir al primero de los dos recipientes el mismo volumen de matriz apropiado que en el segundo recipiente sin el exceso de fármaco inmunosupresor; dejar que el primer y segundo recipientes se unan a superficies sólidas iguales etiquetadas con un anticuerpo específico para los componentes de la sangre que formarán complejos con el fármaco inmunosupresor; lavar cada uno de ambos recipientes para separar los componentes que no han reaccionado y los interferentes; añadir a cada uno de ambos recipientes un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para el componente que forma dicho complejo, y que no está unido al anticuerpo de la superficie sólida; medir por separado la cantidad de marcador de detección en cada uno de los dos recipientes, donde la cantidad de marcador de detección del primer recipiente es proporcional al número total de complejos formados con el fármaco inmunosupresor, y la cantidad de marcador de detección del segundo recipiente es proporcional al número máximo teórico de complejos que pueden ser formados con fármaco inmunosupresor adicional; y determinar la diferencia entre la cantidad de complejos reales totales formados en el primer recipiente con la cantidad de complejos potenciales que se pueden formar en el segundo recipiente. La diferencia representa el incremento en complejos inmunosupresores que podría formar potencialmente el paciente bajo tratamiento con el fármaco inmunosupresor.

Se debe observar que la aplicación también incluye el uso del método para pre-determinar las ventajas de la cantidad adicional de fármaco inmunosupresor administrada realmente a un paciente bajo tratamiento que no está logrando el efecto terapéutico requerido.

La presente invención comprende adicionalmente un método para medir las proporciones relativas de los complejos formados por dos fármacos inmunosupresores, en una muestra de sangre de un paciente que recibe un tratamiento dual. Este método comprende las etapas de recoger dicha muestra de sangre; lisar las células sanguíneas; dividir las células lisadas en alícuotas iguales en dos recipientes diferentes; unir las células lisadas a una superficie sólida etiquetada con un anticuerpo específico para los componentes de la sangre que son comunes a los dos fármacos inmunosupresores; añadir al primer recipiente un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para el complejo inmunitario que se está midiendo, cuyo anticuerpo está dirigido a un componente del complejo diferente que el anticuerpo unido a la superficie sólida; añadir al segundo recipiente un anticuerpo conjugado etiquetado con un marcador, específico para el complejo inmunitario que se está midiendo, que está dirigido a un componente del complejo diferente que el anticuerpo unido a la superficie sólida; y comparar las cantidades de marcador de detección en el primer y segundo recipientes con curvas de calibración apropiadas para obtener las proporciones relativas de los complejos formados por cada uno de los fármacos inmunosupresores utilizados en el tratamiento con fármaco dual.

La presente solicitud también incluye el uso del método para determinar la cantidad de complejo de fármaco inmunosupresor que es responsable del efecto terapéutico en las terapias de combinación de fármacos.

Se debe observar que cualquiera de los métodos de la presente invención es aplicable a los fármacos inmunosupresores seleccionados entre tacrólimo, sirólimo y ciclosporina A.

Se debe observar que la presente invención incluye análisis diagnósticos basados en los métodos de la presente invención que son compatibles con sistemas automáticos.

La presente solicitud también incluye kits que comprenden superficies sólidas etiquetadas con un anticuerpo, y un anticuerpo diferente etiquetado con un marcador de detección, donde los anticuerpos son específicos para diferentes componentes de cada uno de los complejos formados con los fármacos inmunosupresores descritos más arriba.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a un método para medir las cantidades relativas de componentes de complejos inmunosupresores, por medio de la determinación de los complejos inmunosupresores que contienen fármacos inmunosupresores (o metabolitos activos de los fármacos), a saber, tacrólimo, sirólimo y ciclosporina A, en una muestra de sangre, de, (i) un paciente que ya está en tratamiento que no está logrando el efecto inmunosupresor pretendido, y (ii) un paciente que está recibiendo una terapia combinada de fármacos. La solicitud también se refiere al uso de estos métodos para determinar: (i) el fármaco inmunosupresor más beneficioso para la terapia determinando la cantidad máxima de componentes de la sangre específicos presente en una muestra de sangre de un paciente que necesita terapia con inmunosupresores, que formará complejos con un fármaco inmunosupresor específico antes del comienzo de la terapia; (ii) la ventaja potencial de incrementar la cantidad de fármaco inmunosupresor ya administrado a un paciente que ya está en tratamiento con dicho fármaco inmunosupresor,

cuando dicho paciente no está alcanzando el efecto inmunosupresor pretendido, y (iii) las proporciones relativas de complejos inmunosupresores debidas a cada fármaco en los pacientes que experimentan terapia dual con fármacos.

5 La medición de los complejos inmunosupresores formados con cada fármaco se utiliza para estimar la respuesta individual potencial a cada fármaco antes de someter al paciente a una terapia específica.

10 Es un hecho bien conocido que cada paciente individual tiene diferentes capacidades para sintetizar componentes celulares. Farmacológicamente, solamente una pequeña fracción de fármaco administrado se encuentra biodisponible para funcionar en el sitio activo apropiado debido a diferentes mecanismos de secuestro o inactivación que tienen efecto después de que un fármaco entre en la corriente sanguínea. Se produce una toxicidad del fármaco cuando un fármaco interacciona con otros tejidos. La toxicidad es potenciada cuando el fármaco satura los radicales secuestradores disponibles, ocasionando un rápido aumento de la concentración de fármaco libre en la sangre. La naturaleza lipofílica de estos fármacos inmunosupresores, su función como inhibidores de enzimas y la naturaleza abundante de las dianas, hacen de ellos actores principales en múltiples rutas de transducción de señales. Esto impone lo delicado de la titulación de la dosis requerida para permanecer dentro de una ventana terapéutica.

20 Como preludeo al tratamiento, se podría utilizar el análisis de los componentes sanguíneos del paciente, específico para cada uno de los tres candidatos a fármacos, a saber tacrólimo, sirólímico y ciclosporina A, para determinar el número máximo de complejos que se podrían formar en presencia de cada fármaco, utilizando cada uno de los análisis específicos para cada fármaco. Esta información se podría utilizar para determinar qué componentes de la ruta de transducción de la señal son más abundantes en un paciente, y la supresión de qué ruta (es decir qué fármaco) produciría el mayor beneficio. Esto evitaría la toxicidad innecesaria evitando el tratamiento con candidatos a fármacos potencialmente menos efectivos.

25 Se puede recoger sangre de un paciente candidato a experimentar terapia inmunosupresora en tubos tratados con anticoagulante para evitar la coagulación durante la recogida. Los anticoagulantes que se pueden utilizar con la presente invención incluyen pero no están limitados a EDTA y heparina. El uso de EDTA puede estar contraindicado para el Tacrólimo y la Ciclosporina A puesto que la formación de complejos con Calcineurina es dependiente de Calcio.

30 Puede ser deseable una etapa para aislar los glóbulos blancos de los glóbulos rojos para su análisis debido a que los complejos inmunosupresores de interés están en los glóbulos blancos. La separación concentraría el tipo celular de interés, disminuyendo los interferentes sanguíneos potenciales en la muestra e incrementando la sensibilidad del análisis mediante el incremento de la concentración de los complejos de fármacos.

35 Se pueden utilizar detergentes suaves o algunos otros medios para lisar los glóbulos blancos y liberar intactos los componentes que no forman complejos intracelulares de las células. Los ejemplos de los detergentes suaves que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitados a Triton X-100 y saponina. Se añade un exceso de fármaco inmunosupresor a los componentes celulares en la matriz apropiada durante un tiempo y en las condiciones apropiadas para formar los complejos inmunosupresores entre el fármaco y los componentes sanguíneos. Según se utiliza en la presente memoria, la matriz se puede definir como la multiplicidad de componentes que forman el entorno apropiado para formar los complejos de fármaco con una superficie sólida y anticuerpos marcados que tienen reactividades cruzadas inmunológicas con los complejos aislados; los ejemplos de dichos componentes son las sales, los tampones, los conservantes, etc. Los tipos de matrices para la reacción, los tiempos y las temperaturas de incubación son conocidos por los expertos en la técnica. La porción cuantitativa del método comienza mediante el anclaje a una superficie sólida de los complejos inmunosupresores formados pasivamente a través de un anticuerpo dirigido a cualquiera de la proteína de unión o la enzima diana a la que está anclada el fármaco. Los tipos de superficies sólidas incluyen pero no están limitadas a placas de microtitulación, micropartículas y tubos de ensayo revestidos.

50 La superficie sólida permitirá mantener el complejo anclado a la misma durante las etapas de lavado automático para eliminar los metabolitos inactivos y los interferentes. Después de las etapas de lavado, se añade un anticuerpo marcado dirigido al lado del complejo que no está anclado directamente a la superficie sólida (o la proteína diana o la enzima diana) y se mezcla, formando de este modo el análisis sándwich de doble anticuerpo. El anticuerpo marcado se liga a una molécula de detección que permitirá la cuantificación del complejo inmunosupresor atrapado por la superficie sólida. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una genoteca de expresión de Fab. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

60 El fundamento para el aislamiento y la cuantificación de los complejos inmunosupresores utilizando la tecnología de análisis "sándwich" de doble anticuerpo es la alta afinidad de cada fármaco inmunosupresor por proteínas sanguíneas específicas, y la alta afinidad de cada uno de estos complejos por sus proteínas diana específicas.

El sirólímo y el tacrólímo comparten un dominio de unión y la capacidad para inhibir FKBP12. El sirólímo unido a FKBP12 forma un complejo con una proteína diana denominada Diana de Rapamicina en Mamíferos (mTOR). El tacrólímo unido a FKBP12 elige como diana la Calcineurina, una serina/treonina fosfatasa que consiste en subunidades múltiples, Calcineurina A y Calcineurina B, Calmodulina y calcio.

5 La adición de alícuotas de sangre que contiene complejos de tacrólímo, calcineurina y FKBP12 a una superficie sólida unida a anticuerpo anti-Calcineurina A o B ancla los complejos inmunosupresores a la superficie sólida. La adición del anti-FKBP12 marcado permitiría el anclaje de las moléculas de detección a los complejos aislados (en el caso del complejo de Calcineurina-Ciclosporina A-ciclofilina el anticuerpo marcado sería anti-ciclofilina). Utilizando el mismo principio, un anticuerpo anti-mTOR sobre la superficie sólida utilizada con el anticuerpo marcado anti-FKBP12 crearía un análisis para complejos inmunosupresores de FKBP-Sirólímo-mTOR.

10 Para permitir la medición de Tacrólímo y Ciclosporina A en la misma muestra el anticuerpo de la micropartícula podría ser anti-Calcineurina A o B, y los anticuerpos marcados podrían ser anti-ciclofilina para la CsA, y anti-FKBP12 para el tacrólímo.

15 Para permitir la medición de Tacrólímo y Sirólímo en la misma muestra, el anticuerpo de la superficie sólida podría ser anti-FKBP12, y los anticuerpos marcados serían anti-mTOR para el Sirólímo, y Anti-Calcineurina A o B para el Tacrólímo.

20 La presente solicitud contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-ratón de cabra secundario anclado covalentemente a la superficie sólida para permitir la adición de un anticuerpo de ratón no covalente, primario para producir una superficie sólida con un anticuerpo que es específico para el antígeno de interés (inmunofilina de elección o diana de elección). Este método puede dar como resultado un aumento de la señal con respecto a la proporción del fondo en el análisis.

25 La interacción entre el complejo inmunitario, la superficie sólida y los anticuerpos marcados se puede realizar simultáneamente (en una etapa), o sucesivamente (en dos etapas) con lavado entre la adición de la muestra a la superficie sólida y la adición del anticuerpo marcado.

30 La adición de reactivos para producir la señal en proporción a la cantidad de anticuerpo marcado unido permite la detección y la cuantificación.

35 Las moléculas de detección pueden ser cualquiera de las que producen una señal que sea cuantificable. Las moléculas de generación de señal se pueden incluir, pero no están limitadas a fosfatasa alcalina, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, acridinio y radiomarca unida a los anticuerpos apropiados.

40 Los complejos se pueden cuantificar comparándolos con los calibradores y los controles. Los calibradores y los controles consisten, por ejemplo para la determinación de tacrólímo, en niveles conocidos de tacrólímo titulado en un cóctel de Calcineurina A y B purificada, calmodulina, FKBP12, calcio, tampón a un pH definido, (posiblemente en un detergente para imitar el entorno de unión de la muestra) para formar los complejos para la calibración.

45 Los ejemplos que ilustran los diferentes componentes de los análisis para la determinación de los complejos formados con los fármacos inmunosupresores tacrólímo, sirólímo y ciclosporina A se presentan en la tabla de más abajo.

Fármaco	Proteína de Unión a Enzima	Diana Enzimática	Cofactores Requisito	Opciones de Anticuerpo de Superficie Sólida	Opciones de Anticuerpo Marcado
Tacrólimo	FKBP12	Calcineurina A	Calmodulina	Anti-FKBP12	Anti-FKBP12
		(CaN A)		Anti-CaN A	Anti-CaN A
			Calcio ²⁺	Anti-CaN B	Anti-CaN B
		Calcineurina B			
		(CaN B)			
Sirólímo	FKBP12	mTOR		Anti-FKBP12	Anti-FKBP12
				Anti-mTOR	Anti-mTOR
Ciclosporina A	ciclofilina	Calcineurina A	Calmodulina	Anti-CaN A	Anti-CaN A
		Calcineurina B	Calcio ²⁺	Anti-CaN B	Anti-CaN B
				Anti-Ciclofilina	Anti-Ciclofilina

5 Es importante recordar que el mismo anticuerpo no puede ser el anticuerpo marcado y de la superficie sólida puesto que se requieren dos epítomos únicos para anclar tanto la superficie sólida como los anticuerpos marcados al complejo inmunosupresor.

10 Se debe observar que el método descrito se puede poner en práctica utilizando medios manuales o automáticos. Mediante medios automáticos se quiere significar un dispositivo técnico diseñado para analizar y medir los componentes de los fluidos biológicos con "increased...."

15 Si bien la solicitud se ilustra en función de la detección de complejos inmunosupresores sanguíneos en sangre no sometida a tratamiento previo de pacientes que no están bajo terapia inmunosupresora, la presente invención se puede utilizar para medir cuánto complejo inmunosupresor de un fármaco inmunosupresor específico se forma en pacientes que ya han experimentado tratamiento con dicho fármaco. Además, la misma muestra de sangre se podría dividir y tratar una porción hasta una concentración de fármaco saturante para pronosticar cuánto complejo inmunosupresor puede formar potencialmente el paciente con los componentes intrínsecos, disponibles.

20 Esto es particularmente importante cuando un paciente que experimenta terapia no es capaz de lograr el efecto inmunosupresor deseado. La medición de la cantidad teóricamente máxima de complejos que se pueden formar ayudará a discriminar entre una dosificación insuficiente o la carencia de componentes sanguíneos específicos que formarán los complejos inmunitarios requeridos para producir una respuesta inmunosupresora.

25 Se pueden obtener muestras de sangre de un paciente que experimente terapia inmunosupresora con cualquiera de los fármacos tacrólimo, sirólímo o ciclosporina A como se ha descrito anteriormente. Parte de la muestra se incubará con un exceso del fármaco inmunosupresor que esté siendo utilizado en la terapia disuelto en la matriz apropiada y se determinarán los complejos como se ha descrito anteriormente, utilizando un anticuerpo específico unido a una superficie sólida, y un anticuerpo etiquetado a un marcador de detección. Una matriz apropiada para solubilizar estos fármacos hidrófobos incluiría disolventes orgánicos o tampones acuosos que contienen proteínas portadoras.

30 Esto permitirá que una fracción significativa de los componentes que no forman complejos disponibles actualmente, formen complejos que se van a medir como el "número máximo de complejos teórico". La otra parte de la muestra se incubará en la matriz apropiada sin el exceso del fármaco inmunosupresor que esté siendo utilizado en la matriz apropiada y los complejos se determinarán como se ha descrito anteriormente. Esto medirá los complejos formados durante la terapia (y ya presentes en la muestra de sangre del paciente) es decir, el "número total de complejos". El

35 análisis del "número máximo teórico de complejos" y las comparaciones con el "total número de complejos",

permitiría la determinación del "porcentaje de complejos máximos teóricos", individualizado para cada paciente. Se podría establecer un rango de beneficio terapéutico.

5 Los complejo se determinarían comparándolos con una curva de calibración y comparando las concentraciones derivadas de las calibraciones.

Se apreciará que este método se puede utilizar para seleccionar una cantidad adicional de fármaco inmunosupresor que se vaya a administrar a un paciente bajo tratamiento que tiene un efecto inmunosupresor insuficiente, donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A.

10 En otra realización de la presente invención el método descrito anteriormente se puede utilizar en pacientes que experimenten terapia dual con fármacos. Se debe apreciar que estos métodos y análisis podrían medir las cantidades proporcionales de complejo inmunosupresor formado por cada fármaco. Los complejos inmunitarios que contienen los dos fármacos de interés se podrían medir en análisis separados después del aislamiento del complejo descrito anteriormente. La medición de los dos tipos de complejos requeriría que el anticuerpo unido a la superficie sólida fuera uno de los dos fármacos que tienen en común. Después de la unión de las dos muestras a la superficie sólida y del lavado, se podrían añadir los anticuerpos marcados específicos y comparar los resultados con calibraciones separadas de cada tipo de complejo. Cuando se comparan con los calibradores preparados, se puede obtener una estimación proporcionada de los dos fármacos en la misma muestra.

20 La presente invención también abarca análisis diagnósticos basados en los métodos descritos anteriormente que se van a utilizar en sistemas automáticos. Esto superará la intensidad laboral y el coste de los análisis manuales, y al mismo tiempo permite analizar un gran número de muestras en un tiempo dado. Las superficies sólidas aplicables a los sistemas automáticos incluyen, pero no están limitadas a micropartículas. Los sistemas automáticos incluyen pero no están limitados a por ejemplo IMx® System, Architect i2000, y Architect i8000.

25 La solicitud también describe kits diagnósticos que comprenden anticuerpos dirigidos a cada enzima diana o proteína diana específicas para cada uno de los fármacos inmunosupresores descritos en la descripción, en cuyo kit, un anticuerpo se anclará a una superficie sólida y el otro anticuerpo se etiquetará con un marcador de detección.

30 La presente invención se ilustrará ahora por medio de ejemplos de los análisis para la determinación de un fármaco en particular o para dos o más fármacos administrados simultáneamente. No se debe considerar que los ejemplos imponen ninguna limitación al alcance de las reivindicaciones.

35 **Ejemplo I**

Análisis	Aislamiento de ligando	Anticuerpo de la Superficie Sólida	Complejo Aislado (ligando)	Anticuerpo Marcado
Tacrólímo (FK506)	Detergente tamponado y/o mezcla disolvente orgánica	anticuerpo anti-Calcineurina B (CnB)	Calcineurina/FK506/FKBP12	anticuerpo anti-FKBP12
Ciclosporina A (CsA)	Detergente tamponado y/o mezcla disolvente orgánica	anticuerpo anti-Calcineurina B	Calcineurina/CsA/Ciclofilina	anticuerpo anti-Ciclofilina
Sirólímo (rapamicina)	Detergente tamponado y/o mezcla disolvente orgánica	anticuerpo anti-mTOR	mTOR/rapamicina/FKBP 12	anticuerpo anti-FKBP 12

Ejemplo II

Combinación de Análisis	Aislamiento de ligando	Anticuerpo de la Superficie Sólida	Complejo aislado (ligando)	Anticuerpos Conjugados
Tacro & Sirólímo	detergente suave y/o mezcla disolvente orgánica	anticuerpo anti-FKPB12	FKBP 12/rapamicina/ mTOR y FKBP12/FK506/ Calcineurina	1) anticuerpo anti-mTOR 2) anticuerpo anti-Calcineurina B
Tacro y CsA	detergente suave y/o mezcla disolvente orgánica	anticuerpo anti-Calcineurina A o B	Calcineurina/FK506/ FKBP12 y Calcineurina/CsA/ Ciclofilina	1) anticuerpo anti-Ciclofilina 2) anti-FKBP12

5 La presente solicitud se refiere en primer lugar a una opción A que es un método para medir la cantidad de componentes del complejo inmunosupresor específico de un fármaco inmunosupresor, presente en una muestra de sangre de un paciente no tratado que necesite terapia inmunosupresora, que comprende las etapas de:

- 10 a) recoger la muestra de sangre;
 b) lisar las células sanguíneas de la muestra;
 c) añadir a las células sanguíneas lisadas un exceso del fármaco inmunosupresor para formar complejos inmunológicos específicos del fármaco;
 d) permitir que la mezcla de la etapa (c) se una a una superficie sólida conectada a un anticuerpo específico para uno de los componentes sanguíneos que forman dichos complejos;
 15 e) añadir a la mezcla de la etapa (d) un anticuerpo conjugado con un marcador de detección, donde el anticuerpo conjugado es específico para uno de dichos componentes sanguíneos que forman dichos complejos que no está anclado directamente a la superficie sólida; y
 f) medir la cantidad de dicho marcador de detección conjugado en la mezcla de la etapa (e), que será proporcional a la cantidad de componentes del complejo inmunosupresor presentes en dicha muestra de sangre.

20 Preferiblemente, en el método de la opción A, la sangre se recoge en un recipiente tratado con anticoagulante.

Más preferiblemente, en el método de la opción A, la sangre se recoge en un recipiente tratado con anticoagulante y el recipiente tratado con anticoagulante es un recipiente sin EDTA.

25 Preferiblemente, en el método de la opción A, los glóbulos rojos y las células inmunitarias se separan antes de lisar la muestra de sangre.

30 Preferiblemente, en el método de la opción A, las etapas (d), (e), y (f) del método se logran utilizando medios automáticos.

Más preferiblemente, en el método de la opción A, las etapas (d), (e), y (f) del método se logran utilizando medios automáticos, y la superficie sólida comprende micropartículas (opción B).

35 Más preferiblemente, en el método de la opción B, el fármaco inmunosupresor es el Tacrólimo.

Incluso más preferiblemente la opción C), en el método de la opción B, el fármaco inmunosupresor es el Tacrólimo y el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (d) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-Calcineurina A o B; el anticuerpo etiquetado con un marcador de la etapa (e) se selecciona del grupo del anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-Calcineurina A o B; y el marcador de detección de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo conjugado radiomarcado.

40 Más preferiblemente, en el método de la opción C, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpo anti-FKPB de ratón.

45 Más preferiblemente, en el método de la opción C, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpos anti-Calcineurina A o B de ratón.

Más preferiblemente, en el método de la opción B, el fármaco inmunosupresor es el sirólímo opción D).

5 Incluso más preferiblemente, en el método de la opción D, el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (d) se selecciona del grupo del anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-mTOR; el anticuerpo etiquetado con un marcador de la etapa (e) se selecciona del grupo del anticuerpo anti-FKPB12 y el anticuerpo anti-mTOR; y el marcador de detección de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo radiomarcado (opción E).

10 Más preferiblemente, en el método de la opción E, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpo anti-FKPB de ratón.

Más preferiblemente, en el método de la opción E, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpo anti-mTOR de ratón.

15 Más preferiblemente, en el método de la opción B, el fármaco inmunosupresor es la ciclosporina A (opción F).

20 Más preferiblemente, en el método de la opción F, el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (d) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina; el anticuerpo etiquetado con un marcador de la etapa (e) se selecciona del grupo del anticuerpo anti-ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina; y el marcador de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo radiomarcado (opción G)

25 Más preferiblemente, en el método de la opción G, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpo anti-ciclofilina de ratón.

Más preferiblemente, en el método de la opción G, el anticuerpo unido a las micropartículas comprende adicionalmente anticuerpo anti-ratón de cabra y anticuerpo anti-Calceneurina A o B de ratón.

30 La presente solicitud también se refiere al uso del método de la realización A para seleccionar el tipo terapéuticamente eficaz de fármaco inmunosupresor que se va a administrar a un paciente no tratado que lo necesite, donde dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A.

35 La presente solicitud también se refiere a una opción H que es un método de determinación en un sistema automático de la cantidad máxima de complejos inmunosupresores formados por un fármaco inmunosupresor específico, que es capaz de formar un paciente bajo terapia inmunosupresora con el fármaco, donde el método comprende las etapas de:

- 40 a) recoger la muestra de sangre;
- b) lisar las células sanguíneas de la muestra;
- c) dividir las células sanguíneas lisadas en alícuotas iguales en dos recipientes diferentes;
- d) añadir al segundo de los dos recipientes un volumen de la matriz apropiada con un exceso del fármaco inmunosupresor que esté siendo utilizado en el tratamiento del paciente;
- 45 e) añadir al primero de los dos recipientes el mismo volumen de la matriz apropiada como en el segundo recipiente sin fármaco inmunosupresor;
- f) dejar que los contenidos del primer y del segundo recipientes de las etapas (d) y (e) se unan a la superficie sólida etiquetada con anticuerpo específico de los componentes sanguíneos que formarán complejos con el fármaco inmunosupresor;
- 50 g) añadir a los contenidos de ambos recipientes de la etapa (f) un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección;
- h) medir la cantidad de marcador de detección para cada uno de los dos recipientes de la etapa (g), donde la cantidad de marcador de detección del primer recipiente es proporcional a los complejos reales totales formados con el fármaco inmunosupresor, y la cantidad de marcador de detección del segundo recipiente es proporcional a los complejos máximos teóricos que se pueden formar con el fármaco inmunosupresor en exceso; e
- 55 i) determinar la diferencia entre la cantidad de complejos reales totales formados en el primer recipiente con la cantidad de complejos máximos teóricos formados en el segundo recipiente, donde dicha diferencia representa el incremento potencial de la cantidad de complejos inmunosupresores que puede formar potencialmente el paciente bajo tratamiento con el fármaco inmunosupresor.

60 Preferiblemente, en el método de la opción H, la sangre se recoge en un recipiente tratado con anticoagulante.

Más preferiblemente, en el método de la opción H, la sangre se recoge en un recipiente tratado con anticoagulante y el recipiente tratado con anticoagulante es un recipiente sin EDTA.

Incluso más preferiblemente, en el método de la opción H, la sangre se recoge en un recipiente tratado con anticoagulante y el recipiente tratado con anticoagulante es un recipiente sin EDTA y los glóbulos rojos y las células inmunitarias se separan antes de lisar la muestra de sangre.

5 Más preferiblemente, en el método de la opción H, las etapas (d) a (i) se logran utilizando medios automáticos.

Incluso más preferiblemente, en el método de la opción H, las etapas (d) a (i) se logran utilizando medios automáticos y la superficie sólida comprende micropartículas opción I).

10 Más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es el tacrólimo.

Incluso más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es el tacrólimo y el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (f) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-Calceneurina; el anticuerpo etiquetado con el marcador de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-Calceneurina; y el marcador de la etapa (h) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo conjugado radiomarcado.

20 Más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es el sirólímo.

Incluso más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es el sirólímo y el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (f) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-mTOR; el anticuerpo conjugado con un marcador de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-mTOR; y el marcador de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo conjugado radiomarcado.

25 Más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es la Ciclosporina A.

30 Más preferiblemente, en el método de la opción I, dicho fármaco inmunosupresor es la Ciclosporina A y el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (f) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina A o B; el anticuerpo conjugado con un marcador de la etapa (h) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-Ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina; y el marcador de la etapa (h) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y anticuerpo conjugado radiomarcado.

35 La presente solicitud se refiere adicionalmente al uso del método de la realización H para seleccionar la cantidad adicional de fármaco inmunosupresor que se va a administrar a un paciente bajo tratamiento, que tiene un efecto inmunosupresor insuficiente, donde dicho fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A.

40 La presente solicitud se refiere adicionalmente a una opción J que es un método de medición de las proporciones relativas de los complejos formados por dos fármacos inmunosupresores en un sistema automático, en una muestra de sangre de un paciente que recibe tratamiento dual, donde el método comprende las etapas de:

- 45
- a) recoger la muestra de sangre;
 - b) lisar las células de la muestra de sangre;
 - c) dividir las células lisadas en alícuotas iguales en dos recipientes diferentes;
 - 50 d) dejar que los contenidos de la etapa c) se unan a una superficie sólida etiquetada con anticuerpo selectivo para los componentes sanguíneos que son diferentes para los dos fármacos inmunosupresores;
 - e) añadir al primer recipiente un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para el complejo inmunitario que esté siendo medido, donde el anticuerpo es diferente del anticuerpo unido a la superficie sólida;
 - 55 f) añadir al segundo recipiente un anticuerpo etiquetado con un marcador, específico para el complejo inmunitario que esté siendo medido, donde el anticuerpo es diferente del anticuerpo unido a la superficie sólida; y
 - g) comparar las cantidades del marcador de detección en el primer recipiente y el segundo recipiente con patrones de calibración apropiados para obtener las proporciones relativas de los complejos formados por cada uno de los fármacos inmunosupresores utilizado en el tratamiento dual.

60 Preferiblemente, en el método de la opción J, dichos dos fármacos inmunosupresores se seleccionan de un grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A (opción K).

Más preferiblemente, en el método de la opción K la superficie sólida comprende micropartículas.

La presente solicitud se refiere adicionalmente al uso del método de la opción K para determinar el complejo, y la cantidad del mismo, de cada uno de los dos fármacos utilizados en el tratamiento dual.

5 La presente solicitud se refiere adicionalmente a un análisis diagnóstico basado en el método de la opción B donde el fármaco inmunosupresor es el tacrólimo que es compatible con un sistema automático.

La presente solicitud se refiere adicionalmente a un análisis diagnóstico basado en el método de la opción D compatible con un sistema automático.

10 La presente solicitud se refiere adicionalmente a un análisis diagnóstico basado en el método de opción F compatible con un sistema automático.

15 La presente solicitud se refiere adicionalmente a un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para KFBP12 y un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para la calcineurina, un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para KFBP12 y un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para mTOR, un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para la calcineurina y un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para FKBP12, un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para mTOR y un anticuerpo etiquetado con un
20 marcador de detección específico para FKBP12, un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para la ciclofilina y un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para la calcineurina, o un kit que comprende un anticuerpo unido a una superficie sólida donde el anticuerpo es específico para la calcineurina y un anticuerpo etiquetado con un marcador de detección específico para la ciclofilina.

25 Preferiblemente, en cualquiera de dichos kits el reactivo de detección se selecciona del grupo que consiste en acridinio, fosfatasa alcalina, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína y anticuerpo conjugado radiomarcado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de determinación en un sistema automático de la cantidad máxima de complejos inmunosupresores, que comprenden un fármaco inmunosupresor, un componente sanguíneo proteína de unión, y un componente sanguíneo proteína diana, que pueden ser formados potencialmente por un fármaco inmunosupresor en un paciente que experimente terapia inmunosupresora con el fármaco, donde el método comprende las etapas de:
- 10 a) lisar una muestra de sangre obtenida del paciente para obtener componentes sanguíneos;
 b) dividir la muestra lisada de sangre que contiene los componentes sanguíneos en primeras y segundas alícuotas iguales y colocar la primera alícuota en un primer recipiente y la segunda alícuota en un segundo recipiente;
 c) añadir al segundo recipiente un volumen de matriz y un exceso del fármaco inmunosupresor que se esté utilizando en la terapia inmunosupresora del paciente;
 15 d) añadir al primer recipiente el mismo volumen de matriz que se añadió al segundo recipiente en (c) sin añadir un exceso del fármaco inmunosupresor;
 e) poner en contacto separadamente los contenidos del primer recipiente de la etapa (d) y del segundo recipiente de la etapa (c) con una superficie sólida igual etiquetada con un primer anticuerpo, que es específico para un componente sanguíneo del complejo inmunosupresor con el fármaco inmunosupresor, después de lo cual el complejo inmunosupresor se une mediante el primer anticuerpo sobre la superficie
 20 sólida;
 f) lavar cada uno de ambos recipientes para eliminar los componentes que no han reaccionado y los interferentes,
 g) poner en contacto la superficie sólida con un segundo anticuerpo, que está marcado con un marcador de detección y que es específico para otro componente sanguíneo del complejo inmunosupresor con el fármaco inmunosupresor, después de lo cual el complejo inmunosupresor se une mediante el segundo
 25 anticuerpo;
 h) medir (i') la cantidad de marcador de detección sobre el segundo anticuerpo, que se une al complejo inmunosupresor del primer recipiente que se une mediante el primer anticuerpo, y (ii') la cantidad de marcador de detección sobre el segundo anticuerpo, que se une al complejo inmunosupresor del segundo
 30 recipiente que se había unido mediante el primer anticuerpo, donde (i') es proporcional a los complejos inmunosupresores reales totales formados con el fármaco inmunosupresor, y (ii') es proporcional a los complejos inmunosupresores máximos teóricos que se pueden formar con el fármaco inmunosupresor en exceso; e
 35 i) determinar la diferencia entre la cantidad de complejos inmunosupresores reales totales formados y la cantidad de complejos inmunosupresores máximos teóricos formados, donde la diferencia representa el incremento de la cantidad de complejos inmunosupresores que se pueden formar potencialmente en el paciente que experimenta terapia inmunosupresora con el fármaco inmunosupresor.
- 40 2. El método de la reivindicación 1, donde la muestra de sangre se recogió en un recipiente tratado con anticoagulante.
3. El método de la reivindicación 2, donde el recipiente tratado con anticoagulante es un recipiente sin EDTA.
- 45 4. El método de la reivindicación 3, donde los glóbulos rojos y las células inmunitarias se separan antes de lisar la muestra de sangre.
5. El método de la reivindicación 1, donde las etapas (c) a (i) se logran utilizando medios automáticos.
- 50 6. El método de la reivindicación 5, donde la superficie sólida comprende micropartículas.
7. El método de la reivindicación 6, donde dicho fármaco inmunosupresor es el tacrólimo.
8. El método de la reivindicación 7, donde el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKBP 12 y anticuerpo anti-Calceneurina A o B; el anticuerpo marcado con un
 55 marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-Calceneurina A o B; y el marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y una radiomarca.
- 60 9. El método de la reivindicación 6, donde dicho fármaco inmunosupresor es el sirólimo.
10. El método de la reivindicación 9 donde, el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-mTOR; el anticuerpo marcado con un marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-FKPB12 y anticuerpo anti-

mTOR; y el marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y una radiomarca.

5 11. El método de la reivindicación 6, donde dicho fármaco inmunosupresor es la Ciclosporina A.

10 12. El método de la reivindicación 11, donde el anticuerpo unido a las micropartículas de la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina A o B; el anticuerpo marcado con a marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo anti-Ciclofilina y anticuerpo anti-Calceneurina A o B; y el marcador de detección de la etapa (g) se selecciona del grupo que consiste en acridinio, luminol, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína, fosfatasa alcalina y una radiomarca.

15 13. El uso de un método de acuerdo con la reivindicación 1 para seleccionar una cantidad adicional de fármaco inmunosupresor que se va a administrar a un paciente bajo tratamiento, que tiene un efecto inmunosupresor insuficiente, donde dicho fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A.

20 14. Un método de para medir en un sistema automático las proporciones relativas de complejos inmunosupresores, que comprenden un fármaco inmunosupresor, un componente sanguíneo proteína de unión, y un componente sanguíneo proteína diana, formados por un primer fármaco inmunosupresor y un segundo fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre de un paciente que recibe tratamiento dual con fármacos inmunosupresores, donde el método comprende las etapas de:

a) lisar una muestra de sangre del paciente para obtener componentes sanguíneos;

25 b) dividir la muestra de sangre lisada que contiene los componentes sanguíneos en primeras y segundas alícuotas iguales y colocar la primera alícuota en un primer recipiente y la segunda alícuota en un segundo recipiente;

30 c) poner en contacto separadamente los contenidos del primer recipiente de la etapa (b) con una superficie sólida etiquetada con un primer anticuerpo, que es específica para un componente sanguíneo en el complejo inmunosupresor con el primer fármaco inmunosupresor, y los contenidos del segundo recipiente de la etapa (b) con una superficie sólida etiquetada con un segundo anticuerpo, que es específico para un componente sanguíneo en el complejo inmunosupresor con el segundo fármaco inmunosupresor;

d) lavar cada uno de ambos recipientes para eliminar los componentes que no han reaccionado y los interferentes;

35 e) añadir al primer recipiente un tercer anticuerpo, que está marcado con un marcador de detección y que es específico para el complejo inmunosupresor que está siendo medido, donde el tercer anticuerpo es diferente del primer anticuerpo y es específico para otro componente sanguíneo del complejo inmunosupresor con el fármaco inmunosupresor;

40 f) añadir al segundo recipiente un cuarto anticuerpo, que está marcado con un marcador de detección y que es específico para el complejo inmunosupresor que está siendo marcado, donde el cuarto anticuerpo es diferente del segundo anticuerpo y es específico para otro componente sanguíneo del complejo inmunosupresor con el fármaco inmunosupresor; y

45 g) comparar las cantidades del marcador de detección en el primer recipiente y el segundo recipiente con patrones de calibración apropiados para obtener las proporciones relativas de los complejos inmunosupresores formados por cada uno de los fármacos inmunosupresores utilizados en el tratamiento dual.

50 15. El método de la reivindicación 14, donde el primer y segundo fármacos inmunosupresores se seleccionan del grupo que consiste en tacrólimo, sirólímo y ciclosporina A.

16. El método de la reivindicación 15, donde la superficie sólida comprende micropartículas.

17. El uso del método de acuerdo con la reivindicación 15 para determinar el complejo inmunosupresor, y la cantidad del mismo, de cada uno de los dos fármacos inmunosupresores utilizados en el tratamiento dual.