(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 135**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07869499 .9**
(96) Fecha de presentación: **19.12.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2118656**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

(54) Título: **Ensayo mejorado para fármacos inmunosupresores**

(30) Prioridad:

29.12.2006 US 882863 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

(73) Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (33.3%)
D-377, BLDG AP6A-1, 100 ABBOTT PARK ROAD, ABBOTT PARK, IL 60064, US;
DRENGLER, SUSAN M. (33.3%) y
BAUGHER, BENNETT WADE (33.3%)

(72) Inventor/es:

DRENGLER, SUSAN, M. y
BAUGHER, BENNETT, WADE

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 393 135 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo mejorado para fármacos inmunosupresores

Campo técnico

Esta invención se relaciona con inmunoensayos diagnósticos para determinar los niveles de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, y en particular se relaciona con el uso de condiciones de alto contenido en sal para mejorar la sensibilidad del ensayo.

Antecedentes

Fármacos inmunosupresores tales como el tacrolimus, el everolimus, el temsorolimus y la ciclosporina son efectivos para el tratamiento del rechazo de órganos o tejidos tras una cirugía de trasplante, de la enfermedad del injerto frente al huésped y de las enfermedades autoinmunes en humanos. Durante la terapia con fármacos inmunosupresores, la monitorización de los niveles de concentración en sangre del inmunosupresor es un aspecto importante de la atención clínica, ya que niveles insuficientes de fármaco dan lugar a rechazo del injerto (órgano o tejido) y niveles excesivos dan lugar a efectos colaterales y toxicidades no deseados. Se miden, por lo tanto, los niveles en sangre de inmunosupresor para poder ajustar las dosificaciones del fármaco y mantener el nivel del fármaco a la concentración apropiada. Los ensayos diagnósticos para la determinación de los niveles en sangre de inmunosupresores han encontrado, por lo tanto, un amplio uso clínico.

Un formato competitivo habitualmente usado implica la unión de un primer anticuerpo al inmunosupresor y la unión del inmunosupresor marcado (v.g., acridinio-tacrolimus) al resto de los sitios de unión al anticuerpo libres, seguido de cuantificación por detección del marcaje.

Resumen

La invención proporciona un método de valoración de la presencia o concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo. El método conlleva el contacto de una muestra de ensayo o un extracto de muestra de ensayo con un anticuerpo específico para un fármaco inmunosupresor en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente, para formar una mezcla de ensayo. Dichas condiciones incluyen una concentración salina superior a aproximadamente 0,4 M. Se detecta entonces la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor. En realizaciones particulares, el fármaco inmunosupresor es el tacrolimus, el everolimus, el zotarolimus, la ciclosporina o un análogo de cualquiera de estos compuestos. En realizaciones preferidas, se trata del tacrolimus o de la ciclosporina. Convenientemente, la muestra de ensayo incluye una muestra de sangre humana.

En determinadas realizaciones, el inmunoensayo es llevado a cabo en presencia de una sal a una concentración inferior o igual a aproximadamente 4,0 M, v.g., a una concentración de aproximadamente 2,0 M. En realizaciones particulares, la sal incluye un anión monovalente, tal como el cloruro. En realizaciones ejemplares, la sal incluye una sal cloruro de un metal alcalino, tal como el cloruro de sodio.

La mezcla de ensayo puede adicionalmente incluir un glicol, tal como el etilenglicol, el propilenglicol o un análogo de éstos, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos. Como alcoholes adecuados, se incluyen, por ejemplo, metanol, etanol y propanol. La razón de glicol a alcohol en la mezcla de ensayo puede ser de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, o más particularmente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

Otro aspecto de la invención es un kit de ensayo, que incluye: (a) al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor; (b) un diluyente de ensayo que incluye una sal a una concentración de al menos aproximadamente 1,0 M; y (c) un reactivo de lisis que incluye: un glicol seleccionado entre etilenglicol, propilenglicol y un análogo de éstos, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos. En realizaciones particulares, el fármaco inmunosupresor es el tacrolimus, el everolimus, el zotarolimus, la ciclosporina o un análogo de cualquiera de estos compuestos. En realizaciones preferidas, se trata de tacrolimus o de ciclosporina.

En determinadas realizaciones, la concentración de sal en el diluyente de ensayo es inferior o igual a aproximadamente 10,0 M, v.g., aproximadamente 4,5 M. En realizaciones particulares, la sal incluye un anión monovalente, tal como el cloruro. En realizaciones ejemplares, la sal incluye una sal cloruro de un metal alcalino, tal como el cloruro de sodio.

El kit de ensayo puede contener también una composición control que incluya el al menos un fármaco inmunosupresor reconocido por el anticuerpo proporcionado en el kit.

El alcohol del reactivo de lisis puede incluir, por ejemplo, metanol, etanol y/o propanol. La razón de glicol a alcohol en el reactivo de lisis puede ser de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, o más particularmente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

En una realización ejemplar, el kit de ensayo de la invención incluye: (a) al menos un anticuerpo o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus y ciclosporina; (b) un diluyente de ensayo que incluye una sal a una concentración de al menos aproximadamente 1,0 M; y (c) un reactivo de lisis consistente en: (i) propilenglicol y etanol en una proporción de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, y (ii) una composición control que incluye el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) realizado con diferentes concentraciones de NaCl en la reacción. Abscisa: cantidad de tacrolimus (ng/ml). Ordenada: señal (unidades de luz relativas o ULR). Símbolos: (rombo macizo), NaCl 0 M; (triángulo macizo), NaCl 1 M; (cuadrado macizo), NaCl 2 M.

La Figura 2 es un gráfico obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) realizado con diferentes concentraciones de NaCl en la reacción. Abscisa: cantidad de tacrolimus (ng/ml). Ordenada: X/A. Símbolos: (rombo macizo), NaCl 0 M; (triángulo macizo), NaCl 1 M; (cuadrado macizo), NaCl 2 M. Puede verse que la forma de la curva mejoró (menor B/A) aumentando las concentraciones de NaCl en la reacción.

La Figura 3 es un gráfico obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus II IMx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) en el que se estudiaron los índices de calibradores de matriz en sangre con diferentes concentraciones de NaCl presentes en las micropartículas. Abscisa: cantidad de tacrolimus (ng/ml). Ordenada: Velocidad. Símbolos: (rombo macizo), NaCl 1 M; (cuadrado macizo), NaCl 2 M; (círculo hueco), ensayo comercializado de Tacrolimus II IMx® sin adición de sal.

La Figura 4 es un gráfico obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus II IMx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Abscisa: cantidad de tacrolimus (ng/ml). Ordenada: X/A. Símbolos: (rombo macizo), NaCl 0 M; (cuadrado macizo), NaCl 2 M; (círculo hueco), ensayo comercializado de Tacrolimus II IMx® sin adición de sal. Puede verse que la forma de la curva mejoró (menor B/A) con una concentración de NaCl 2 M en las micropartículas.

La Figura 5 es un gráfico de barras obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y una variedad de sales diferentes a 0,44 M en cada reacción. Abscisa: sin sal, cloruro de litio (LiCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de rubidio (RbCl), cloruro de cesio (CsCl). Ordenada: señal (ULR). Símbolos: (barra gris), 0 ng/ml de tacrolimus; (barra negra), 3 ng/ml de tacrolimus; (barra hueca), 30 ng/ml de tacrolimus. Se observó un efecto mínimo de la variación de los metales alcalinos en la reacción.

La Figura 6 es un gráfico de barras obtenido utilizando un Ensayo de Tacrolimus ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y una variedad de sales de sodio (aniones variables) a 0,44 M en cada reacción. Abscisa: sin sal, fluoruro de sodio (NaF), cloruro de sodio (NaCl), bromuro de sodio (NaBr), tiocianato de sodio (NaSCN), acetato de sodio (NaOAc); citrato de sodio (Na_2Citrato); bisulfato de sodio ($NaHSO_4$). Ordenada: señal (ULR). Símbolos: (barra gris), 0 ng/ml de tacrolimus; (barra negra), 3 ng/ml de tacrolimus; (barra hueca), 30 ng/ml de tacrolimus. Puede verse que los aniones cloruro y acetato producían la mayor unión de indicador (ULR).

Descripción detallada

La invención se relaciona con inmunoensayos para fármacos inmunosupresores que son llevados a cabo en condiciones de alto contenido en sal para mejorar la sensibilidad del ensayo. Esta mejora no es atribuible a una disminución en la unión no específica. Más bien, se cree que el alto contenido en sal aumenta la interacción fármaco-anticuerpo.

Definiciones

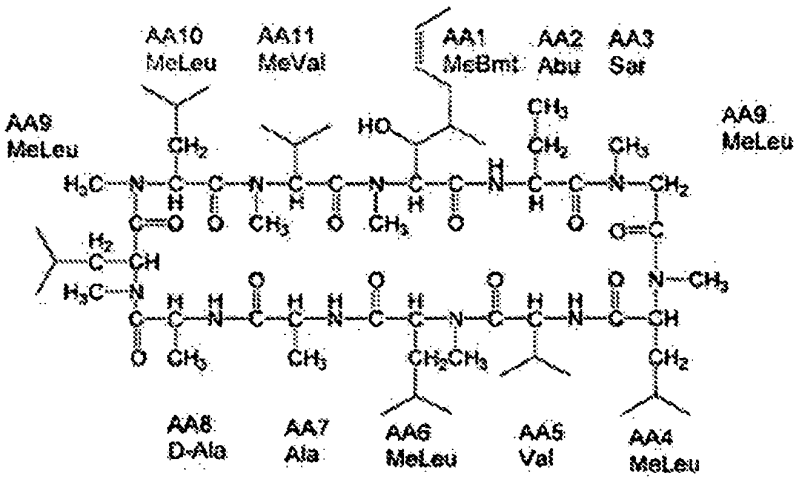
Los términos utilizados en las reivindicaciones y en la descripción se definen como se expone a continuación, a menos que se especifique de otro modo.

Un "fármaco inmunosupresor" o "inmunosupresor", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto terapéutico, ya sea basado en una molécula pequeña o en un anticuerpo, que tiene una estructura química idéntica o similar al tacrolimus o a la ciclosporina, también conocida como ciclosporina A. Se considera aquí como inmunosupresor cualquier análogo conocido o a partir de aquí desarrollado del tacrolimus o de la ciclosporina. Como

inmunosupresores preferidos, se incluyen tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ciclosporina. El tacrolimus y la ciclosporina son inhibidores de la calcineurina que suprimen la activación precoz de los linfocitos T del sistema inmune por inhibición de citoquinas, tales como la interleuquina 2. Por el contrario, el objetivo primario del everolimus y del zotarolimus es el objetivo de la rapamicina de mamíferos (mTOR), una proteína reguladora del ciclo celular específica. La inhibición de mTOR da lugar a supresión de la proliferación de linfocitos T dirigida por citoquinas.

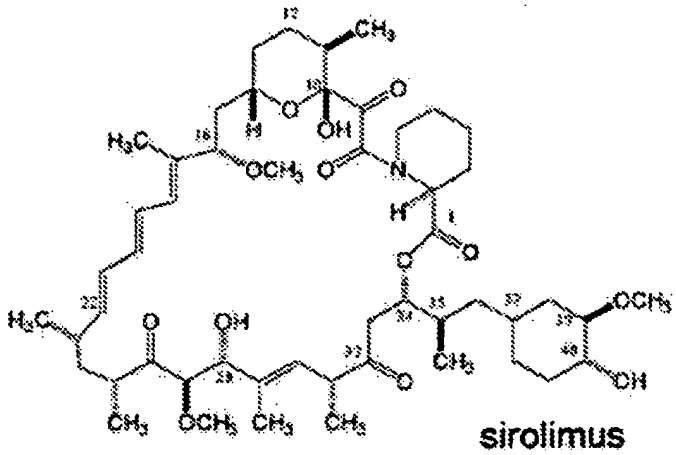
La fórmula química de la ciclosporina está en la Fórmula A. La fórmula química del sirolimus (rapamicina) está en la Fórmula B. La fórmula química de la diferencia estructural del everolimus (RAD) con respecto al sirolimus está en la Fórmula C.

A



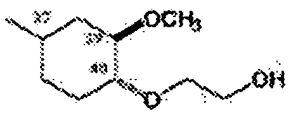
ciclosporina

B



sirolimus

C



RAD

Se han preparado numerosos derivados o análogos de la ciclosporina. La invención comprende ensayos y kits de ensayo para la ciclosporina o cualquiera de sus análogos.

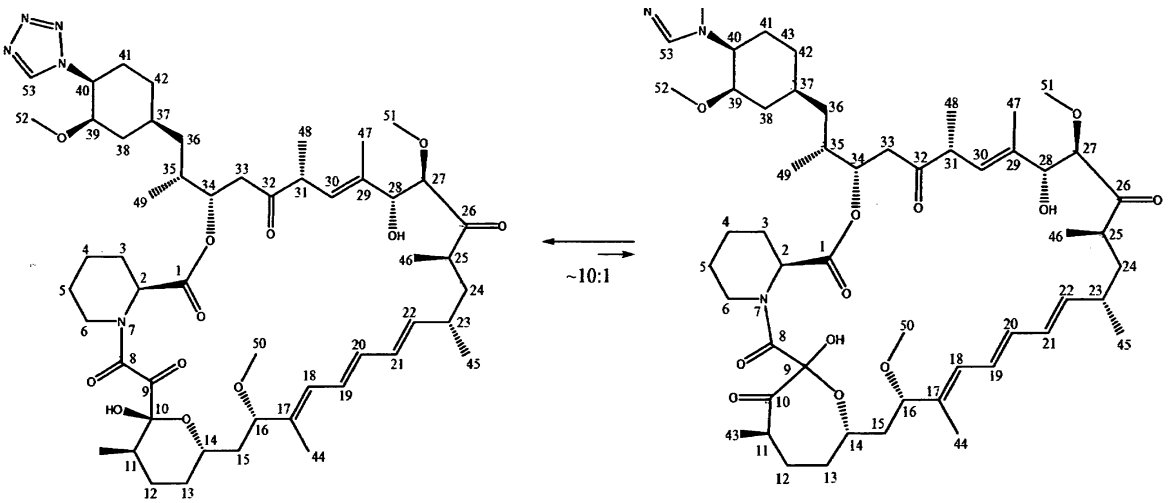
El tacrolimus, también conocido como FK-506, fue aislado de una cepa de *S. tsukubaensis*. La fórmula química del FK-506 está publicada en la Patente Europea EP 0.293.892 B1. Como análogos del FK-506, se incluyen los productos naturales relacionados FR-900520 y FR-900523, que difieren del FK-506 por su substituyente alquilo en

C-21 y fueron aislados de *S. hygroscopicus yakusshimnaensis*. Otro análogo, FR-900525, producido por *S. tsukubaensis*, difiere del FK-506 por la substitución de un resto de ácido pipecólico con un grupo prolina. La invención comprende ensayos y kits de ensayo para FK-506 o cualquiera de sus análogos.

ABT-578 [40-epi(1-tetrazolil)rapamicina], mejor conocido actualmente como zotarolimus, es un antibiótico triénico macrólido semisintético derivado de la rapamicina. La estructura del zotarolimus es mostrada en la Fórmula D.

Fórmula D

Los isómeros del zotarolimus



Pirano 1 (isómero N-1)

Oxepán 2

(Ia) (Ib)

El término "muestra de ensayo" se refiere a un componente, tejido o fluido del cuerpo de un animal que es la fuente del analito del fármaco inmunosupresor. Estos componentes, tejidos y fluidos incluyen fluidos corporales humanos y animales, tales como sangre entera, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cerebrospinal, orina, líquidos linfáticos y diversas secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células blancas de la sangre, mielomas y similares; fluidos biológicos, tales como sobrenadantes de cultivos celulares; especímenes de tejidos fijados; y especímenes de células fijados. Preferiblemente, la muestra de ensayo es una muestra de sangre periférica humana. El término "muestra de ensayo" incluye muestras de ensayo a las que se han añadido uno o más reactivos, tales como, v.g., un reactivo de lisis.

El término "extracto de muestra de ensayo" se refiere a una muestra de ensayo en la que se han separado uno o más componentes de uno o más componentes adicionales. En los extractos de muestras de ensayo según la invención, se ha separado el fármaco inmunosupresor de una o más proteínas portadoras.

Tal como se utiliza aquí, un "anticuerpo" se refiere a una proteína consistente en uno o más polipéptidos substancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Este término abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, así como moléculas obtenidas por ingeniería a partir de secuencias de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como genes de las regiones variables de inmunoglobulinas miríada. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos primariamente responsables del

reconocimiento antigénico. Los términos "cadena ligera variable (VL)" y "cadena pesada variable (VH)" hacen referencia a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de las uniones disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab')2, un dímero de Fab que es a su vez una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab')2 puede reducirse en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo así el dímero (Fab')2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden ser sintetizados *de novo* químicamente o utilizando metodología del ADN recombinante.

Así, el término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, incluye también fragmentos de anticuerpo producidos por modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* empleando metodologías de ADN recombinante. Como anticuerpos preferidos, se incluyen anticuerpos de una sola cadena (anticuerpos que existen como una sola cadena polipeptídica), más preferiblemente anticuerpos Fv de una sola cadena (sFv o scFv), en donde una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de una sola cadena es un heterodímero VH-VL covalentemente unido que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de VH y VL unidas directamente o unidas por un conector codificante de péptido (Huston et al. (1988), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883). Aunque la VH y la VL se conectan cada una como una sola cadena polipeptídica, los dominios VH y VL se asocian de manera no covalente. Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada naturalmente agregadas, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional substancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno, como es sabido por los expertos en la técnica (véanse, v.g., las Patentes EE.UU. Nº 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778).

"Analito", tal como se utiliza aquí, se refiere a la substancia que se ha de detectar, que puede ser sospechosa de estar presente en la muestra de ensayo. El analito puede ser cualquier substancia para la cual exista un compañero de unión específica natural o para la cual se pueda preparar un compañero de unión específica. Así, un analito es una substancia que puede unirse a uno o más compañeros de unión específica en un ensayo.

Un "compañero de unión", tal como se utiliza aquí, es un miembro de un par de unión, es decir, un par de moléculas donde una de las moléculas se une a la segunda molécula. Los compañeros de unión que se unen específicamente se denominan "compañeros de unión específica". Además de los compañeros de unión antígeno y anticuerpo comúnmente utilizados en inmunoensayos, otros compañeros de unión específica pueden incluir biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas y similares y similares. Como compañeros de unión específica inmunorreactivos, se incluyen antígenos, fragmentos de antígenos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, y complejos de los mismos, incluyendo los formados por métodos de ADN recombinante.

El término "unión específica" se define aquí como la unión preferente de compañeros de unión a otros (v.g., dos polipéptidos, una molécula de polipéptido y una de ácido nucleico o dos moléculas de ácido nucleico) en sitios específicos. El término "se une específicamente" indica que la preferencia de unión (v.g., la afinidad) por la molécula/secuencia diana es al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces y más preferiblemente al menos 10 ó 20 veces mayor que por una molécula diana no específica (v.g., una molécula generada aleatoriamente que carece del (de los) sitio(s) específicamente reconocido(s)).

Se dice que un anticuerpo que se une específicamente a un fármaco inmunosupresor es "específico para" ese fármaco inmunosupresor.

El término "agente de captura" es aquí utilizado para hacer referencia a un compañero de unión que se une a un analito, preferiblemente de manera específica. Los agentes de captura pueden unirse a una fase sólida. Tal como se usa aquí, la unión de un agente de captura fijado a una fase sólida a un analito forma un "complejo fijado a una fase sólida."

El término "agente de detección marcado" es aquí utilizado para hacer referencia a un compañero de unión que se une a un analito, preferiblemente de manera específica, y se marca con un marcaje detectable o resulta marcado con un marcaje detectable durante su uso en un ensayo.

Un "marcaje detectable" incluye un resto que es detectable o que puede hacerse detectable.

Tal como se utiliza en relación a un agente detección marcado, un "marcaje directo" es un marcaje detectable que se une, por cualquier medio, al agente de detección.

Tal como se utiliza en relación a un agente de detección marcado, un "marcaje indirecto" es un marcaje detectable que se une específicamente al agente de detección. Así, un marcaje indirecto incluye un resto que es el compañero de unión específica de un resto del agente de detección. La biotina y la avidina son ejemplos de dichos restos que se emplean, por ejemplo, por contacto de un anticuerpo biotinilado con avidina marcada para producir un anticuerpo indirectamente marcado.

Tal como se utiliza aquí, el término "reactivo indicador" se refiere a cualquier agente que se pone en contacto con un marcaje para producir una señal detectable. Así, por ejemplo, en el marcaje enzimático convencional, se puede poner en contacto un anticuerpo marcado con una enzima con un substrato (el reactivo indicador) para producir una señal detectable, tal como un producto de reacción coloreado.

Tal como se utiliza aquí, un "análogo de glicol" es cualquier glicol que tenga de dos a seis átomos de carbono.

I. Recogida y procesado de muestras

Los métodos de ensayo de la invención son generalmente llevados a cabo sobre muestras de ensayo derivadas de un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un humano.

Los métodos de la invención pueden ser llevados a cabo empleando cualquier muestra que pueda contener el fármaco inmunosupresor. Como muestras convenientes, se incluye, por ejemplo, sangre, suero y plasma.

En realizaciones particulares, se separa típicamente el inmunosupresor de los otros componentes de la muestra. El grueso del fármaco inmunosupresor en la muestra está presente en un complejo con diversas moléculas "portadoras", tales como proteínas de unión. El tacrolimus y la ciclosporina se encuentran predominantemente en los eritrocitos de las muestras de pacientes y se asocian con proteínas de unión específica, FKBP para el tacrolimus y ciclofilina para la ciclosporina. Para asegurar una medición precisa de la concentración total de fármaco en la muestra, se libera el fármaco unido a las proteínas de unión preferiblemente antes de la cuantificación.

La separación de los fármacos inmunosupresores con respecto a sus proteínas de unión en la sangre puede ser realizada por tratamiento con solventes orgánicos, tales como acetonitrilo, metanol o éter dietílico. Estos solventes desnaturalizan las proteínas de unión y liberan el fármaco. Se ha empleado típicamente metanol para extraer tacrolimus o ciclosporina de especímenes de sangre antes del inmunoensayo. La concentración de metanol es generalmente suficiente para liberar el fármaco de la proteína de unión, pero no tan grande como para interferir con el inmunoensayo posterior.

En determinadas realizaciones, se pueden separar los fármacos inmunosupresores utilizando una composición de reactivo de extracción que da un extracto de muestra compatible con los componentes del inmunoensayo y que tiene una baja presión de vapor. Una baja presión de vapor (v.g., inferior a la del agua) es ventajosa para reducir la evaporación del extracto que contiene el inmunosupresor, que puede producir imprecisión en la medición de la concentración del fármaco. Esta composición de reactivo de extracción está descrita en la solicitud copendiente de propiedad común Solicitud No Provisional EE.UU. Número de Serie 11/490.624, depositada el 21 de Julio de 2006. Brevemente, la composición de reactivo de extracción incluye sulfóxido de dimetilo (DMSO), al menos una sal de metal divalente y agua. En realizaciones particulares, la composición de reactivo de extracción incluye DMSO y al menos uno de sulfato de zinc, acetato de zinc, citrato de zinc, cloruro de zinc, sulfato de cadmio, sulfato de cobre y mezclas de dos o más de estas sales metálicas. Una composición de reactivo de extracción más preferida incluye DMSO, la sal metálica y al menos un glicol de dos a seis átomos de carbono, que es preferiblemente al menos uno de etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) o mezclas de EG y PG.

La concentración de DMSO, cuando se usa sin EG o PG, en la composición de reactivo de extracción es de al menos el 50%, y preferiblemente de al menos el 80%, y hasta aproximadamente el 95% en volumen de la composición de reactivo de extracción. La concentración de la sal metálica es de al menos 5 mM, y se pueden usar concentraciones de hasta 400 mM. Un rango preferido de concentración para la sal de zinc es 30-75 mM. La utilización de altas concentraciones de sal, por ejemplo superiores a aproximadamente 75 mM, puede requerir el uso de un compuesto quelante, tal como el ácido etilendiaminotetraacético, en una etapa de ensayo posterior para eliminar el exceso de metal. Las composiciones de reactivo de extracción son preparadas por cualquier método de mezcla adecuado para mezclar suficientemente el DMSO con agua y disolver la sal metálica.

Cuando se incluye EG o PG en la composición de reactivo de extracción, concentraciones inferiores de DMSO son

más efectivas. En dichas composiciones, el EG, el PG o sus mezclas están presentes en una concentración de al menos el 18%, y preferiblemente de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 33%, en volumen de la composición de reactivo de extracción, y el DMSO está presente en una concentración de al menos el 50% en volumen de la composición de reactivo de extracción.

Se forma el extracto de muestra por cualquier técnica de mezcla a cualquier temperatura deseable para poner en contacto cualquier cantidad seleccionada de la muestra con la composición de reactivo de extracción. Por ejemplo, se pueden mezclar de aproximadamente 100 μl a aproximadamente 600 μl de muestra de sangre con de aproximadamente 200 μl a aproximadamente 1.200 μl de la composición de reactivo de extracción durante hasta aproximadamente cinco minutos. En determinadas realizaciones, se realiza la extracción del inmunosupresor mezclando 150 μl de muestra de sangre con 300 μl de composición y agitando en vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. En variaciones de dichas realizaciones, se puede llevar a cabo la extracción calentando la mezcla hasta una temperatura por encima de la temperatura ambiente, de aproximadamente 30 grados centígrados a aproximadamente 50 grados centígrados durante de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente sesenta minutos. Después de mezclar, se centrifuga la suspensión resultante durante un tiempo adecuado a una velocidad de revoluciones adecuada para producir una fase de sobrenadante y una fase de precipitado. Por ejemplo, se puede centrifugar la mezcla a 13.000 rpm durante 5 minutos para obtener una pella del precipitado. Tras la centrifugación, se separa el sobrenadante utilizando cualquier método adecuado. Se estudia entonces el sobrenadante en cuanto al inmunosupresor utilizando un inmunoensayo según la invención.

En otras realizaciones, se pueden separar fármacos inmunosupresores utilizando un reactivo de lisis, preferiblemente seguido de un agente adicional que libera el fármaco de cualquier proteína de unión asociada. Un ejemplo de reactivo de lisis incluye un glicol de dos a seis átomos de carbono. Se incluye al menos un alcohol de cinco o menos carbonos en el reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis. Como glicoles adecuados para uso en el reactivo de lisis, se incluyen, por ejemplo, EG, PG y sus análogos, así como mezclas de dichos glicoles. Como alcoholes adecuados para uso en la invención, se incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, propanol y sus mezclas. En realizaciones particulares, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, de 4:1 a aproximadamente 1:4, de 2:1 a aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1 (volumen:volumen). En realizaciones más particulares, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

Se puede formar la mezcla de lisis por cualquier técnica de mezcla a cualquier temperatura deseable para poner en contacto cualquier cantidad seleccionada de la muestra con el reactivo de lisis. Se pone en contacto la muestra con un volumen suficiente de reactivo de lisis para lisar las células de la muestra y producir una mezcla homogénea. Para un reactivo de lisis donde la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, como se ha descrito anteriormente, se puede añadir la muestra al reactivo de lisis en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5 o aproximadamente 1:10, v.g., aproximadamente 1:1 (volumen:volumen), o cualquier otro rango que incluya estos valores como puntos finales, dependiendo de la composición del reactivo de lisis. En realizaciones preferidas, la lisis se completa en menos de un minuto a temperatura ambiente.

Cuando se emplea un reactivo de lisis, se puede liberar el fármaco inmunosupresor de la(s) proteína(s) de unión utilizando, por ejemplo, un agente liberador que compita con el fármaco por la unión a la(s) proteína(s) de unión. El agente es generalmente seleccionado de tal forma que no afecte a los resultados del ensayo que se ha de llevar a cabo; v.g., el agente es típicamente uno con el que el anticuerpo o anticuerpos relevantes no tienen reacción cruzada. Por ejemplo, el agente puede ser un fármaco inmunosupresor diferente, pero estructuralmente similar si el anticuerpo utilizado en el posterior inmunoensayo distingue entre sirolimus y tacrolimus. La Patente EE.UU. Nº 6.187.547 (concedida el 13 de Febrero de 2001 a Legay y Wenger) describe "competidores de unión" útiles para liberar fármacos inmunosupresores de proteínas de unión. Como ejemplos, se incluyen: [Thr^2, Leu^5, D-Hiv^8, Leu^{10}]-Ciclosporina, que pueden liberar ciclosporina.

Alternativamente, se puede emplear una proteasa para liberar el analito de la(s) proteína(s) de unión. Como ejemplos de proteasas, se incluyen la proteinasa K, la subtilisina, la dispasa, la termolisina, la tripsina, la ficina, la bromelaína y sus combinaciones, descritas en la solicitud copendiente Solicitud No Provisional EE.UU. Número de Serie 60/882.732, depositada el 29 de Diciembre de 2006.

Tras la lisis de la muestra, se puede analizar la mezcla de lisis resultante por inmunoensayo.

II. Inmunoensayo de fármacos inmunosupresores

A. En General

Se pueden usar los inmunoensayos según la invención para la identificación cualitativa y/o la cuantificación del fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo. Estos métodos son aplicables, por ejemplo, a inmunoensayos

de tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos. En determinadas realizaciones, los inmunoensayos para fármacos inmunosupresores son llevados a cabo combinando una composición de reactivo de extracción con la muestra de ensayo y agua para formar un extracto de muestra de ensayo. Se pone en contacto la muestra de ensayo o el extracto de muestra de ensayo con al menos un anticuerpo específico para el fármaco inmunosupresor en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente, con objeto de formar una mezcla de ensayo, y se detecta la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor.

Se puede conseguir una mayor sensibilidad del ensayo, en general, por contacto de la muestra de ensayo o del extracto de muestra de ensayo con el anticuerpo en presencia de una concentración salina superior a aproximadamente 0,4 M (v.g., de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 5,0 M). En realizaciones particulares, la concentración salina es inferior o igual a aproximadamente 4,0 M (v.g., de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 4,0 M). En realizaciones ejemplares, la concentración salina es de aproximadamente 2,0 M (v.g., de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M, en particular de aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,9 M, aproximadamente 2,0 M, aproximadamente 2,1 M o aproximadamente 2,2 M). Como sales adecuadas, se pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes aniones: fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, acetato, citrato y bisulfato. En realizaciones particulares, la sal incluye un anión monovalente, tal como, por ejemplo: fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato y acetato. En realizaciones preferidas, la sal incluye cloruro, v.g., una sal cloruro de un metal alcalino (v.g., litio, sodio, potasio, rubidio, cesio). En general, la sal empleada es soluble en las condiciones de ensayo. El cloruro de sodio es altamente soluble en la mayoría de las condiciones y puede ser, por lo tanto, convenientemente utilizado para aumentar la sensibilidad del ensayo en una amplia variedad de inmunoensayos según la invención.

La sal puede ser aportada a la mezcla de ensayo de cualquier manera conveniente y puede estar presente antes, o añadida después, del contacto entre la muestra de ensayo o el extracto de muestra de ensayo y el anticuerpo. En realizaciones particulares, se aporta la sal en un diluyente de ensayo, que puede también incluir eventualmente uno o más de otros componentes, además de agua (tales como, por ejemplo, un tampón). La concentración salina en el diluyente de ensayo variará dependiendo de la concentración salina final deseada y de la cantidad de diluyente añadido a la mezcla de ensayo. Por ejemplo, se podría añadir un diluyente de ensayo que tuviera una concentración salina de aproximadamente 4,0 M a igual volumen de mezcla ensayo para obtener una concentración salina final de 2,0 M.

B. Anticuerpos

En inmunoensayos para la detección cualitativa de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, se pone en contacto al menos un anticuerpo que se une al fármaco inmunosupresor con al menos una muestra de ensayo o un extracto de muestra de ensayo que se sospecha contiene fármaco para formar un complejo inmune anticuerpo-fármaco. Se puede usar cualquier anticuerpo adecuado que se una al inmunosupresor particular en los inmunoensayos según la invención. Se conocen en la técnica y/o se pueden adquirir comercialmente anticuerpos para cada uno de tacrolimus, zotarolimus, ciclosporina y everolimus, y se puede utilizar cualquiera de éstos.

Un protocolo ejemplar para producir un anticuerpo específico para un fármaco inmunosupresor es como sigue. Se administran a ratones RBf/Dnj hembras 3 refuerzos mensuales de un inmunógeno fármaco-27-CMO-toxoide tetánico, seguido de una inmunización con una preparación de fármaco-42-HS-toxoide tetánico al 4º mes. Siete meses después, se administra un refuerzo prefusión intraesplénico al animal utilizando el inmunógeno fármaco-27-CMO-toxoide tetánico 3 días antes de la fusión. Se aíslan entonces las células B esplénicas y se utilizan en una fusión de polietileno (PEG) estándar con el mieloma SP2/0. Se rastrean los cultivos confluentes en cuanto a actividad antifármaco 10-14 días después en un EIA de microtitulación y se clonan entonces los cultivos positivos usando la técnica de clonación por dilución limitante. Se aíslan los clones resultantes y se amplían en medio de cultivo de tejidos IMDM c/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se purifica el anticuerpo segregado por afinidad utilizando Proteína A. Se puede utilizar un anticuerpo preferido ejemplar generado usando sirolimus como fármaco en los inmunoensayos para everolimus y zotarolimus.

Se describe un anticuerpo preferido ejemplar para uso en inmunoensayos para tacrolimus en M. Kobayashi et al., "A Highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma", en las pp. 23-29 de "FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression", A Transplantation Proceedings Reprint, Suplemento 6, Vol. XIX, Octubre de 1987, Editores T. Starzl, L. Makowka y S. Todo, publicado por Grune & Stratton, Inc., Philadelphia, PA.

Un anticuerpo preferido ejemplar para uso en inmunoensayos para la ciclosporina es el anticuerpo monoclonal que es un componente del ensayo de ciclosporina AxSym comercializado por Abbott Laboratories para medir ciclosporina.

C. Detección

Se pueden detectar entonces los complejos inmunes anticuerpo-fármaco usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede marcar un anticuerpo con un marcaje detectable para detectar la presencia del complejo anticuerpo-fármaco. La selección de un marcaje particular no es crítica, pero el marcaje escogido debe ser capaz de producir una señal detectable por sí mismo o conjuntamente con una o más substancias adicionales.

Se conocen en la técnica marcajes detectables útiles, su unión a anticuerpos y las técnicas de detección para los mismos. Se puede usar cualquier marcaje detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcaje detectable puede ser un marcaje radiactivo, tal como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P o ^{33}P; un marcaje enzimático, tal como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.; un marcaje quimioluminiscente, tal como derivados de acridinio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc.; un marcaje fluorescente, tal como fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina o puntos cuánticos (selenuro de cadmio rematado con sulfuro de zinc); un marcaje termométrico; o un marcaje de reacción en cadena de inmunopolimerasa. Se encuentra una introducción a marcajes, procedimientos de marcaje y detección de marcajes en Polak y Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y.(1997), y en Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi (1996), que es una combinación de manual y catálogo publicada por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Son marcajes preferidos para uso en la invención marcajes quimioluminiscentes tales como la acridinio-9-carboxamida. Se pueden encontrar detalles adicionales en Mattingly, P. G. y Adamczyk, M. (2002) Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamides and their application in clinical assays, en Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications (Dyke, K. V., Ed.) pp. 77-105, CRC Press, Boca Ratón.

El marcaje detectable puede unirse al analito, análogo de analito o anticuerpo directamente o a través de un agente copulante. Un ejemplo de agente copulante que puede ser utilizado es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, clorhidrato), que está comercializado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se conocen en la técnica otros agentes copulantes que pueden ser utilizados. Se conocen en la técnica métodos para unir un marcaje detectable a un anticuerpo. Adicionalmente, se pueden comprar o sintetizar muchos marcajes detectables que ya contengan grupos terminales que faciliten la copulación del marcaje detectable al anticuerpo, tales como N10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)acridinio-9-carboxamida, también conocida como éster de CPSP-acridinio, o N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)acridinio-9-carboxamida, también conocida como éster de SPSP-acridinio.

Alternativamente, se puede añadir un segundo anticuerpo que se una al inmunosupresor y que contenga un marcaje detectable a la muestra de ensayo o al extracto de muestra de ensayo y utilizarlo para detectar la presencia del complejo anticuerpo-fármaco. Se puede usar cualquier marcaje detectable adecuado en esta realización.

D. Formatos ejemplares

Los inmunoensayos de la invención pueden ser llevados a cabo empleando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, aunque sin limitación, un formato de sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo ensayos de inhibición competitiva tanto hacia delante como inversos) o un formato de polarización de la fluorescencia.

En los inmunoensayos para la detección cuantitativa de un inmunosupresor, tales como un formato preferido de tipo sándwich, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el fármaco en la muestra de ensayo o el extracto de muestra de ensayo. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes partes del fármaco, formando un complejo inmune al que se hace referencia como "sándwich". En general, se pueden usar uno o más anticuerpos para capturar el inmunosupresor en la muestra de ensayo (se hace referencia a estos anticuerpos con frecuencia como anticuerpo "de captura" o anticuerpos "de captura") y se emplean uno o más anticuerpos para unir un marcaje detectable (a saber, cuantificable) al sándwich (se hace frecuentemente referencia a estos anticuerpos como anticuerpo "de detección" o anticuerpos "de detección"). En un ensayo en sándwich, se prefiere que ambos anticuerpos que se unen al fármaco no resulten disminuidos por la unión de cualquier otro anticuerpo en el ensayo a su respectivo sitio de unión. En otras palabras, habría que seleccionar los anticuerpos de tal forma que el uno o más primeros anticuerpos que han contactado con una muestra de ensayo o un extracto de muestra de ensayo que se sospecha contiene un inmunosupresor no se unan a todo o parte del sitio de unión reconocido por los segundos o siguientes anticuerpos, interfiriendo de este modo con la capacidad del uno o más segundos o siguientes anticuerpos para unirse al fármaco. En un ensayo en sándwich, los anticuerpos, y preferiblemente el al menos un anticuerpo de captura, son usados en cantidades en exceso molar en relación a la cantidad máxima de fármaco que se espera en la muestra de ensayo o el extracto de muestra de ensayo. Por ejemplo, se pueden utilizar de aproximadamente 5 μg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de solución que contiene fase sólida.

En una realización, el al menos un primer anticuerpo de captura puede unirse a un soporte sólido que facilite la separación del complejo primer anticuerpo-fármaco de la muestra de ensayo. El soporte sólido o "fase sólida" usado en el inmunoensayo de la invención no es crítico y puede ser seleccionado por un experto en la técnica. Una fase sólida o soporte sólido, tal como se usa aquí, se refiere a cualquier material que sea insoluble o que pueda hacerse insoluble mediante una reacción posterior. Las fases sólidas o soportes sólidos útiles son conocidos para los expertos en la técnica e incluyen las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, eritrocitos de oveja (u otro animal) y Duracytes® (una marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.), que son eritrocitos "fijados" con aldehído pirúvico y formaldehído, y otros. Como métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas, se incluyen interacciones iónicas, hidrofóbicas y covalentes y similares. Se puede seleccionar la fase sólida por su capacidad intrínseca para atraer al agente captura e inmovilizarlo. Alternativamente, la fase sólida puede incluir un receptor adicional con capacidad para atraer al agente de captura e inmovilizarlo. El receptor adicional puede incluir una substancias cargada de carga opuesta con respecto al propio agente de captura o a una substancia cargada conjugada al agente de captura. Como aún otra alternativa, el receptor puede ser cualquier compañero de unión específica que esté inmovilizado sobre (unido a) la fase sólida y que tenga capacidad para inmovilizar el agente de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula del receptor permite la unión indirecta del agente de captura a un material de fase sólida antes de realizar el ensayo o durante la realización del ensayo.

Se puede usar cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, soportes sólidos hechos de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o perlas. El anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse al soporte sólido por adsorción, por unión covalente usando un agente de copulación química o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que dicha unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse al fármaco. Más aún, si es necesario, se puede derivatizar el soporte sólido para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales sobre el anticuerpo. Dicha derivatización requiere el uso de ciertos agentes copulantes, tales como, aunque sin limitación, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Está dentro del alcance de la presente invención que la fase sólida pueda incluir también cualquier material poroso adecuado con suficiente porosidad como para permitir el acceso por los anticuerpos de detección y una afinidad superficial adecuada para unir antígenos. Generalmente, se prefieren estructuras microporosas, pero también se pueden usar materiales con la estructura de gel en el estado hidratado. Dichos soportes sólidos útiles incluyen, aunque sin limitación, nitrocelulosa y nilón. Se contempla que dichos soportes sólidos porosos aquí descritos estén preferiblemente en forma de láminas de un espesor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variar dentro de amplios límites, y es preferiblemente de aproximadamente 0,025 a 15 micras, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micras. La superficie de dichos soportes puede ser activada por procedimientos químicos que causen unión covalente del antígeno o anticuerpo al soporte. Se obtiene la unión irreversible del antígeno o anticuerpo, sin embargo, en general, por adsorción sobre el material poroso por fuerzas hidrofóbicas.

Después de poner en contacto el extracto de muestra de ensayo sospechoso de contener o que contiene el inmunosupresor con el al menos un primer anticuerpo de captura, se incuba la mezcla resultante para permitir la formación de un complejo primer anticuerpo de captura (o anticuerpos múltiples)-fármaco. Se puede realizar la incubación a cualquier pH adecuado, incluyendo un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a cualquier temperatura adecuada, incluyendo de aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C, y durante un período de tiempo adecuado de desde al menos aproximadamente (1) minuto hasta aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 4-20 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 17-19 minutos.

Tras la adición de un agente de detección y de la formación de un complejo marcado, se cuantifica la cantidad de marcaje en el complejo empleando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, si se usa un marcaje enzimático, el complejo marcado reacciona con un substrato para el marcaje que da una reacción cuantificable, tal como el desarrollo de color. Si el marcaje es un marcaje radiactivo, se cuantifica el marcaje empleando un contador de centelleo. Si el marcaje es un marcaje fluorescente, se cuantifica el marcaje por estimulación del marcaje con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detección de otro color (que se conoce como la "longitud de onda de emisión") que es emitido por el marcaje en respuesta a la estimulación. Si el marcaje es un marcaje quimioluminiscente, se cuantifica el marcaje detectando la luz emitida visualmente o utilizando luminómetros, película de rayos x, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez se ha cuantificado la cantidad del marcaje en el complejo, se puede determinar la concentración de fármaco en la muestra de ensayo mediante el uso de una curva estándar generada, por ejemplo, utilizando diluciones seriadas de fármaco inmunosupresor de concentración conocida. Aparte de utilizar diluciones seriadas del fármaco, se puede generar la curva estándar gravimétricamente, por espectroscopía de masas y por otras técnicas conocidas en este campo.

En un formato competitivo hacia delante preferido, se usa una alícuota de fármaco marcado, o análogo del mismo,

de una concentración conocida para competir con el fármaco presente en una muestra de ensayo por la unión al anticuerpo. En un ensayo competitivo hacia delante, se puede poner en contacto un anticuerpo inmovilizado ya sea secuencialmente o de manera simultánea con la muestra de ensayo y un fármaco o análogo de fármaco marcado. Se puede marcar el fármaco o análogo de fármaco con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables antes discutidos. En este ensayo, se puede inmovilizar el anticuerpo de captura sobre un soporte sólido utilizando las técnicas aquí discutidas previamente. Alternativamente, se puede copular el anticuerpo de captura a un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

El fármaco o análogo de fármaco marcado, el extracto de muestra de ensayo y el anticuerpo son incubados en condiciones similares a las antes descritas en relación al formato de ensayo en sándwich. Se generan entonces dos tipos diferentes de complejos anticuerpo-fármaco. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-fármaco generados contiene un marcaje detectable, mientras que el otro complejo anticuerpo-fármaco no contiene un marcaje detectable. Se puede separar el complejo anticuerpo-fármaco, aunque no tiene por qué serlo, del resto del extracto de la muestra de ensayo antes de la cuantificación del marcaje detectable. Independientemente de si se separa el complejo anticuerpo-fármaco del resto de la muestra de ensayo, se cuantifica entonces la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco. Se puede determinar luego la concentración de fármaco en la muestra de ensayo comparando la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco con una curva estándar. Se puede generar la curva estándar utilizando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopía de masas, gravimétricamente y por otras técnicas conocidas en este campo.

Se puede separar el complejo anticuerpo-fármaco de la muestra de ensayo uniendo el anticuerpo a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos antes discutidos en relación al formato de ensayo en sándwich, y retirando luego el resto de la muestra de ensayo del contacto con el soporte sólido.

En un ensayo competitivo inverso, se puede poner en contacto un fármaco inmunosupresor o análogo del mismo inmovilizado secuencial o simultáneamente con una muestra de ensayo o extracto de muestra de ensayo y al menos un anticuerpo marcado. Se puede marcar el anticuerpo con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables discutidos anteriormente. Se puede unir el fármaco o análogo de fármaco a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos discutidos anteriormente en relación al formato de ensayo en sándwich.

Se incuban el fármaco o análogo de fármaco inmovilizado, la muestra de ensayo o el extracto de muestra de ensayo y al menos un anticuerpo marcado en condiciones similares a las antes descritas en relación al formato de ensayo en sándwich. Se generan entonces dos tipos diferentes de complejos anticuerpo-fármaco. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-fármaco generados está inmovilizado y contiene un marcaje detectable, mientras que el otro complejo anticuerpo-fármaco no está inmovilizado y contiene un marcaje detectable. Se retiran el complejo anticuerpo-fármaco no inmovilizado y el resto de la muestra de ensayo o extracto de muestra de ensayo de la presencia del complejo anticuerpo-fármaco inmovilizado por técnicas conocidas en este campo, tales como lavado. Una vez retirado el complejo anticuerpo-fármaco no inmovilizado, se cuantifica entonces la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco inmovilizado. Se puede determinar luego la concentración de fármaco en la muestra de ensayo comparando la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco con una curva estándar. Se puede generar la curva estándar utilizando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopía de masas, gravimétricamente y por otras técnicas conocidas en este campo.

En un ensayo de polarización de la fluorescencia, en una realización, se pone primeramente en contacto un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo con una muestra de ensayo no marcada que contiene el fármaco inmunosupresor para formar un complejo anticuerpo-fármaco no marcado. Se pone entonces en contacto el complejo anticuerpo-fármaco no marcado con un fármaco o análogo del mismo fluorescentemente marcado. El fármaco o análogo del fármaco marcado compite con cualquier fármaco no marcado en la muestra de ensayo por la unión al anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo. Se determina la cantidad de complejo anticuerpo-fármaco marcado formado y se determina la cantidad de fármaco en la muestra de ensayo mediante el uso de una curva estándar.

El uso de microscopía de sonda de barrido (SPM) para inmunoensayos es también una tecnología a la que son fácilmente adaptables los métodos de inmunoensayo de la presente invención. En la SPM, en particular en la microscopía de fuerza atómica, se fija el agente de captura a una fase sólida que tiene una superficie adecuada para el barrido. El agente de captura puede, por ejemplo, ser adsorbido en una superficie de plástico o de metal. Alternativamente, el agente de captura puede unirse covalentemente a, v.g., plástico derivatizado, metal, silicio o vidrio según métodos conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica. Después de la unión del agente de captura, se pone en contacto la muestra de ensayo con la fase sólida y se usa un microscopio de sonda de barrido para detectar y cuantificar complejos fijados a fase sólida. El uso de SPM elimina la necesidad de marcajes típicamente empleados en sistemas de inmunoensayo. Dicho sistema está descrito en la Sol. EE.UU. Nº 662.147.

Los inmunoensayos según la invención pueden ser también llevados a cabo usando un Sistema MicroElectroMecánico (MEMS). Los MEMS son estructuras microscópicas integradas en silicio que combinan elementos mecánicos, ópticos y fluidos con la electrónica, permitiendo una detección conveniente de un analito de interés. Un ejemplo de dispositivo MEMS adecuado para uso en la invención es la matriz multipalanca de Protiveris. Esta matriz se basa en la actuación quimicomecánica de micropalancas de silicio especialmente diseñados y la posterior detección óptica de las deflexiones de las micropalancas. Cuando se reviste por un lado con un compañero de unión, una micropalanca se inclinará al exponerla a una solución que contenga la molécula complementaria. Esta inclinación está causada por el cambio en la energía superficial debido al suceso de unión. La detección óptica del grado de inclinación (deflexión) permite la medición de la cantidad de molécula complementaria unida a la micropalanca.

En otras realizaciones, se llevan a cabo los inmunoensayos según la invención usando detección electroquímica. Heineman y colaboradores han descrito un procedimiento básico para la detección electroquímica. Éste conllevaba la inmovilización de un anticuerpo primario (Ab, IgG de rata antirratón), seguida de exposición a una secuencia de soluciones que contenían el antígeno (Ag, IgG de ratón), el anticuerpo secundario conjugado a un marcaje enzimático (AP-Ab, IgG de rata antirratón y fosfatasa alcalina) y fosfato de p-aminofenilo (PAPP). La AP convierte el PAPP en p-aminofenol (PAP_R; la "R" es para distinguir la forma reducida de la forma oxidada, PAP_O, la quinonoimina), que es electroquímicamente reversible a potenciales que no interfieren con la reducción del oxígeno y agua a pH 9,0, donde la AP exhibe una actividad óptima. PAP_R no causa contaminación de los electrodos, a diferencia del fenol, cuyo precursor, el fosfato de fenilo, es frecuentemente utilizado como substrato enzimático. Aunque PAP_R sufre oxidación con el aire y con la luz, ésta se evita fácilmente a pequeñas escalas y cortos marcos temporales. Se han descrito previamente límites de detección de picomoles para PAP_R y límites de detección de femtogramos para IgG alcanzados en inmunoensayos microelectroquímicos utilizando volúmenes de PAPP de 20 μl a 360 μl. En inmunoensayos capilares con detección electroquímica, el límite de detección más bajo descrito hasta la fecha es de 3.000 moléculas de IgG de ratón utilizando un volumen de 70 μl y un tiempo de ensayo de 30 minutos o de 25 minutos.

Se describen diversos sistemas de detección electroquímica en las Patentes EE.UU. Nº 7.045.364 (concedida el 16 de Mayo de 2006), Nº 7.045.310 (concedida el 16 de Mayo de 2006), Nº 6.887.714 (concedida el 3 de Mayo de 2005), Nº 6.682.648 (concedida el 27 de Enero de 2004) y Nº 6.670.115 (concedida el 30 de Diciembre de 2003).

En realizaciones particulares, útiles, por ejemplo, para estudiar simultáneamente múltiples analitos en una muestra de ensayo, la fase sólida puede incluir una pluralidad de diferentes agentes de captura. Así, por ejemplo, la fase sólida puede tener fijada sobre sí misma una pluralidad de anticuerpos, donde cada uno está destinado a estudiar la presencia de diferentes analitos en la muestra. En un ejemplo de realización, la fase sólida puede consistir en una pluralidad de diferentes regiones sobre una superficie, donde cada región tiene un anticuerpo particular fijado en ella.

Los formatos múltiples pueden emplear, aunque no necesitan hacerlo, una pluralidad de marcajes, donde cada marcaje es usado para la detección de un analito particular. Por ejemplo, se pueden detectar múltiples analitos diferentes sin usar una pluralidad de marcajes, donde se fija una pluralidad de agentes de captura, tales como anticuerpos, a la fase sólida en diferentes localizaciones conocidas, en base a la especificidad. Dado que se conoce la especificidad del agente de captura en cada localización, se puede asociar la detección de una señal en una localización particular a la presencia de analito unido en esa localización. Como ejemplos de este formato, se incluyen dispositivos microfluidos y matrices capilares, que contienen diferentes agentes de captura en diferentes localizaciones a lo largo de un canal o capilar, respectivamente, y micromatrices, que típicamente contienen diferentes agentes de captura dispuestos en una matriz de manchas ("elementos diana") sobre una superficie de un soporte sólido. En realizaciones particulares, cada agente de captura diferente puede fijarse a un electrodo diferente, que puede, por ejemplo, formarse sobre una superficie de un soporte sólido, en un canal de un dispositivo microfluido o en un capilar.

III. Kits de ensayo

La invención proporciona también kits de ensayo para estudiar muestras de ensayo en cuanto a un fármaco inmunosupresor. Los kits de ensayo según la invención incluyen uno o más reactivos útiles para la práctica de uno o más inmunoensayos según la invención. Un kit de ensayo generalmente incluye un envase con uno o más recipientes que mantienen los reactivos, como una o más composiciones independientes o, eventualmente, como mezcla cuando lo permita la compatibilidad de los reactivos. El kit de ensayo puede incluir también otro(s) material(es), que puede(n) resultar deseable(s) desde el punto de vista de un usuario, tal(es) como un tampón(es), un diluyente(s), un patrón(es) y/o cualquier otro material útil en el procesado de muestras, en el lavado o en la realización de cualquier otra etapa del ensayo.

En realizaciones particulares, los kits de ensayo de la invención pueden incluir: (a) al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor; (b) un diluyente de ensayo que contiene una sal a una concentración de al menos aproximadamente 1,0 M; y (c) un reactivo de extracción que incluye: un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un análogo de éstos, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos. En ejemplos de realizaciones, el anticuerpo puede ser específico para tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de cualquiera de estos compuestos.

La concentración de sal en el diluyente de ensayo puede ser inferior o igual a aproximadamente 10,0 M, v.g., aproximadamente 4,5 M. Se puede incluir cualquiera de las sales antes descritas en relación a los métodos de inmunoensayo de la invención en un diluyente de ensayo adecuado para uso en los kits de ensayo.

En ciertas realizaciones, el reactivo de extracción incluye metanol, etanol, propanol o una mezcla de cualquiera de estos alcoholes. En ejemplos de realizaciones, la proporción de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, más particularmente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

Si se desea, el kit de ensayo puede incluir adicionalmente una composición control que incluya el fármaco inmunosupresor que está siendo estudiado. Se puede incluir una composición control en el kit de ensayo ejemplar antes descrito, o se puede incluir en un kit de ensayo que contenga, por ejemplo: (a) al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor, y (b) un diluyente de ensayo que contenga una sal a una concentración de al menos aproximadamente 1,0 M.

Los kits según la invención pueden incluir una fase sólida y un agente de captura que está fijado a la fase sólida o que resulta fijado a la fase sólida durante el ensayo. En ejemplos de realizaciones, la fase sólida incluye una o más micropartículas o electrodos. Cuando se han de emplear dichos kits para realizar inmunoensayos en sándwich, los kits pueden incluir adicionalmente un agente de detección marcado. En ciertas realizaciones, el kit de ensayo incluye al menos un marcaje directo, tal como acridinio-9-carboxamida. Los kits de ensayo según la invención pueden incluir también al menos un marcaje indirecto. Si el marcaje empleado requiere en general un reactivo indicador para producir una señal detectable, el kit de ensayo preferiblemente incluye uno o más reactivos indicadores adecuados.

Los kits de ensayo según la invención preferiblemente incluyen instrucciones para llevar a cabo uno o más de los inmunoensayos de la invención. Las instrucciones incluidas en los kits de la invención pueden ir fijadas al material del envase o pueden ir incluidas como un prospecto del envase. Aunque las instrucciones son típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a éstos. Se contempla mediante esta invención cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, aunque sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (v.g., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (v.g., CD ROM) y similares. Tal como se usa aquí, el término "instrucciones" puede incluir la dirección de un sitio de internet que proporcione las instrucciones.

Por supuesto, no hace falta decir que se pueden adaptar u optimizar cualquiera de los formatos ejemplares aquí descritos y cualquier ensayo o kit según la invención para uso en sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquéllos en los cuales existe una fase sólida que contiene una micropartícula), como se describe, v.g., en las Patentes EE.UU. Nº 5.089.424 y 5.006.309, y como se comercializan, v.g., por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo, aunque sin limitación, las plataformas ARCHITECT®, AxSYM®, IMX®, ABBOTT PRISM® y Quantum II de Abbott Laboratories, así como otras plataformas.

Adicionalmente, los ensayos y kits de la presente invención pueden ser eventualmente adaptados u optimizados para sistemas de ensayo de diagnóstico inmediato, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico de diagnóstico inmediato de Abbott Laboratories (i-STAT®). Se describen inmunosensores y métodos de fabricación o de funcionamiento de los mismos en dispositivos de ensayo de un solo uso, por ejemplo, en la Patente EE.UU. 5.063.081 y en las Solicitudes de Patente EE.UU. publicadas 20030170881, 20040018577, 20050054078 y 20060160164.

Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Inmunoensayo de tacrolimus utilizando sal en el diluyente de ensayo

Este ejemplo ilustra el efecto de la adición de sal en el diluyente de ensayo en un inmunoensayo automatizado para tacrolimus.

En la configuración de ensayo preferida actual, se añade cloruro de sodio (NaCl) al componente auxiliar diluyente de ensayo del ensayo de tacrolimus ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) a una concentración de 4,5 M. En el ensayo de tacrolimus, se combinan 80 µl del diluyente de ensayo con el reactivo de micropartículas y la muestra; el volumen de reacción es de 180 µl, lo que da lugar a una concentración de reacción de NaCl 2,0 M. Después de una incubación de 18 minutos, se añaden 20 µl del reactivo indicador marcado con tacrolimus. Después de una incubación adicional de 4 minutos, se lavan las micropartículas, se añaden entonces los reactivos disparadores de quimioluminiscencia y se mide la cantidad de luz producida (o señal) como unidades de luz relativas (ULR).

ULR es la designación para la unidad de medición óptica empleada en el sistema ARCHITECT®, así como en otros instrumentos. El término ULR viene de la relación del recuento de fotones con una cierta cantidad de patrón productor de señal, tal como acridinio. Cada módulo óptico es calibrado con un conjunto de patrones (v.g., patrones de acridinio). Cuando se produce la reacción quimioluminiscente, se emite luz y se miden los fotones a lo largo de un período de tiempo (v.g., un período de tiempo de 3 segundos). El tubo fotomultiplicador (TFM) convierte los fotones contados en señal digital, que es entonces enviada a un tablero de circuitos para su procesado. El tablero de circuitos ópticos convierte la señal digital del TFM en una señal análoga que es proporcional a los fotones contados, lo que a su vez es proporcional a la cantidad de molécula productora de señal (v.g., acridinio) presente. Esta señal análoga es entonces además procesada para producir un valor de ULR. Se estableció esta relación para producir un patrón para la calibración del módulo óptico, donde los diferentes patrones tienen valores de ULR asignados a los mismos. Así, aunque la propia unidad ULR es arbitraria, es proporcional a (es decir, guarda relación con) una cierta cantidad de patrón (v.g., acridinio).

Los resultados de estos estudios son presentados en las Figuras 1 y 2.

La intensidad de la señal quimioluminiscente producida por el indicador es inversamente proporcional a la concentración de tacrolimus competidor no marcado en la muestra. La adición de NaCl a la mezcla de reacción da lugar a una señal quimioluminiscente más intensa cuando sólo está presente el indicador tacrolimus en la muestra. El NaCl también produce una mayor disminución en la señal con muestras que contienen tacrolimus no marcado para competir con el indicador tacrolimus marcado. Este cambio permite la detección de cantidades más pequeñas de tacrolimus que lo que sería posible sin la sal. La unión no específica (expresada como porcentaje de las ULR de un calibrador) resulta inalterada aumentando el NaCl añadido a la reacción.

Ejemplo 2

Inmunoensayo de tacrolimus utilizando sal en el reactivo de micropartículas

Este ejemplo ilustra el efecto de la adición de sal en el reactivo de micropartículas en un inmunoensayo automatizado para tacrolimus. Para estos ensayos, se añade NaCl al componente reactivo de micropartículas del ensayo Tacrolimus II IMx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) a varias concentraciones.

Los resultados de estos ensayos son mostrados en las Figuras 3 y 4. Como puede verse por estas Figuras, la adición de sal al reactivo de micropartículas de este ensayo produjo un efecto similar al que produjo la adición de sal al diluyente de ensayo en el ensayo de tacrolimus ARCHITECT® (Figuras 1 y 2). Podría esperarse esto en la medida en que el ensayo de tacrolimus II IMx® extrae analito de sangre entera con una mezcla orgánica similar de 75% de metanol/ 25% de etilenglicol/sulfato de zinc 60 mM, y analiza sin adición de sal en un alto contenido (véase, v.g., la Figura 3, a puntos de datos de NaCl 0 M).

Como comparación, la adición de NaCl 1 M, 2 M o 4 M a la botella de micropartículas del reactivo de micropartículas Tacrolimus II IMx® aumentó los índices de señal del calibrador (véase, v.g., la Figura 3, los índices del "ensayo actual" IMx® frente a los índices obtenidos con adición de NaCl 1 ó 2 M), la amplitud de índice de alto a bajo del calibrador (véase, v.g., la Figura 3, los índices inferior y superior del “ensayo actual" IMx® frente a los índices inferior y superior obtenidos con adición de NaCl 1 ó 2 M), la sensibilidad (véase, v.g., la Figura 4, desviación hacia la izquierda de las curvas para la adición de NaCl 1 ó 2 M) y el rendimiento del ensayo (véase, v.g., la Figura 4, X/A del calibrador).

Ejemplo 3

Inmunoensayo de tacrolimus utilizando otras sales en el diluyente de ensayo

Este ejemplo ilustra el efecto de la adición de diversas sales en el diluyente de ensayo en un inmunoensayo automatizado para tacrolimus.

Para estos estudios, se exploró el uso de sales distintas del NaCl. En particular, se investigó el efecto de la variación

del catión sodio y del anión cloruro. Los resultados de estos ensayos son mostrados en las Figuras 5 y 6. Como puede verse por estas Figuras, sales distintas del NaCl producen un efecto similar en el ensayo de tacrolimus ARCHITECT® en grados variables. A una concentración constante (0,45 M), las sales cloruro de los metales alcalinos, Li, Na, K, Rb y Cs, eran todas eficaces de forma similar (Figura 5). Sin embargo, las sales de sodio de diferentes aniones se comportan de manera diferente (Figura 6.). Todas mejoran el rendimiento del ensayo, pero se vio que el cloruro de sodio era altamente efectivo y altamente soluble.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones aquí descritos tienen únicamente fines ilustrativos y que se les sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la técnica, y se han de incluir éstos en el espíritu y ámbito de esta solicitud y en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Además, la solicitud copendiente de propiedad común EE.UU. Número de Serie 60/882.732, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra una prueba diagnóstica para la detección de una molécula o fármaco en sangre entera.

La solicitud copendiente de propiedad común Solicitud Provisional EE.UU. Número de Serie 60/878.017, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra un reactivo de lisis no desnaturalizante para uso en inmunoensayos de captura en solución.

La solicitud copendiente de propiedad común Solicitud No Provisional EE.UU. Número de Serie 11/618.495, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra un reactivo de lisis no desnaturalizante.

La solicitud copendiente de propiedad común Solicitud No Provisional EE.UU. Número de Serie 11/490.624, depositada el 21 de Julio de 2006, muestra una composición de reactivo de extracción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para valorar la presencia o concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, cuyo método consiste en:

poner en contacto una muestra de ensayo o un extracto de muestra de ensayo con un anticuerpo específico para un fármaco inmunosupresor en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente, para formar una mezcla de ensayo, donde dichas condiciones incluyen una concentración salina superior a aproximadamente 0,4 M; y
detectar la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor.

2. El método de la reivindicación 1, donde el fármaco inmunosupresor es seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

3. El método de la reivindicación 1, donde la muestra de ensayo consiste en una muestra de sangre humana.

4. El método de la reivindicación 1, donde la concentración salina es seleccionada entre el grupo consistente en (i) menos de o igual a aproximadamente 4,0 M y (ii) aproximadamente 2,0 M.

5. El método de la reivindicación 1, donde la sal es seleccionada entre el grupo consistente en una sal que tiene un anión monovalente y una sal consistente en una sal cloruro de un metal alcalino.

6. El método de la reivindicación 5, donde la sal consiste en una sal cloruro de un metal alcalino e incluye cloruro de sodio.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la mezcla de ensayo incluye adicionalmente:

un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un análogo de éstos, y
al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos.

8. El método de la reivindicación 7, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.

9. El método de la reivindicación 7, donde la proporción de glicol a alcohol está en un rango seleccionado entre el grupo consistente en de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4 y de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

10. Un kit de ensayo consistente en:

(a) al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor;
(b) un diluyente de ensayo que incluye una sal a una concentración de al menos aproximadamente 1,0 M; y
(c) un reactivo de lisis consistente en:

un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un análogo de éstos, y
al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos.

11. El kit de ensayo de la reivindicación 10, donde el fármaco inmunosupresor es seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

12. El kit de ensayo de la reivindicación 10, donde la concentración salina es seleccionada entre el grupo consistente en (i) menos de o igual a aproximadamente 10,0 M y (ii) aproximadamente 4,5 M.

13. El kit de ensayo de la reivindicación 10, donde la sal es seleccionada entre el grupo consistente en (i) una sal que tiene un anión monovalente y (ii) una sal consistente en una sal cloruro de un metal alcalino.

14. El kit de ensayo de la reivindicación 13, donde la sal consiste en una sal cloruro de un metal alcalino e incluye cloruro de sodio.

15. El kit de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que adicionalmente contiene una composición control que incluye el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).

16. El kit de ensayo de la reivindicación 15, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.

17. El kit de ensayo de la reivindicación 13, donde la proporción de glicol a alcohol está en un rango seleccionado entre el grupo consistente en de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4 y de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

18. El kit de ensayo de la reivindicación 10, donde:

el al menos un anticuerpo (a) es capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus y ciclosporina;
el reactivo de lisis (c) consiste en propilenglicol y etanol en una proporción de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2;
y donde dicho kit incluye además

(d) una composición control que contiene el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).

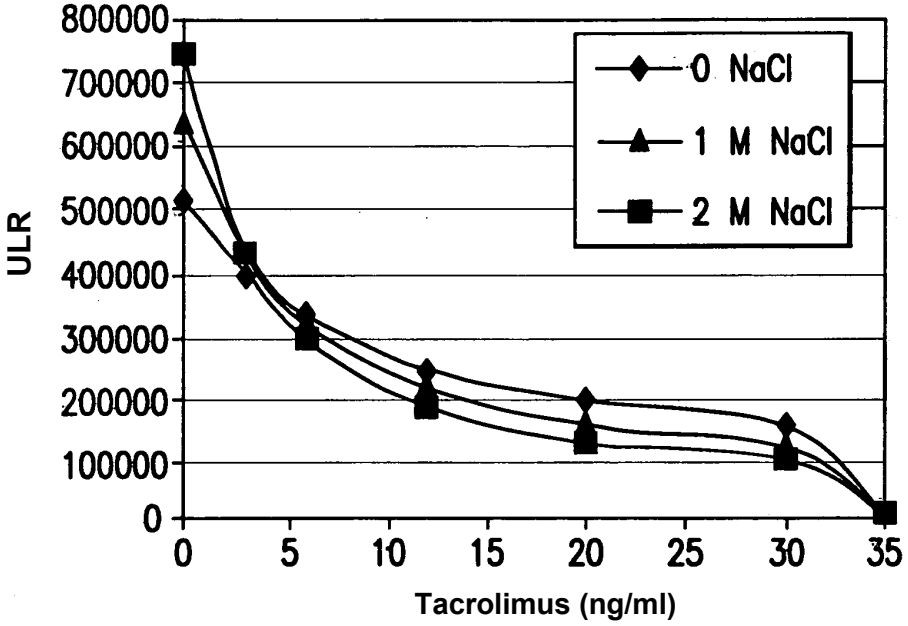

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
ULR
0
5
10
15
20
25
30
35
Tacrolimus (ng/ml)
0 NaCl
1 M NaCl
2 M NaCl

FIG. 1

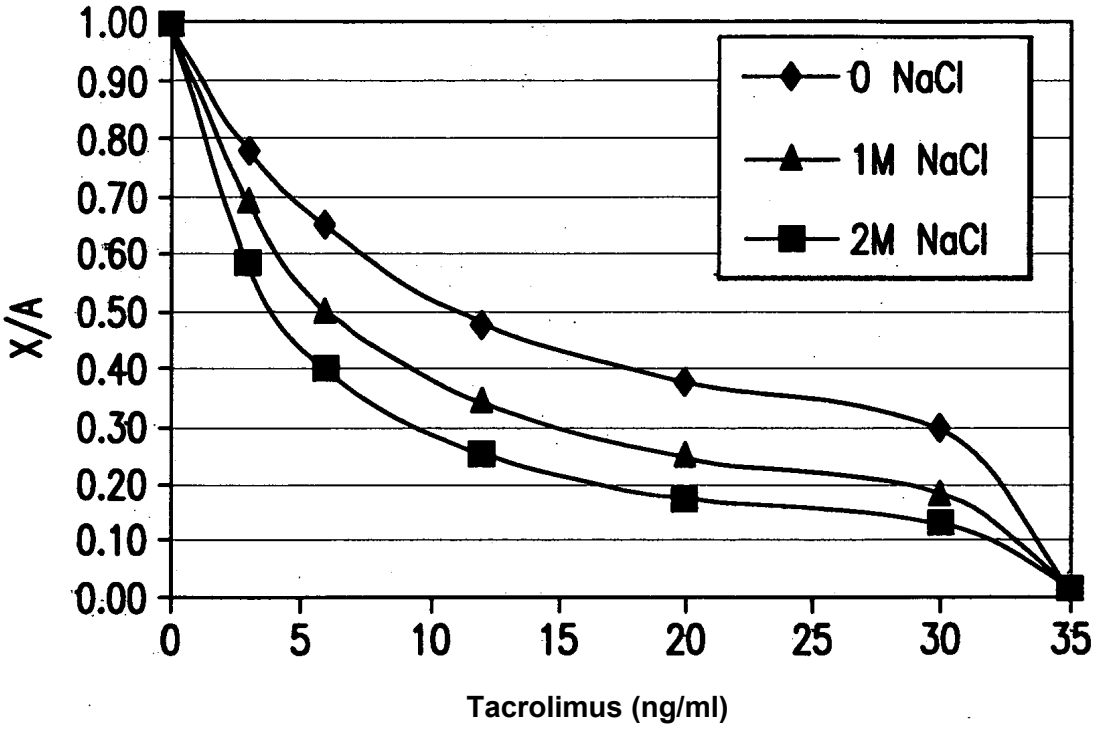

1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
X/A
0
5
10
15
20
25
30
35
Tacrolimus (ng/ml)
0 NaCl
1M NaCl
2M NaCl

FIG.2

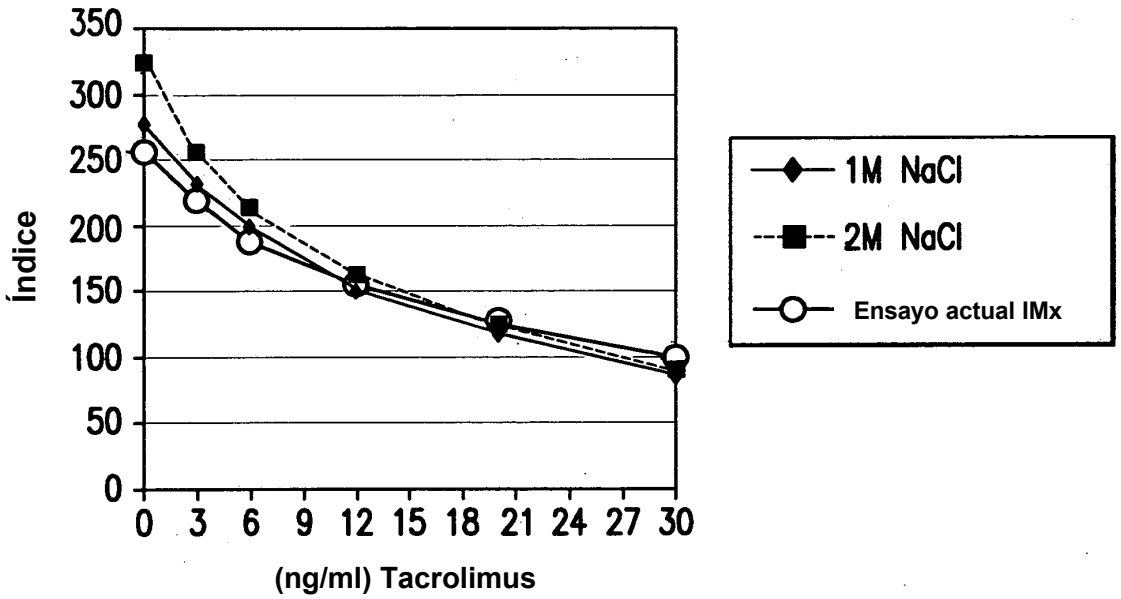

350
300
250
200
150
100
50
0
Índice
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
(ng/ml) Tacrolimus
1M NaCl
2M NaCl
Ensayo actual IMx

FIG.3

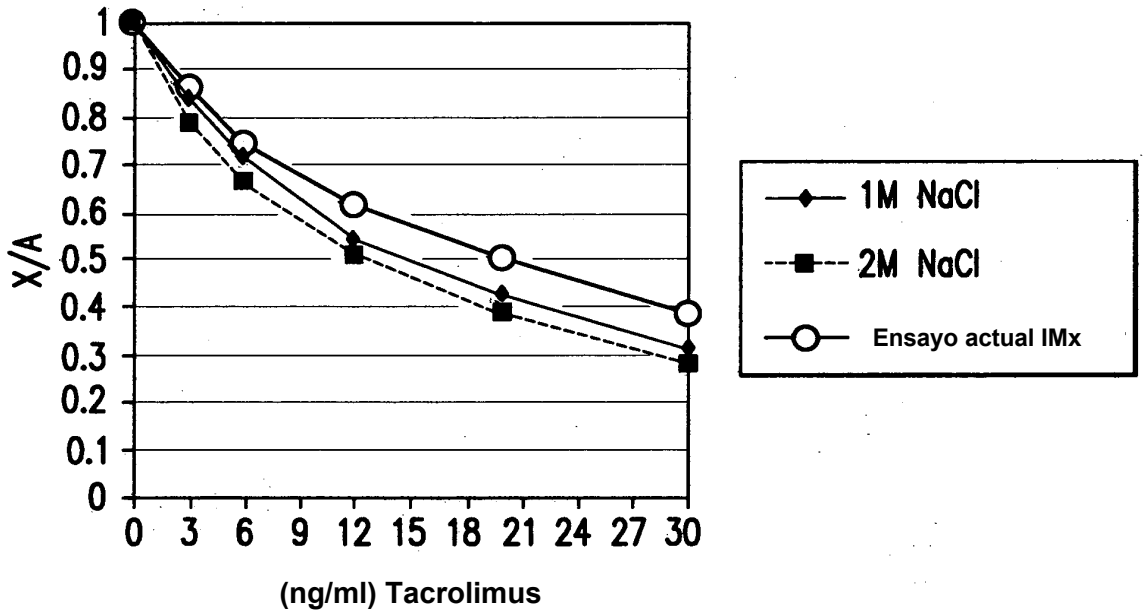

X/A
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
(ng/ml) Tacrolimus
1M NaCl
2M NaCl
Ensayo actual IMx

FIG.4

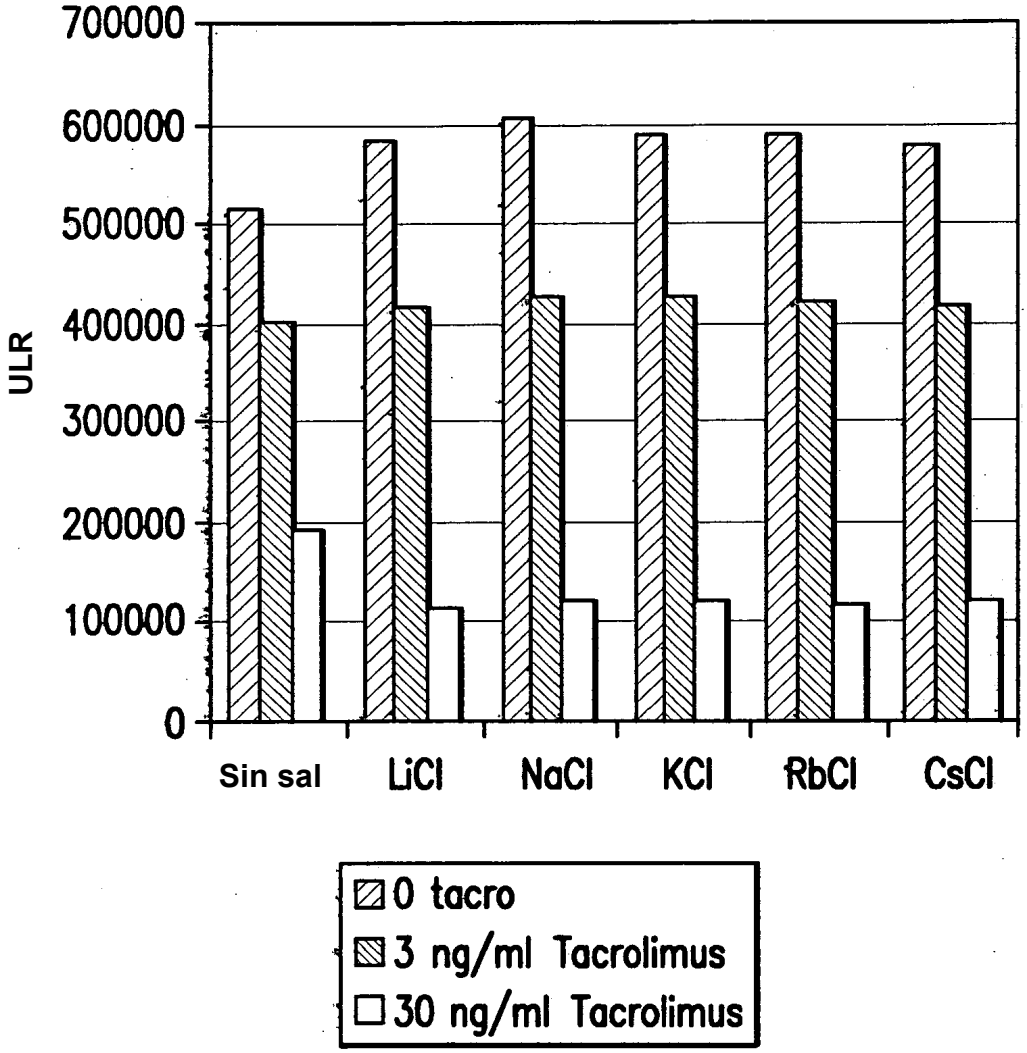

700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
ULR
Sin sal
LiCl
NaCl
KCl
RbCl
CsCl
0 tacro
3 ng/ml Tacrolimus
30 ng/ml Tacrolimus

FIG.5

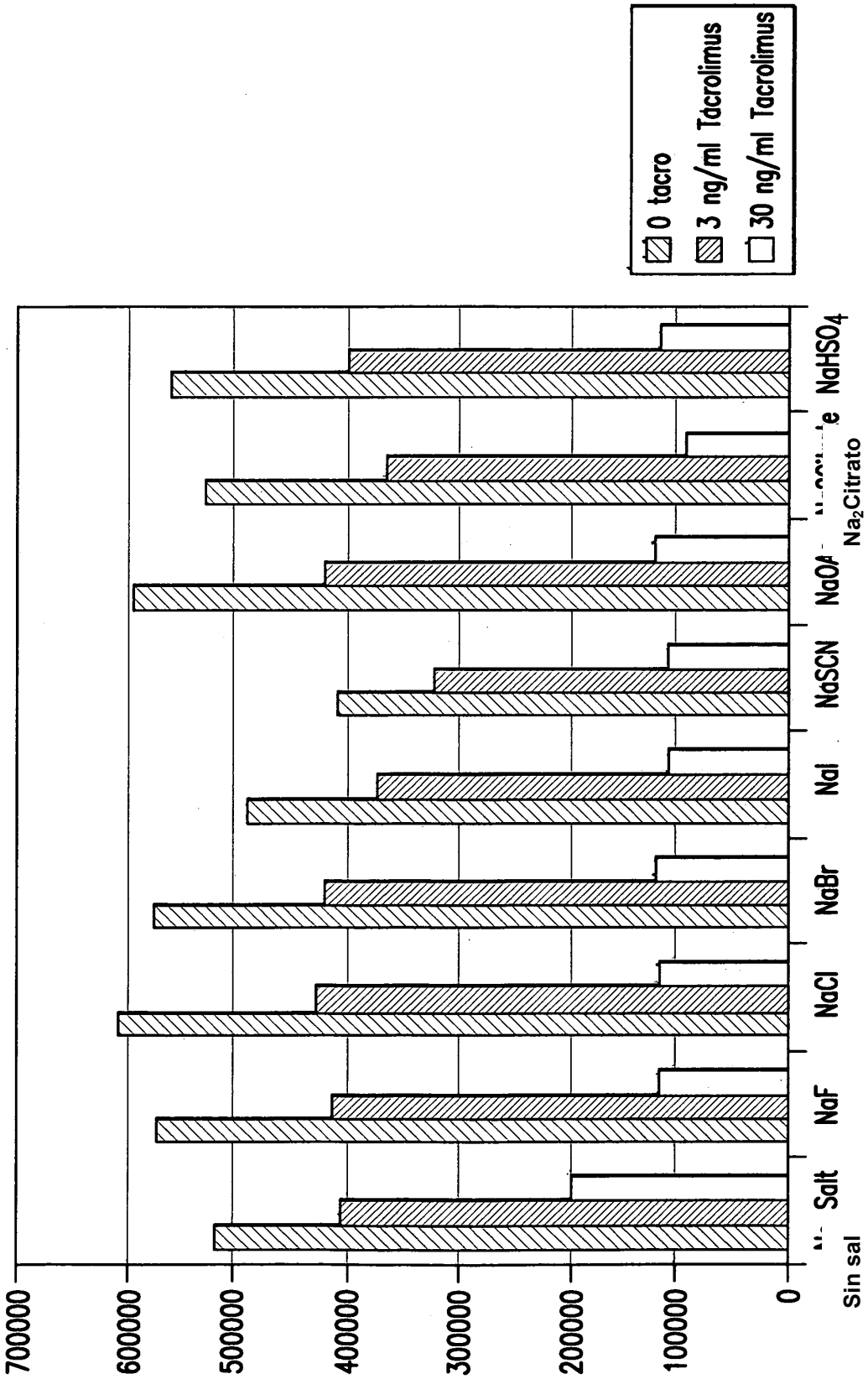

0 tacro
3 ng/ml Tacrolimus
30 ng/ml Tacrolimus
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Sin sal
Salt
NaF
NaCl
NaBr
NaI
NaSCN
NaOA
Na2Citrato
NaHSO4

FIG.6