

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 665**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2007 E 07869487 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2118655**

54 Título: **Reactivo de lisis no desnaturalizante**

30 Prioridad:

29.12.2006 US 618495

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2013

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (20.0%)
D0377, BLDG AP6A-1A 100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL 60064, US;
GRENIER, FRANK C. (20.0%);
WORKMAN, RYAN F. (20.0%);
SYED, HINA N. (20.0%) y
ALI, SALMAN (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GRENIER, FRANK C;
WORKMAN, RYAN F;
SYED, HINA N y
ALI, SALMAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 402 665 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

Reactivo de lisis no desnaturizante

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con un reactivo de lisis no desnaturizante útil, por ejemplo, en inmunoensayos de diagnóstico para determinar los niveles de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

10

Antecedentes

15 Muchos analitos de interés clínico son captados por las células o forman complejos con uno o más de otros componentes de la muestra de ensayo. Por consiguiente, para obtener una medición precisa de la cantidad de analito presente en la muestra, es preferible tratar la muestra y/o realizar el ensayo en condiciones tales que el analito se libere de las células u otro(s) componente(s) para su detección en el ensayo.

20 Por ejemplo, los fármacos inmunosupresores, tales como el tacrolimus, el everolimus, el temsorolimus y la ciclosporina, son efectivos para el tratamiento del rechazo de órganos o tejidos después de una cirugía de trasplante, de la enfermedad del injerto contra el huésped y de 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 del cuidado clínico, ya que niveles insuficientes del fármaco conducen a rechazo del injerto (órgano o tejido) y niveles excesivos conducen a efectos colaterales y toxicidades no deseados. Se miden, por lo tanto, los niveles en sangre de inmunosupresor de tal forma que se puedan ajustar las dosificaciones del fármaco para mantener el nivel del fármaco a la concentración apropiada. Los ensayos diagnósticos para la determinación de los niveles en sangre de inmunosupresor han encontrado, por lo tanto, un amplio uso clínico.

30 Inicialmente, se debe extraer y separar el inmunosupresor de los otros componentes de la muestra del paciente. El grueso del fármaco inmunosupresor en la muestra del paciente está presente en un complejo con diversas moléculas "portadoras", tales como proteínas de unión. El sirolimus, el tacrolimus y la ciclosporina se encuentran predominantemente en los hematíes de los especímenes de los pacientes y se asocian con proteínas de unión específicas, FKBP para el sirolimus y el tacrolimus y ciclofilina para la ciclosporina. Para asegurar una medición precisa de la concentración de fármaco total en el espécimen, preferiblemente se libera el fármaco unido a las proteínas de unión antes de la cuantificación. Se ha abordado esto usando detergentes para lisar las células y/o solventes orgánicos para desnaturizar las proteínas de la muestra.

40 Después de su extracción de las proteínas de unión, se puede medir el fármaco en una serie de formas diferentes, incluyendo por inmunoensayo o cromatografía con absorbancia o detección espectrofotométrica de masas. Los inmunoensayos para fármacos inmunosupresores están disponibles en una variedad de formatos, pero todos utilizan la unión de un anticuerpo o proteína de unión (v.g., FKBP) al fármaco inmunosupresor. Un ensayo comúnmente utilizado es un ensayo que conlleva la unión de un primer anticuerpo al inmunosupresor y la unión de inmunosupresor marcado (v.g., acridinio-sirolimus) a los sitios de unión del anticuerpo libre restantes, seguido de cuantificación por detección del marcaje.

45 EE.UU. 5.135.875 A describe un reactivo de precipitación para uso en sistemas analíticos para la determinación de analitos hidrofóbicos en una muestra de ensayo biológica, particularmente sistemas analíticos que emplean proteínas de unión específicas para dichos analitos.

50 WO 98/00696 A1 describe composiciones y kits para pretratar muestras que han de ser analizadas en cuanto a la presencia y/o cantidad de un analito asociado. La composición incluye un alcohol alquílico inferior en una cantidad de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 40% en volumen, un glicol en una cantidad de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 40% en volumen y un componente acuoso que incluye sal de cobre de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM.

55 EP 0.753.744 A2 proporciona un método de ensayo de una muestra de sangre o de componentes de la sangre en cuanto a la concentración de un ligando de inmunofilina, que consiste en incubar la muestra con un detergente no iónico y una proteasa, inactivar luego la proteasa y determinar a continuación la concentración del ligando de inmunofilina en la muestra.

60

Resumen

Según una primera realización, la presente invención proporciona un método para preparar una muestra de ensayo

para uso en un ensayo para un analito que es una molécula no proteica, cuyo método consiste en poner en contacto la muestra de ensayo con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis, consistiendo el reactivo de lisis en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis, donde se incluye al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos en el reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis, la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4 y, después de la adición del alcohol, la mezcla de lisis es una mezcla homogénea; el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un detergente, y la mezcla de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación.

5 El alcohol puede ser, por ejemplo, metanol, etanol y/o propanol. En realizaciones particulares, la muestra de ensayo incluye una muestra de sangre humana.

Como ventajas del método de preparación de muestras de la invención, se incluye el que la muestra puede ser preparada para su análisis sin una etapa de centrifugación y sin el uso de un detergente.

15 En realizaciones preferidas, se incluye el alcohol en el reactivo de lisis. En variaciones de dichas realizaciones, la proporción entre glicol y alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. Se puede añadir la muestra de ensayo a cualquiera de dichos reactivos de lisis en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.

20 Cuando se lleva a cabo el método antes de un ensayo para un analito que está unido a una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo, el método puede adicionalmente incluir el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un agente que libere el analito de la(s) proteína(s) de unión. El agente de liberación puede ser, por ejemplo, un agente que compita con el analito por la unión a la(s) proteína(s) de unión. En una realización ejemplar, el analito incluye un fármaco inmunosupresor y el agente incluye un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar. Cuando el analito incluye una molécula no proteica, el agente puede, por ejemplo, incluir una proteasa que degrade la(s) proteína(s) de unión.

Otro aspecto de la invención es una mezcla de reactivo de lisis, que comprende: una muestra de ensayo que consiste en una muestra de sangre humana y que puede incluir un analito que sea una molécula no proteica; un reactivo de lisis consistente en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis; y al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, donde la proporción de glicol a alcohol es de 4:1 a 1:4; donde la mezcla de reactivo de lisis es una mezcla homogénea y la mezcla de reactivo de lisis no incluye un detergente y está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación. En realizaciones ejemplares, la proporción de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. Se añade típicamente esta mezcla de glicol-alcohol a la muestra de ensayo, en realizaciones ejemplares, en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.

30 El alcohol puede ser, por ejemplo, metanol, etanol y/o propanol.

La invención también proporciona un método para valorar la presencia o concentración de un analito que es una molécula no proteica en una muestra de ensayo, cuyo método comprende: (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis, consistiendo el reactivo de lisis en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis, donde se incluye al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos en el reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis, la razón de glicol a alcohol es de 4:1 a 1:4 y, tras la adición del alcohol, la mezcla de lisis es una mezcla homogénea; el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un detergente, y la mezcla de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación; y (b) valorar la mezcla de lisis en cuanto al analito.

40 El alcohol puede ser, por ejemplo, metanol, etanol y/o propanol. En realizaciones particulares, la muestra de ensayo incluye una muestra de sangre humana.

En realizaciones ejemplares, se incluye el alcohol en el reactivo de lisis y la proporción entre glicol y alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. Esta mezcla de glicol-alcohol es típicamente añadida a la muestra de ensayo, en realizaciones ejemplares, en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.

Como ventajas del método de preparación de muestras de la invención, se incluye el que la mezcla de lisis sea una mezcla homogénea, adecuada para pipeteado automatizado, sin necesidad de una etapa de centrifugación y sin el uso de un detergente.

60 La mezcla de lisis puede, por ejemplo, ser analizada por inmunoensayo. En realizaciones ejemplares, el analito detectado incluye un fármaco inmunosupresor, tal como, por ejemplo, sirolimus, tacrolimus, everolimus,

temсорolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de cualquiera de estos compuestos.

En realizaciones particulares, el ensayo detecta un analito que está unido a una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo. En dichas realizaciones, el método puede adicionalmente incluir el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un agente que libere el analito de la(s) proteína(s) de unión. El agente de liberación puede, por ejemplo, ser un agente que compita con el analito por la unión a la(s) proteína(s) de unión. En una realización ejemplar, el analito incluye un fármaco inmunosupresor y el agente incluye un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar. Como el analito es una molécula no proteica, el agente puede, por ejemplo, incluir una proteasa que degrade la(s) proteína(s) de unión.

Otro aspecto de la invención es un kit de ensayo que comprende: (a) al menos un anticuerpo o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un analito que es una molécula no proteica; (b) un reactivo de lisis que consta de un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis; y (c) al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, donde el reactivo de lisis y el/los alcohol(es) se combinan y se envasan en un único recipiente y la razón de glicol a alcohol es de 4:1 a 1:4; donde el reactivo de lisis no incluye un detergente y el reactivo de lisis, cuando se mezcla con una muestra de ensayo que incluye una muestra de sangre humana, forma una mezcla de reactivo de lisis que es una mezcla homogénea, y la mezcla de reactivo de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación.

El alcohol puede ser, por ejemplo, metanol, etanol y/o propanol. El reactivo de lisis y el/los alcohol(es) son combinados y envasados en un solo recipiente. En variaciones de dichas realizaciones, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. El kit de ensayo puede eventualmente contener una composición de control que incluya el al menos un analito de (a),

En realizaciones ejemplares, el analito detectado incluye un fármaco inmunosupresor, tal como, por ejemplo, sirolimus, tacrolimus, everolimus, temсорolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de cualquiera de estos compuestos.

En realizaciones particulares, el kit de ensayo incluye adicionalmente un agente que libera el analito de una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo. El agente de liberación puede ser, por ejemplo, un agente que compita con el analito por la unión a la(s) proteína(s) de unión. En una realización ejemplar, el analito incluye un fármaco inmunosupresor y el agente incluye un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar. Como el analito es una molécula no proteica, el agente puede, por ejemplo, incluir una proteasa que degrade la(s) proteína(s) de unión.

Un kit de ensayo preferido ejemplar según 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 sirolimus, tacrolimus, everolimus, temсорolimus, zotarolimus y ciclosporina; (b) un reactivo de lisis que incluye propilenglicol y etanol en una proporción de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2; y (c) una composición de control que incluye el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).

Descripción detallada

La invención utiliza un reactivo de lisis no desnaturizante que puede mezclarse con una muestra de ensayo para producir una mezcla de lisis homogénea. Este enfoque es superior a los métodos de extracción previos que se basan en el uso de detergentes o desnaturizantes.

El uso de detergentes puede resultar problemático en formatos particulares, ya que la cantidad de detergente necesaria para lisar y fragmentar rápidamente las células puede causar espumación, lo cual es inaceptable para muestras que deben ser pipeteadas por la mayoría de los sistemas de pipeteado automatizados, y puede interferir con la inmunquímica en muestras que han de ser analizadas por inmunoensayo. El reactivo de lisis utilizado en la invención produce una muestra que no es susceptible de espumación y elimina la necesidad de detergentes, evitando así las interferencias debidas a los detergentes en la inmunquímica del ensayo.

El uso de desnaturizantes requiere etapas posteriores de centrifugación para eliminar los constituyentes de la sangre precipitados, lo que reduce la eficiencia de este enfoque. Adicionalmente, el uso de solventes orgánicos a la concentración requerida puede dar lugar a una evaporación de la muestra lo suficientemente significativa como para afectar a la concentración del analito. El reactivo de lisis utilizado en la invención produce una mezcla homogénea que resulta adecuada para uso en sistemas de pipeteado automatizados sin necesidad de una etapa de centrifugación y elimina el uso de concentraciones substanciales de solventes orgánicos volátiles.

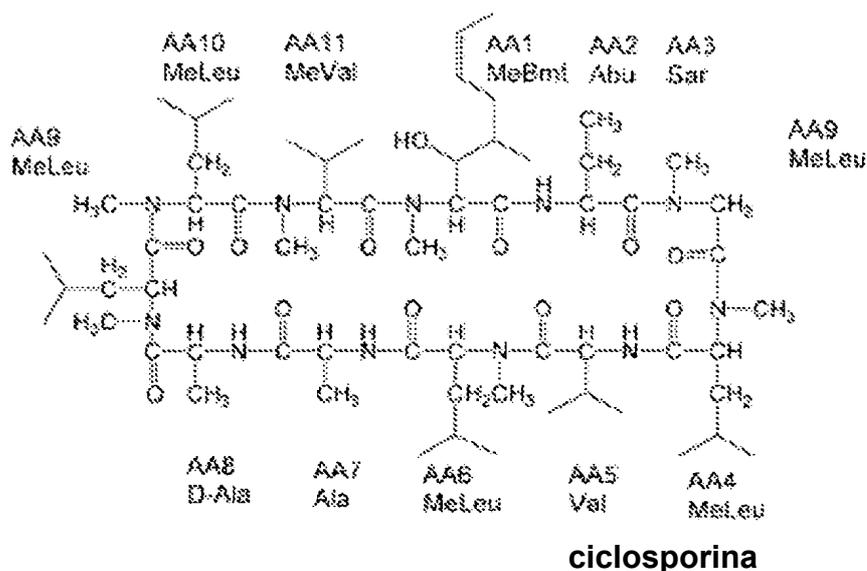
Definiciones

Los términos utilizados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva se definen como se expone a continuación, a menos que se especifique algo diferente.

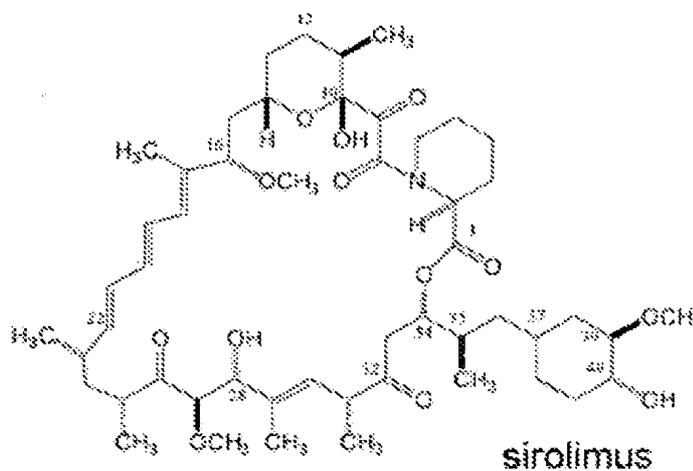
5 Un "fármaco inmunosupresor" o "inmunosupresor", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto terapéutico, ya sea de molécula pequeña o basado en anticuerpos, que tiene la misma estructura química o una similar con respecto a la rapamicina (sirolimus) o a la ciclosporina, también conocida como ciclosporina A. Cualquier análogo conocido o a partir de ahora desarrollado de la rapamicina o de la ciclosporina es considerado aquí como un
10 inmunosupresor. Como inmunosupresores preferidos, se incluyen sirolimus, 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 sirolimus, 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 la
15 supresión de la proliferación de los 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
20 Fórmula C.

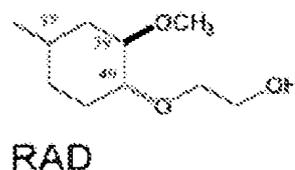
A



B



C



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

5

10

Se han preparado numerosos derivados o análogos de rapamicina. Por ejemplo, éstos incluyen la preparación de derivados éster mono- y di-éster de la rapamicina (Solicitud Internacional PCT WO 92/05179), 27-oximas de la rapamicina (Patente Europea EP 0.467.606), análogo 42-oxo de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.023.262), rapamicinas bicíclicas (Patente EE.UU. N° 5.120.725), dímeros de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.120.727), éteres silílicos de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.120.842) y arilsulfonatos y sulfamatos (Patente EE.UU. N° 5.177.203). La rapamicina fue recientemente sintetizada en su forma enantiomérica natural (K. C. Nicolaou *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4419-4420; S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 7906-7907; S. J. Danishefsky, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9345-9346). La invención comprende reactivos de lisis, métodos de lisis,

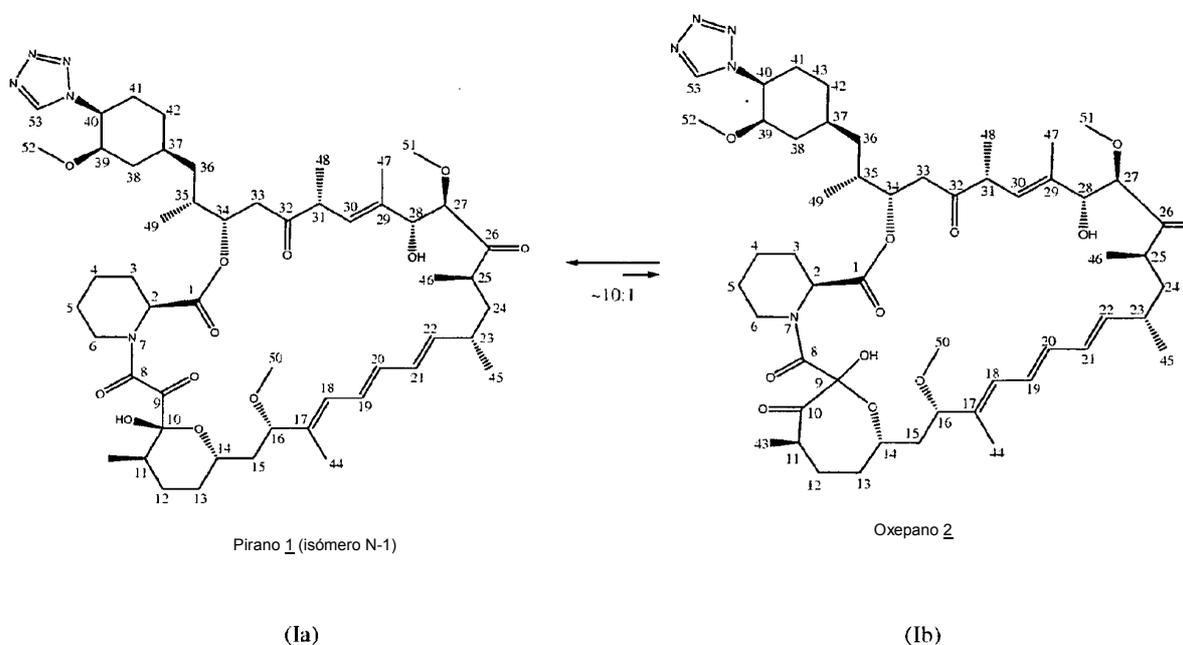
ensayos y kits de ensayo para rapamicina o cualquiera de sus análogos.

Otro análogo inmunosupresor de la rapamicina es FK-506, también conocido como tacrolimus, que 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 de FK-506, se incluyen los productos naturales relacionados FR-900520 y FR-900523, que difieren de FK-506 en su sustituyente alquilo en C-21 y que fueron aislados de *S. hygroscopicus yakushimnaensis*. Otro análogo, FR-900525, producido por *S. tsukubaensis*, difiere de FK-506 en el reemplazo de un resto de ácido piperídico con un grupo prolina. La invención comprende reactivos de lisis, métodos de lisis, ensayos y kits de ensayo para FK-506 o cualquiera de sus análogos. El temsrolimus es otro derivado éster de sirolimus que puede ser monitorizado con la invención.

ABT-578 [40-epi(1-tetrazolil)rapamicina], más conocido actualmente como zotarolimus, es un antibiótico triénico macrólido semisintético derivado de la rapamicina. En la Fórmula D se muestra la estructura del zotarolimus.

Fórmula D.

Los isómeros de zotarolimus



Tal como se utiliza aquí en relación a fármacos inmunosupresores, el término "estructuralmente similar" indica que los fármacos tienen estructuras lo suficientemente similares como para que los fármacos se unan competitivamente a al menos un compañero de unión común (v.g., una proteína de unión).

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 tisulares fijados; y especímenes celulares fijados. Preferiblemente, la muestra de ensayo es una muestra de sangre periférica humana.

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 sus fragmentos, 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 infinidad de genes de regiones variables de inmunoglobulinas. 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 de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "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 a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH 1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de este modo 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 anticuerpos). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos 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, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* utilizando metodologías del ADN recombinante. El término "anticuerpo" también abarca 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 incluya 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 VH y VL se conectan cada uno como una sola cadena polipeptídica, los dominios VH y VL se asocian no covalentemente. Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras convierten las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas de forma natural, 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 se sabido por los expertos en la técnica (véase, *v.g.*, Patentes EE.UU. N° 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. 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 unos compañeros de unión a otros (*v.g.*, un polipéptido y un ligando (analito), dos polipéptidos, un polipéptido y una molécula 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.*, afinidad) para la molécula/secuencia diana es al menos 2 veces mayor, más preferiblemente al menos 5 veces mayor y más preferiblemente al menos 10 ó 20 veces mayor con respecto a 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 utilizado aquí para hacer referencia a un compañero de unión que se une a un analito, preferiblemente de manera específica. Los agentes de captura pueden estar unidos a una fase sólida. Tal como se utiliza aquí, la unión de un agente de captura fijado en fase sólida a un analito forma un "complejo fijado en fase sólida".

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

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

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

10 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.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "reactivo indicador" se refiere a cualquier agente que contacte 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 sustrato (el reactivo indicador) para producir una señal detectable, tal como un producto de reacción coloreado.

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

Se dice que una mezcla de lisis es "homogénea" cuando está lo suficientemente libre de grandes particulados como para permitir un pipeteado preciso y fiable (ya sea manualmente o utilizando un sistema automatizado).

25 I. Recogida y procesado de la muestra

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

30 Los métodos de la invención pueden ser llevados a cabo usando cualquier muestra que pueda contener el analito de interés (v.g., un fármaco inmunosupresor), tal como una muestra de sangre.

35 Se recoge la muestra por cualquier técnica estándar y se la pone luego en contacto con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis. El reactivo de lisis incluye un glicol de dos a seis átomos de carbono. Se incluye en el reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis al menos un alcohol de cinco o menos carbonos. En realizaciones preferidas, el reactivo de lisis incluye el/los alcohol(es). Como glicoles adecuados para uso en el reactivo de lisis, se incluyen, por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol 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.

40 En realizaciones particulares, la proporción entre glicol y alcohol es de 2:1 a aproximadamente 1:2, o de aproximadamente 1:1 (volumen:volumen). En realizaciones más particulares, la proporción entre glicol y alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

45 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 de reactivo de lisis suficiente como para lisar las células en la muestra y producir una mezcla homogénea. Para un reactivo de lisis donde la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4, como se ha descrito anteriormente, se puede añadir 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

50 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. Por ejemplo, se pueden mezclar de aproximadamente 100 μ L a aproximadamente 600 μ L de muestra de sangre con de aproximadamente 50 μ L a aproximadamente 1.200 μ L del reactivo de lisis durante hasta aproximadamente cinco minutos. En ciertas realizaciones, se forma la mezcla de lisis mezclando 150 μ L de muestra de sangre con 300 μ L de reactivo de lisis y agitando vigorosamente en vórtice

55 durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 segundos. En realizaciones preferidas, la lisis se completa en menos de un minuto a temperatura ambiente. Se estudia entonces la mezcla de lisis en cuanto al analito usando un ensayo adecuado.

60 Se produce la mezcla de lisis, lista para el análisis, sin necesidad de centrifugar la muestra.

Se emplea el reactivo de lisis de la invención sin añadir ningún detergente.

En realizaciones particulares, cuando el analito se une a una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo, el

método puede adicionalmente conllevar el contacto de la muestra de ensayo con un agente que libere el analito de la(s) proteína(s) de unión. Este agente puede ser incluido en el reactivo de lisis, si se desea. El agente puede ser, por ejemplo, uno que compita con el analito 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. Así, por ejemplo, si el ensayo es un inmunoensayo, el agente es típicamente uno con el que el anticuerpo relevante no tiene reacción cruzada. Cuando el analito es un fármaco inmunosupresor, el agente puede ser un fármaco inmunosupresor diferente, pero estructuralmente similar. Por ejemplo, el sirolimus y el tacrolimus se unen ambos a FKBP y, por esta razón, se puede usar el sirolimus para liberar el tacrolimus de FKBP y viceversa. Cualquier inmunoensayo ulterior empleará generalmente un anticuerpo que distinga entre sirolimus y tacrolimus. La Patente EE.UU. N° 6.187.547 (concedida el 13 de Feb. de 2001 a Legay y Wenger, que incluye enseñanzas en cuanto a la competición de fármacos inmunosupresores) describe "competidores de unión" útiles para liberar fármacos inmunosupresores de proteínas de unión. Como ejemplos, se incluyen: [Thr², Leu⁵, D-Hiv⁸, Leu¹⁰]Ciclosporina, que pueden liberar ciclosporina.

Como el analito es una molécula no proteica, se puede emplear una proteasa para liberar el analito de la(s) proteína(s) de unión. La proteasa utilizada en el método debe ser una que pueda degradar la proteína de unión, liberando así el analito para el ensayo, y que pueda inactivarse sin afectar de forma adversa a la sensibilidad y a la precisión del ensayo que se ha de llevar a cabo. Se ha de tener cuidado en obtener enzimas libres de otras enzimas contaminantes que podrían no inactivarse por el método de inactivación utilizado. De otro modo, cualquier actividad proteolítica residual podría degradar un anticuerpo utilizado en un inmunoensayo ulterior. Como ejemplos de proteasas, se incluyen proteinasa K, subtilisina, dispasa, termolisina, tripsina, ficina, bromelaina y sus combinaciones.

La proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) es una proteasa no específica dependiente de Ca que puede inactivarse por calor (65°C o superior) y por inhibidores de proteasas específicos, tales como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) o el fluorofosfato de diisopropilo (DFP, Calbiochem, La Jolla, Calif.). La subtilisina (Sigma) es también una proteasa no específica dependiente de Ca que puede inactivarse por calor (55°C o superior), aunque puede inhibirse por un pH ácido o un inhibidor de proteasas específico, tal como PMSF, DFP o aprotinina.

La dispasa (Boehringer Mannheim o Sigma o Calbiochem) y la termolisina (Sigma o Boehringer Mannheim) son metaloproteasas dependientes de Ca, que pueden inactivarse mediante el EDTA, a una concentración de aproximadamente 5 mM, por ejemplo. Cuando se usan dispasa y termolisina combinadas como proteasa, se inactiva preferiblemente la proteólisis por adición de un quelante de cationes divalentes, tal como el EDTA, a una concentración de aproximadamente 5 mM, por ejemplo, en presencia de una sal de zinc, *v.g.*, ZnSO₄, a una concentración de aproximadamente 40 mM, por ejemplo.

La tripsina (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.) escinde proteínas específicamente en el lado del carboxilo de los residuos de lisina o arginina y puede resultar inhibida por calor (90°C o superior) o específicamente inhibida por muchos agentes, incluyendo la aprotinina (inyección de aprotinina anteriormente comercializada como Trasylol® por Bayer, West Haven, CT; inhibidor aún disponible de Calbiochem, La Jolla, CA y otros vendedores), la leupeptina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, o Boehringer Mannheim), el PMSF o inhibidores específicos de tripsina derivados de soja, lima o clara de huevo (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., o Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La ficina es una tiol proteasa que puede inactivarse mediante HgCl₂, a una concentración de aproximadamente 2 mM, por ejemplo. La bromelaina es también una tiol proteasa y puede inactivarse mediante un inhibidor de bromelaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

En realizaciones particulares, la concentración de proteasa es lo suficientemente elevada como para degradar las proteínas de unión en aproximadamente 30 min., preferiblemente en aproximadamente 20 min., y aún así lo suficientemente baja como para permitir una inactivación eficiente de la enzima. Por consiguiente, la concentración de proteasa es preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 2,0 unidades/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 unidad/ml.

Después de la lisis y la liberación con respecto a las proteínas de unión, si es aplicable, se puede medir el analito usando cualquier técnica estándar para detectar ese analito, *v.g.*, inmunoensayo o cromatografía con detección por absorbancia o espectrofotometría de masas. Para la detección de fármacos inmunosupresores, se emplean convenientemente inmunoensayos.

II. Inmunoensayos

A. En general

Los inmunoensayos según la invención pueden ser usados para la identificación cualitativa y/o la cuantificación de

analito que es una molécula no proteica en una muestra de ensayo. Estos métodos son aplicables, por ejemplo, a inmunoensayos de fármacos inmunosupresores, tales como rapamicina (sirolimus), tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos. Dichos inmunoensayos pueden ser llevados a cabo combinando un reactivo de lisis con la muestra de ensayo para formar una mezcla de lisis, como se ha descrito anteriormente. Se puede poner en contacto la mezcla de lisis con al menos un anticuerpo específico para el analito en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al analito, si está presente, para formar una mezcla de ensayo, y se detecta entonces la unión del anticuerpo al analito.

En ciertas realizaciones, se puede conseguir una mayor sensibilidad del ensayo poniendo en contacto la mezcla de lisis con el anticuerpo en presencia de una concentración de sal mayor de aproximadamente 0,4 M (v.g., de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 5,0 M). En realizaciones particulares, la concentración de sal 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 de sal 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 del 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 en cualquier forma conveniente y puede estar presente antes, o ser añadida después, del contacto entre la mezcla de lisis y el anticuerpo. En realizaciones particulares, la sal es aportada en un diluyente de ensayo, que puede también eventualmente incluir uno o más de otros componentes, además de agua (tales como, por ejemplo, un tampón). La concentración de sal en el diluyente de ensayo variará dependiendo de la concentración de sal final deseada y de la cantidad de diluyente añadida a la mezcla de ensayo. Por ejemplo, se podría añadir un diluyente de ensayo que tuviera una concentración de sal de aproximadamente 4,0 M a igual volumen de mezcla de ensayo para obtener una concentración de sal final de aproximadamente 2,0 M.

B. Anticuerpos

En inmunoensayos para la detección cualitativa o cuantitativa de un analito en una muestra de ensayo, se pone en contacto al menos un anticuerpo que se une al analito con una mezcla de lisis sospechosa de contener el analito, para formar un complejo inmune anticuerpo-analito. Para detectar fármacos inmunosupresores, se pueden usar cualesquiera anticuerpos adecuados que se unan al fármaco particular en un inmunoensayo según la invención. Los anticuerpos para cada uno de rapamicina (sirolimus), tacrolimus, zotarolimus, ciclosporina y everolimus son conocidos en la técnica y/o están comercializados, y se puede usar cualquiera de éstos. Se prefiere utilizar el anticuerpo monoclonal que es un componente del ensayo IMx® Sirolimus comercializado por Abbott Laboratories (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para medir sirolimus, o cualquier otro kit de ensayo para Sirolimus comercializado por Abbott Laboratories (v.g., para uso en una plataforma automatizada comercial diferente).

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, seguidos de una inmunización con una preparación fármaco-42-HS-toxoide tetánico al 4º mes. Siete meses después, se administra un refuerzo prefusión intraesplénico al animal usando 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 con polietileno (PEG) estándar con el mieloma SP2/0. Se criban 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 por afinidad el anticuerpo segregado usando Proteína A. Se puede usar un anticuerpo preferido ejemplar generado usando sirolimus como fármaco en los inmunoensayos para sirolimus, everolimus y zotarolimus.

Se describe un anticuerpo preferido ejemplar para uso en inmunoensayos para el 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 AxSYM® Cyclosporine comercializado por Abbott Laboratories para medir ciclosporina.

C. Detección

Los complejos inmunes anticuerpo-analito pueden ser entonces detectados usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede marcar un anticuerpo con un marcaje detectable para detectar la presencia del complejo anticuerpo-analito. La selección de un marcaje particular no es crítica, pero el marcaje seleccionado debe ser capaz de producir una señal detectable, ya sea por sí mismo o junto con una o más sustancias adicionales.

Se conocen en la técnica marcajes detectables útiles, su unión a anticuerpos y 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 ^3H , ^{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; 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, Oregon. Son marcajes preferidos para uso en la invención los marcajes quimioluminiscentes, tales como 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 Raton.

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). Otros agentes copulantes que pueden ser utilizados son conocidos en la técnica. Los métodos de unión de un marcaje detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. 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 analito y que contenga un marcaje detectable a la mezcla de lisis y utilizarlo para detectar la presencia del complejo anticuerpo-analito. Se puede usar cualquier marcaje detectable adecuado en esta realización.

D. Formatos ejemplares

Se pueden llevar a cabo los inmunoensayos de la invención usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, aunque sin limitación, un formato en sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo ensayos de inhibición competitiva tanto hacia delante como inversos) o un formato de polarización de la fluorescencia. Los formatos ejemplares que se describen a continuación son descritos en términos de ensayo de un fármaco inmunosupresor. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la técnica, los formatos descritos son aplicables a cualquier analito no proteico.

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 mezcla de lisis. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes partes del fármaco, para formar un complejo inmune al que se hace referencia como un "sándwich". En general, se pueden usar uno o más anticuerpos para capturar el inmunosupresor en la muestra de ensayo (se hace referencia con frecuencia a estos anticuerpos como un anticuerpo "de captura" o anticuerpos "de captura") y se usan uno o más anticuerpos para unir un marcaje detectable (a saber, cuantificable) al sándwich (se hace referencia con frecuencia a estos anticuerpos como el anticuerpo "de detección" o los anticuerpos "de detección"). En un ensayo en sándwich, se prefiere que los dos anticuerpos que se unen al fármaco no resulten disminuidos por la unión de cualquier otro anticuerpo en el ensayo a su sitio de unión respectivo. En otras palabras, se tendrían que seleccionar los anticuerpos de tal forma que los uno o más primeros anticuerpos que han contactado con una mezcla de lisis sospechosa de contener un inmunosupresor no se unan a todo o parte del sitio de unión reconocido por el segundo 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 utilizados en cantidades en exceso molar en relación a la cantidad máxima de fármaco que se espera en la mezcla de lisis. Por ejemplo, se pueden usar de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por

ml de solución que contiene fase sólida.

5 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" utilizado 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 utiliza aquí, se refiere a cualquier material insoluble o que pueda hacerse insoluble por una reacción ulterior. Los expertos en la técnica conocen fases sólidas o soportes sólidos útiles, y estos últimos 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 (o de otros animales) y Duracytes® (una marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.), que son eritrocitos "fijados" por aldehído pirúvico y formaldehído, y otros. Como métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas, se incluyen interacciones iónicas, hidrofóbicas y covalentes y similares. La fase sólida puede ser seleccionada en cuanto a su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar el agente de captura. Alternativamente, la fase sólida puede incluir un receptor adicional que tenga la capacidad de atraer e inmovilizar el agente de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que tenga una carga opuesta con respecto al propio agente de captura o a una sustancia cargada conjugada al agente de captura. Como otra alternativa más, el receptor puede ser cualquier compañero de unión específica que esté inmovilizado sobre (unido a) la fase sólida y que tenga la capacidad de 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 la realización del ensayo o durante la realización del ensayo.

25 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 copulante químico 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, el soporte sólido puede ser derivatizado 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.

30 Está dentro del alcance de la presente invención el hecho de que la fase sólida puede también incluir 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. En general, se prefieren estructuras microporosas, pero también se pueden usar materiales con 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 grosor 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 preferiblemente es de aproximadamente 0,025 a 15 micras, especialmente de aproximadamente 0,15 a 1,5 micras. La superficie de dichos soportes puede ser activada por procesos químicos que provocan la 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.

45 Después de poner en contacto la mezcla de lisis sospechosa de contener, o que contiene, el inmunosupresor con el al menos un primer anticuerpo de captura, se incuba la mezcla de ensayo resultante para permitir la formación de un complejo primer anticuerpo (o múltiples anticuerpos) de captura-fármaco. Se puede llevar a cabo 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 al menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 4-20 minutos y más preferiblemente de aproximadamente 17-19 minutos.

50 Tras la adición de un agente de detección y la formación de un complejo marcado, se cuantifica la cantidad de marcaje en el complejo usando 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 usando un contador de centelleo. Si el marcaje es un marcaje fluorescente, se cuantifica el marcaje estimulando el marcaje con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detectando 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. Además de utilizar diluciones seriadas del fármaco, se puede generar la curva estándar gravimétricamente, por espectroscopia de masas y por otras técnicas conocidas en este campo.

En un formato competitivo hacia delante preferido, se usa una alícuota de fármaco, o análogo del mismo, marcado 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 secuencial o simultáneamente un anticuerpo inmovilizado con la muestra de ensayo y un fármaco o análogo del mismo marcado. Se puede marcar el fármaco o análogo del fármaco con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables discutidos anteriormente. En este ensayo, se puede inmovilizar el anticuerpo de captura sobre un soporte sólido usando las técnicas previamente aquí discutidas. Alternativamente, se puede copular el anticuerpo de captura con un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

Se incuban el fármaco o análogo de fármaco marcado, la mezcla de lisis y el anticuerpo 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, del resto de la mezcla de ensayo antes de la cuantificación del marcaje detectable. Independientemente de si se separa el complejo anticuerpo-fármaco del resto de la mezcla 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 usando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopia de masas, gravimétricamente y por otras técnicas conocidas en este campo.

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

En un ensayo competitivo inverso, se puede poner en contacto secuencial o simultáneamente un fármaco inmunosupresor o análogo del mismo inmovilizado con una mezcla de lisis y al menos un anticuerpo marcado. Se puede marcar el anticuerpo con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables discutidos anteriormente. El fármaco o análogo de fármaco puede unirse 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 mezcla de lisis 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 mezcla de ensayo de la presencia del complejo anticuerpo-fármaco inmovilizado por técnicas conocidas en este campo, tales como el 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 usando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopia 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 mezcla de lisis no marcada que contiene el fármaco inmunosupresor para formar un complejo anticuerpo-fármaco no marcado. Se pone luego 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 mezcla 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 utilizando una curva estándar.

El uso de microscopía con 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 un agente de captura a una fase sólida que tiene una superficie adecuada para el barrido. El agente de captura puede, por ejemplo, adsorberse 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. Tras la unión del agente de captura, se pone en contacto la mezcla de lisis con la fase sólida y se usa un microscopio con 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 Solicitud EE.UU. N°

662.147.

Los inmunoensayos según la invención pueden ser también llevados a cabo usando un Sistema MicroElectroMecánico (MEMS). Los MEMS son estructuras microscópicas integradas sobre silicio que combinan elementos mecánicos, ópticos y fluidos con la electrónica, con lo que permiten una conveniente detección de un analito de interés. Un ejemplo de dispositivo MEMS adecuado para uso en la invención es la matriz multisoporte de Protiveris. Esta matriz se basa en la actuación quimiomecánica de microsoportes de silicio especialmente diseñados y la posterior detección óptica de las deflexiones de los microsoportes. Cuando se reviste por un lado con un compañero de unión, un microsoporte se inclinará cuando se le exponga 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 al microsoporte.

En otras realizaciones, se llevan a cabo los inmunoensayos según la invención utilizando detección electroquímica. Heineman y colaboradores han descrito un procedimiento básico para la detección electroquímica. Éste conlleva 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 quinonimina), que es electroquímicamente reversible a potenciales que no interfieren con la reducción de oxígeno y agua a pH 9,0, donde la AP exhibe una actividad óptima. El PAP_R no provoca ensuciamiento de los electrodos, a diferencia del fenol, cuyo precursor, el fosfato de fenilo, es frecuentemente utilizado como sustrato enzimático. Aunque el PAP_R sufre oxidación por el aire y la luz, se previene ésta fácilmente a pequeñas escalas y cortos marcos temporales. Se han descrito previamente límites de detección picomolares para el PAP_R y límites de detección de femtogramos para la IgG conseguidos 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 electroquímicos de detección en las Patentes EE.UU. N° 7.045.364 (concedida el 16 de Mayo de 2006), 7.045.310 (concedida el 16 de Mayo de 2006), 6.887.714 (concedida el 3 de Mayo de 2005), 6.682.648 (concedida el 27 de Enero de 2004) y 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 fijados sobre sí misma una pluralidad de anticuerpos, donde cada uno está destinado a estudiar la presencia de diferentes analitos en la muestra. En una realización ejemplar, la fase sólida puede consistir en una pluralidad de diferentes regiones sobre una superficie, donde cada región tiene un anticuerpo particular fijado en la misma.

Los formatos múltiples pueden, aunque no tienen por qué, emplear una pluralidad de marcajes, donde se usa cada marcaje para la detección de un analito particular. Por ejemplo, se pueden detectar múltiples analitos diferentes sin usar una pluralidad de marcajes cuando hay una pluralidad de agentes de captura, tales como anticuerpos, fijados 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 diferente agente de captura puede estar fijado a un electrodo diferente, que puede, por ejemplo, estar formado sobre una superficie de un soporte sólido, en un canal de un dispositivo microfluido o en un capilar.

III. Kits de ensayo

La invención también proporciona kits de ensayo para estudiar muestras de ensayo en cuanto a un analito según se define en las reivindicaciones 22-31. 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 incluye generalmente un envase con uno o más recipientes que contienen los reactivos, como una o más composiciones independientes o, eventualmente, como mezcla cuando la compatibilidad de los reactivos lo permite. El kit de ensayo puede incluir también otro(s) material(es), que puede(n) ser 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, el lavado o 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 o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un analito que es una molécula no proteica, o un analito que es un fármaco inmunosupresor; y (b) un reactivo de lisis que incluye: un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos. En realizaciones ejemplares, útiles para realizar inmunoensayos para fármacos inmunosupresores, el anticuerpo puede ser específico para rapamicina (sirolimus), tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de cualquiera de estos compuestos.

En ciertas realizaciones, el reactivo de lisis incluye metanol, etanol, propanol o una mezcla de cualquiera de estos alcoholes. La proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4; más particularmente, en realizaciones ejemplares, es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. El reactivo de lisis utiliza un nivel de glicol que representa entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis. En otra realización, se usa el alcohol solo en el reactivo de lisis, sin adición de glicol.

Si se desea, el kit de ensayo puede adicionalmente incluir una composición de control que incluya el analito que está siendo estudiado.

En realizaciones particulares, los kits de ensayo según la invención pueden incluir uno o más agentes que liberen el analito de una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo.

Como agentes de liberación adecuados, se incluyen agentes que compiten con el analito por la unión a una o más proteínas de unión, como se ha descrito anteriormente, y proteasas, que pueden ser usadas para degradar proteínas de unión y liberar analitos no proteicos. Como ejemplos de proteasas, se incluyen proteinasa K, subtilisina, dispasa, termolisina, tripsina, ficina, bromelaina y sus combinaciones. Cualquier proteasa proporcionada en kits de la invención debe ser proporcionada de un modo que facilite la producción de una mezcla de lisis que contenga los componentes en una concentración adecuada, como se ha descrito anteriormente.

Los kits según la invención pueden incluir una fase sólida y un agente de captura que está fijado a la fase sólida o que se fija a la fase sólida durante el ensayo. En realizaciones ejemplares, 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 adicionalmente incluir 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 también incluir al menos un marcaje indirecto. Si el marcaje empleado requiere generalmente 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. Se pueden fijar las instrucciones incluidas en los kits de la invención al material del envase o se pueden incluir como un prospecto del envase. Aunque las instrucciones son típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. Esta invención contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, aunque sin limitación, medios de almacenamiento electrónicos (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 cualquiera de los formatos ejemplares aquí presentados, y cualquier ensayo o kit según la invención, pueden ser adaptados u optimizados para uso en sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquéllos en los cuales hay una fase sólida que comprende una micropartícula), como se describe, v.g., en las Patentes EE.UU. N° 5.089.424 y 5.006.309, y como, v.g., los comercializados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo, aunque sin limitación, las plataformas ARCHITECT®, AxSYM®, IMX®, ABBOT PRISM® y Quantum II de Abbott Laboratories, así como otras plataformas.

Adicionalmente, los ensayos y kits de la presente invención pueden eventualmente ser adaptados u optimizados para sistemas de ensayo en el punto de atención, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico Point of Care (i-STAT®) de Abbott Laboratories. Se describen inmunosensores y métodos de fabricación y de operación 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, aunque no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo

Lisis e inmunoensayo de una muestra de sangre en cuanto a sirolimus

5 Este ejemplo ilustra el uso de un reactivo de lisis no desnaturalizante para lisar una muestra de sangre y llevar a cabo un inmunoensayo automatizado para sirolimus.

10 Se prepara un reactivo de lisis mezclando propilenglicol y etanol en una proporción volumen:volumen de 4:1 y se diluye después con agua hasta que el propilenglicol es de entre el 10% y el 40% (vol.). Se realiza la lisis de una muestra de sangre mezclando 100 µl de muestra con 200 µl de reactivo de lisis por agitación vigorosa en vórtice durante 5-10 segundos. La lisis se completa en menos de 1 min. a temperatura ambiente. Se estudia la mezcla de lisis resultante en un analizador ARCHITECT® i20000® automatizado (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) por:

15 (1) Mezcla de 10-40 µl de la mezcla de lisis con 50 µl de micropartículas revestidas con anticuerpo de cabra antirratón (de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y anticuerpo de ratón anti-sirolimus (preparado como se describe más adelante).

(2) Incubación de la mezcla de ensayo durante aproximadamente 18 minutos a 33-38 grados C. El sirolimus de la muestra se une al anticuerpo anti-sirolimus sobre las micropartículas.

20 (3) Adición de 20 µl de conjugado acridinio-sirolimus a la mezcla de reacción.

(4) Incubación de la mezcla de reacción durante aproximadamente 4 minutos a 33-38 grados C. El conjugado acridinio-sirolimus se une a los sitios de unión anti-sirolimus libres.

(5) Lavado de las micropartículas con un tampón fosfato.

(6) Adición de Pre-trigger (solución ácida) y Trigger (solución básica) para hacer que el marcaje acridinio-sirolimus capturado emita luz, la cual es medida por el instrumento.

25 Se produjo el anticuerpo de unión a sirolimus como sigue: Se administraron a ratones RBf/Dnj hembras 3 refuerzos mensuales de un inmunógeno sirolimus-27-CMO-toxoide tetánico, seguidos de una inmunización con una preparación de sirolimus-42-HS-toxoide tetánico al 4º mes. Siete meses más tarde, se administró un refuerzo prefusión intraesplénico a los animales usando el inmunógeno sirolimus-27-CMO-toxoide tetánico 3 días antes de la fusión. Se aislaron las células B esplénicas y se usaron en una fusión PEG estándar con el mieloma SP2/0. Se cribaron los cultivos confluentes en cuanto a actividad anti-sirolimus 10-14 días después en un EIA de microtitulación y se clonaron los cultivos positivos usando la técnica de clonación por dilución limitante. Se ampliaron los clones aislados en medio de cultivo de tejidos IMDM c/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se purificó el anticuerpo segregado por afinidad usando Proteína A.

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una muestra de ensayo para uso en un ensayo para un analito que es una molécula no proteica, cuyo método consiste en poner en contacto la muestra de ensayo con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis, incluyendo el reactivo de lisis un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis;
 5 donde se incluye en el reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4 y, tras la adición del alcohol, la mezcla de lisis es una mezcla homogénea;
 10 el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un detergente; y la mezcla de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación.
2. Un método para valorar la presencia o concentración de un analito que es una molécula no proteica en una muestra de ensayo, cuyo método consiste en:
 15 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis, incluyendo el reactivo de lisis un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis,
 20 donde se incluye el en reactivo de lisis o se añade a la mezcla de lisis al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4 y, tras la adición del alcohol, la mezcla de lisis es una mezcla homogénea;
 25 el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un detergente; y la mezcla de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación; y
 (b) estudiar la mezcla de lisis en cuanto al analito.
3. El método de la reivindicación 2, donde el ensayo consiste en un inmunoensayo.
4. El método de la reivindicación 2, donde el analito incluye un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ciclosporina.
5. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde el alcohol está incluido en el reactivo de lisis.
6. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra de ensayo consiste en una muestra de sangre humana.
7. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
8. El método de la reivindicación 5, donde la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:2.
9. El método de la reivindicación 5, donde la muestra de ensayo es añadida al reactivo de lisis en una proporción de 2:1 a 1:2.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el ensayo detecta un analito que está unido a una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo, incluyendo el método adicionalmente el contacto de la muestra de ensayo o de la mezcla de lisis con un agente que libera el analito de dichas una o más proteínas de unión.
11. El método de la reivindicación 10, donde el agente compite con el analito por la unión a dichas una o más proteínas de unión.
12. El método de la reivindicación 11, donde el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el agente consiste en un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar.
13. El método de la reivindicación 10, donde el agente incluye una proteasa que degrada dichas una o más proteínas de unión.
14. Una mezcla de reactivo de lisis constituida por:
 60 una muestra de ensayo consistente en una muestra de sangre humana y que puede contener un analito que es una molécula no proteica;
 un reactivo de lisis que comprende:

- un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis; y
al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, donde la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4; donde
- la mezcla de reactivo de lisis es una mezcla homogénea; y
la mezcla de reactivo de lisis no incluye un detergente y está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación.
15. La mezcla de reactivo de lisis de la reivindicación 14, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
16. La mezcla de reactivo de lisis de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, donde la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:2.
17. La mezcla de reactivo de lisis de la reivindicación 14, donde la proporción entre la muestra de ensayo y el reactivo de lisis es de 2:1 a 1:2.
18. La mezcla de reactivo de lisis de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde la mezcla de reactivo de lisis incluye adicionalmente un agente que libera el analito de una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo.
19. La mezcla de reactivo de lisis de la reivindicación 18, donde el agente compite con el analito por la unión a dichas una o más proteínas de unión.
20. La mezcla de reactivo de lisis de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, donde el analito es un fármaco inmunosupresor y el agente consiste en un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar.
21. La mezcla de reactivo de lisis de la reivindicación 18, donde el agente incluye una proteasa que degrada dichas una o más proteínas de unión.
22. Un kit de ensayo que comprende:
- (a) al menos un anticuerpo o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un analito que es una molécula no proteica;
 - (b) un reactivo de lisis constituido por un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, donde el nivel de glicol es de entre el 10% y el 40% del reactivo de lisis; y
 - (c) al menos un alcohol que tiene cinco o menos carbonos, donde el reactivo de lisis y el/los alcohol(es) están combinados y envasados en un solo recipiente y la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:4; donde:

el reactivo de lisis no incluye un detergente; y
el reactivo de lisis, cuando se mezcla con una muestra de ensayo consistente en una muestra de sangre humana, forma una mezcla de reactivo de lisis que es una mezcla homogénea, y la mezcla de reactivo de lisis está lista para el análisis sin necesidad de una etapa de centrifugación.
23. El kit de ensayo de la reivindicación 22, donde el analito consiste en un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ciclosporina.
24. El kit de ensayo de la reivindicación 22, que adicionalmente incluye una composición de control que contiene el al menos un analito de (a).
25. El kit de ensayo de la reivindicación 22, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
26. El kit de ensayo de la reivindicación 22, donde la proporción entre glicol y alcohol es de 4:1 a 1:2.
27. El kit de ensayo de la reivindicación 22, donde el kit de ensayo incluye adicionalmente un agente que libera el analito de una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo.
28. El kit de ensayo de la reivindicación 27, donde el agente compite con el analito por la unión a dichas una o más proteínas de unión.

29. El kit de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 28, donde el analito es un fármaco inmunosupresor y el agente consiste en un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar.

5 30. El kit de ensayo de la reivindicación 27, donde el agente incluye una proteasa que degrada dichas una o más proteínas de unión.

31. El kit de ensayo de la reivindicación 22 donde:

- 10 (a) el al menos un analito es al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ciclosporina;
- (b) el reactivo de lisis incluye propilenglicol y etanol en una proporción de 4:1 a 1:2; y

el kit de ensayo incluye además una composición de control que contiene el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).