

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 311**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/94** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2007** **E 07869484 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015** **EP 2232264**

54 Título: **Reactivo de extracción de fármacos inmunosupresores para inmunoanálisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.02.2016**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)**  
**100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 559 311 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 extracción de fármacos inmunosupresores para inmunoanálisis**5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a inmunoanálisis de diagnóstico para determinar los niveles de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre del paciente, y en particular se refiere al uso de una composición de reactivo de extracción de fármaco inmunosupresor mejorada.

10

**Antecedentes**

15

Muchos analitos de interés clínico son absorbidos por las células o forman complejos con uno o más de otros componentes de la muestra de ensayo. Por consiguiente, para obtener una medición exacta de la cantidad de analito presente en la muestra, es preferible tratar la muestra, y/o llevar a cabo el análisis en condiciones, de tal manera que el analito es liberado de las células u otros componentes para su detección en el análisis.

20

25

Por ejemplo, los fármacos inmunosupresores tales como sirolimus (también conocido como rapamicina), tacrolimus, everolimus, temsolorimus y ciclosporina son eficaces para el tratamiento del rechazo de órganos o tejidos después de la cirugía de trasplante, de la enfermedad de injerto contra anfitrión y de enfermedades autoinmunitarias en seres humanos. Durante la terapia con fármaco inmunosupresor, el seguimiento de los niveles de concentración en sangre del inmunosupresor es un aspecto importante de la atención clínica porque los niveles de fármaco insuficientes conducen al rechazo del injerto (órgano o tejido) y los niveles excesivos conducen a efectos secundarios y toxicidades no deseados. Por lo tanto, los niveles en sangre de inmunosupresor se miden de manera que las dosificaciones de los fármacos se puedan ajustar para mantener el nivel de fármaco a la concentración apropiada. Por lo tanto los análisis de diagnóstico para la determinación de los niveles en sangre de los inmunosupresores han encontrado un amplio uso clínico.

30

35

Inicialmente, el inmunosupresor debe ser extraído y separado de los otros componentes de la muestra del paciente. La mayor parte del fármaco inmunosupresor en la muestra del paciente está presente en un complejo con diversas moléculas "portadoras", tales como proteínas de unión. Sirolimus, tacrolimus y ciclosporina se encuentran predominantemente en los glóbulos rojos de la sangre de especímenes de los pacientes y están asociados con proteínas de unión específica, FKBP para sirolimus y tacrolimus, y ciclofilina para ciclosporina. Para asegurar una medición precisa de la concentración total de fármaco en el espécimen, el fármaco unido a las proteínas de unión se libera preferiblemente antes de la cuantificación. Tras su extracción de las proteínas de unión, el fármaco se puede medir de varias maneras diferentes, incluyendo por medio de inmunoanálisis o cromatografía con detección espectrofotométrica de la absorbancia o de la masa.

40

45

50

La extracción de sirolimus de sus proteínas de unión en la sangre a menudo se logra mediante tratamiento con disolventes orgánicos, tales como acetonitrilo, metanol, o éter dietílico. Estos disolventes desnaturalizan las proteínas de unión y liberan el fármaco. El uso de disolventes orgánicos puede ser problemático, sin embargo, cuando el inmunoanálisis se utiliza posteriormente para detectar el fármaco liberado debido a que la mayoría de los disolventes orgánicos, que desnaturalizan rápidamente y por completo las proteínas de unión, no son compatibles con los inmunoanálisis. O bien son demasiado rigurosos o bien crean una muestra bifásica. El metanol se ha empleado típicamente para extraer sirolimus, tacrolimus o ciclosporina de especímenes de sangre antes del inmunoanálisis. Sin embargo, se debe lograr un cuidadoso equilibrio de tal manera que la concentración de metanol sea suficiente para liberar el fármaco de la proteína de unión, pero no tanto como para interferir con el inmunoanálisis posterior. El uso de metanol y otros disolventes orgánicos utilizados normalmente crea un problema adicional debido a que estos disolventes tienen una mayor presión de vapor que el agua. Como resultado, el sobrenadante de extracción que contiene el fármaco inmunosupresor se evapora rápidamente lo que ocasiona la inexactitud en la medición de la concentración de fármaco. Los disolventes de metanol o acetonitrilo ampliamente utilizados también crean problemas de manipulación y eliminación para los laboratorios.

55

60

Los inmunoanálisis para fármacos inmunosupresores se encuentran disponibles en una variedad de formatos, pero todos utilizan la unión de un anticuerpo o una proteína de unión (p. ej., FKBP) al fármaco inmunosupresor. Un inmunoanálisis utilizado comúnmente es un análisis que implica la unión de un primer anticuerpo al inmunosupresor y la unión del inmunosupresor marcado (p. ej., acridinio-sirolimus) a los sitios de unión del anticuerpo libres restantes, seguido de la cuantificación mediante detección de la marca. La eficacia de estos inmunoanálisis se ve afectada por el disolvente concreto de extracción y desnaturalización del inmunosupresor que se utiliza.

D1 - el documento WO 2008/082982 se refiere a inmunoanálisis para fármacos inmunosupresores llevados a cabo en condiciones de alta concentración de sal para lograr una mejor sensibilidad.

D2 - se refiere a una notificación previa a la comercialización de Fujirebio Diagnostics que proporciona información de seguridad y eficacia a la Administración Federal de Fármacos de los Estados Unidos (FDA) referente al IMx<sup>®</sup> ARCHITECT Sirolimus Microparticle Enzyme Immunoassay de Abbott.

D3 - Grenier, et al. "Multi-site Evaluation of the Sirolimus Assay\* en el Abbott ARCHITECT® Analyzer", American Association for Clinical Chemistry Annual meeting, 23 - 27 de julio de 2006, se refiere a un estudio que evalúa el rendimiento del análisis ARCHITECT Sirolimus en 3 sitios.

5 D4 - Kohashi, et al., Analytica Chimica Acta 365 (1998) 177-182, se refiere a un método fluorimétrico para la determinación de bilirrubina total en suero.

10 Un objeto de la invención es proporcionar, para el uso con inmunoanálisis, una composición mejorada de reactivo de extracción de fármaco inmunosupresor que tenga una baja presión de vapor, miscibilidad con agua, suficiente poder de desnaturalización del inmunosupresor y compatibilidad con otros reactivos de inmunoanálisis. Semejante composición de reactivo de extracción sería ventajosa también para métodos que no fueran de inmunoanálisis (p. ej., determinaciones cromatográficas) ya que una presión de vapor más baja, un poder de desnaturalización suficiente y una miscibilidad con agua harían que estos métodos fueran más fáciles de utilizar.

### 15 Compendio

20 Se describe en la presente memoria una composición mejorada de reactivo de extracción y métodos para la extracción de un fármaco inmunosupresor, tal como sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsolorimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de los mismos, de muestras de sangre, a la vez que proporciona un extracto de la muestra de ensayo que tiene una baja presión de vapor y es compatible con los componentes del inmunoanálisis. La composición de reactivo comprende dimetilsulfóxido (DMSO), al menos una sal de metal divalente y agua. La composición de reactivo preferida de la descripción comprende DMSO, la sal de metal y al menos uno de sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, sulfato de cadmio, sulfato de cobre y mezclas de dos o más de estas sales metálicas. Una composición de reactivo más preferida comprende DMSO, la sal de metal y al menos un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, que es preferiblemente al menos uno de etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) o mezclas de EG y PG. Aunque DMSO, EG y PG son disolventes de baja presión de vapor que son miscibles en agua y tienen un uso rutinario en el laboratorio, no se han empleado como desnaturalizantes de proteínas, sino más bien se han añadido a menudo a mezclas de proteínas y células como agentes estabilizantes. En contraste, los autores de la presente invención han encontrado que en presencia de cationes metálicos divalentes, el DMSO a concentraciones más elevadas puede servir como desnaturalizante de proteínas eficaz para liberar fármacos inmunosupresores. Además, en la presencia de cationes divalentes, menores concentraciones de DMSO cuando se mezclan con EG o PG también pueden servir como un desnaturalizante de proteínas eficaz incluso a pesar de que las concentraciones de los disolventes cuando se utilizan de forma independiente no sean desnaturalizantes. Los extractos de la muestra de ensayo que resultan del uso de cada una de estas combinaciones tienen una baja presión de vapor y son compatibles con análisis inmunoquímicos.

35 La descripción también comprende un método para la detección del nivel de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) combinar una composición de reactivo de extracción que comprende DMSO, una sal de metal divalente y agua con la muestra de ensayo para formar un extracto de la muestra de ensayo; (b) combinar el extracto de la muestra de ensayo con al menos un anticuerpo o proteína que sean inmunológicamente reactivos con un fármaco inmunosupresor para formar una mezcla de análisis; (c) incubar la mezcla de análisis en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el anticuerpo y el fármaco inmunosupresor, si lo hubiera, que está presente en la muestra; y (d) detectar la presencia de cualquier complejo formado. La detección de la presencia de complejos en la etapa (d) se puede llevar a cabo utilizando un inmunosupresor al que se ha unido un compuesto generador de señal para la unión a los sitios de unión del anticuerpo libres que queden en el analito. Un aspecto adicional establece que la detección de la presencia de complejos en la etapa (d) se lleve a cabo utilizando un anticuerpo detectable que se una a los complejos formados en la etapa (c).

50 La descripción también comprende un kit de reactivos para un análisis de los niveles en sangre de un fármaco inmunosupresor que comprende un recipiente que contiene la composición de reactivo de extracción que comprende DMSO, al menos una sal de metal divalente y el agua, y más preferiblemente que comprende también etilenglicol, propilenglicol, o cualquier análogo de glicol adecuado o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el kit de reactivos comprende adicionalmente un segundo recipiente con al menos un anticuerpo o proteína específicos para el fármaco inmunosupresor. Más preferiblemente, el kit de reactivos contiene un tercer recipiente que contiene una composición de control que comprende un fármaco inmunosupresor, por ejemplo, un inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de los mismos.

La invención proporciona:

60 1) Un método para la evaluación de la concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre humana que comprende las etapas de: (a) combinar una composición de reactivo de extracción que comprende al menos 50% en volumen de DMSO, un glicol seleccionado entre etilenglicol, propilenglicol, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono o mezclas de los mismos, y sal metálica de cinc de 30 mM a 75 mM con una muestra de sangre humana y el agua para formar un extracto de la muestra de ensayo; (b) combinar al menos un anticuerpo o proteína capaces de unirse a un fármaco inmunosupresor con el extracto de la muestra de ensayo

para formar una mezcla de ensayo, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina; (c) incubar la mezcla de ensayo en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el anticuerpo y el fármaco inmunosupresor, si lo hubiera, que está presente en la muestra y es inmunológicamente reactivo con el anticuerpo; y (d) detectar la presencia de cualquier complejo formado.

2) Un método para la evaluación de la concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre humana, que comprende poner en contacto una muestra de sangre humana con una composición de reactivo de extracción que comprende al menos 50% en volumen de dimetilsulfóxido, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono o mezclas de los mismos, y una sal metálica de cinc de 30 mM a 75 mM y agua para producir una fase sólida y una fase de sobrenadante, separar la fase de sobrenadante, y analizar la fase de sobrenadante mediante inmunoanálisis para determinar la concentración de un fármaco inmunosupresor, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

3) El método del apartado 1, que comprende adicionalmente la separación de cualquier fase sólida resultante del contacto de la muestra de sangre humana con la composición de reactivo de extracción de cualquier fase de sobrenadante resultante y el análisis de la fase de sobrenadante para determinar un fármaco inmunosupresor.

4) El método de los apartados 1 a 3, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), o mezclas de EG y PG.

5) El método de cualquiera de los apartados 1 a 4 en donde la sal metálica de cinc comprende sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, o mezclas de dos o más de estas sales metálicas.

6) El método de cualquiera de los apartados 1 a 5 en donde la composición de reactivo de extracción se pone en contacto con la muestra de sangre a una temperatura de al menos 30 grados centígrados.

7) El método de cualquiera de los apartados 1 a 6 en donde la composición de reactivo de extracción tiene una presión de vapor inferior a la presión de vapor de agua a 20 grados centígrados y a la presión atmosférica normal.

8) Una composición de reactivo de extracción para la extracción de un fármaco inmunosupresor de una muestra de sangre, comprendiendo la composición al menos 50% en volumen de dimetilsulfóxido, un glicol seleccionado entre etilenglicol, propilenglicol, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono o mezclas de los mismos, y una sal metálica de cinc de 30 mM a 75 mM y agua, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

9) El reactivo de extracción del apartado 8, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), o mezclas de EG y PG.

10) La composición de reactivo de extracción del apartado 8 en donde la composición de reactivo de extracción comprende una sal metálica de cinc seleccionada del grupo que consiste en sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, o mezclas de dos o más de estas sales metálicas.

11) Un kit de ensayo que comprende recipientes separados, conteniendo cada uno un componente seleccionado entre (a) al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina; y (b) una composición de reactivo de extracción que comprende al menos 50% en volumen de dimetilsulfóxido de la composición de reactivo de extracción, un glicol seleccionado entre etilenglicol, propilenglicol, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono o mezclas de los mismos, y una sal metálica de cinc de 30 mM a 75 mM y agua.

12) El kit de ensayo del apartado 11, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), o mezclas de EG y PG.

13) El kit de ensayo del apartado 11 ó 12 que comprende adicionalmente un recipiente que contiene una composición de control que comprende al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

14) El kit de ensayo del apartado 11 a 13 en donde la sal de cinc comprende sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc o cloruro de cinc.

15) El kit de ensayo del apartado 11, en donde dicho kit de ensayo que comprende recipientes separados, conteniendo cada uno un componente seleccionado entre (a) al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus y ciclosporina; y (b) una composición de reactivo de extracción que comprende adicionalmente etilenglicol, propilenglicol o mezclas de los mismos al 30% - 33% en volumen de la composición de reactivo de extracción, y que comprende sulfato de cinc; y una composición de control que comprende al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

La invención tiene una capacidad significativa para proporcionar inmunoanálisis de mayor sensibilidad para determinar los niveles de concentración en sangre de sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsolorimus, zotarolimus y ciclosporina. La concentración de reactivo de extracción de la invención permite una medición más precisa de los niveles de fármaco, a la vez que proporciona una mayor facilidad de uso para el laboratorio clínico.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados experimentales de la extracción de sirolimus a partir de muestras de sangre utilizando DMSO y sulfato de cinc.

La Figura 2 muestra los resultados experimentales de la extracción de sirolimus a partir de muestras de sangre utilizando DMSO y cantidades variables de sulfato de cinc.

5 La Figura 3 muestra los resultados experimentales de la extracción de sirolimus de muestras de sangre utilizando DMSO, EG y sulfato de cinc.

La Figura 4 muestra los resultados experimentales del calentamiento de la mezcla de extracción de muestras de sangre y la composición de reactivo de extracción de la invención.

10 La Figura 5 muestra una comparación de las tasas de evaporación extracto de la muestra como resultado del uso de un desnaturalizante de metanol de la técnica anterior y del uso de la invención.

## Descripción detallada

### I. Generalidades

15 La descripción comprende composiciones de reactivos de extracción útiles para la extracción y la desnaturalización de fármacos inmunosupresores tales como sirolimus a partir de una muestra de sangre; métodos para la cuantificación de los niveles de fármaco inmunosupresor utilizando las composiciones de reactivos de extracción de la descripción y los kits de diagnóstico que comprenden las composiciones de reactivos de extracción de la descripción. Los métodos preferidos de la descripción comprenden inmunoanálisis que utilizan miembros de unión específica inmunorreactivos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, o proteínas de unión (p. ej., FKBP) para la formación de complejos con el analito fármaco inmunosupresor.

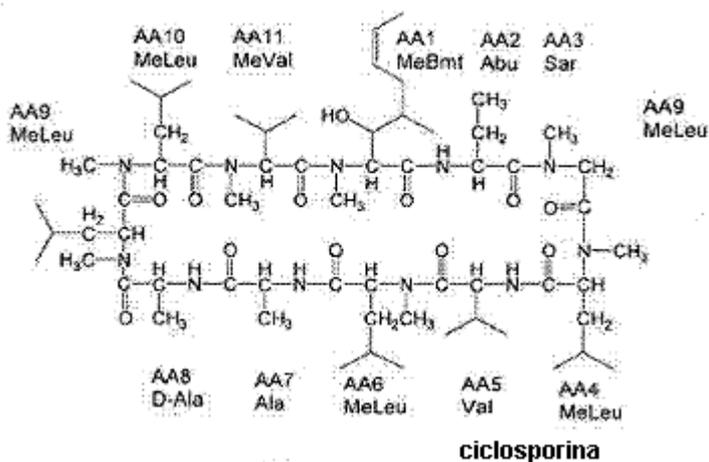
### Definiciones

25 Los términos utilizados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva se definen como se indica a continuación a menos que se especifique lo contrario.

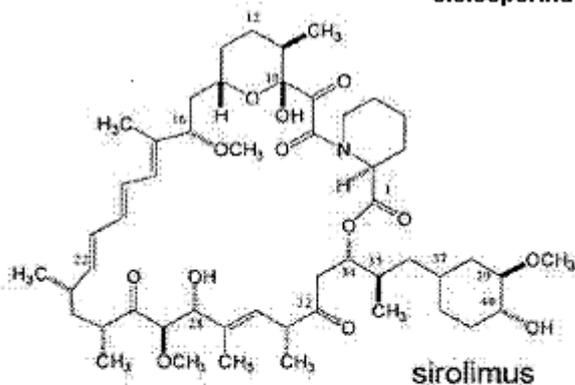
30 Un "fármaco inmunosupresor" o "inmunosupresor", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto terapéutico, ya sea basado en una pequeña molécula o un anticuerpo, que tiene la misma o similar estructura química a cualquiera de rapamicina (sirolimus), o ciclosporina, también conocida como ciclosporina A. Cualquier análogo conocido o desarrollado en el futuro de cualquiera de rapamicina o ciclosporina se considera un inmunosupresor en la presente memoria. Los inmunosupresores preferidos incluyen sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus y ciclosporina. Tacrolimus y ciclosporina son inhibidores de la calcineurina que suprimen la activación temprana de los linfocitos T del sistema inmunológico a través de la inhibición de citoquinas tales como la interleuquina 2. Por el contrario, la diana principal de sirolimus, everolimus y zotarolimus es la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR), una proteína reguladora del ciclo celular específica. La inhibición de mTOR conduce a la supresión de la proliferación de linfocitos T dirigida por citoquinas.

40 La fórmula química de la ciclosporina es la Fórmula A. La fórmula química de sirolimus (rapamicina) es la Fórmula B. La fórmula química de la diferencia estructural de everolimus (RAD) a partir de sirolimus es la Fórmula C.

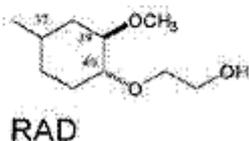
A



B



C



Se han preparado numerosos derivados o análogos de ciclosporina. La descripción comprende reactivos de extracción, métodos de extracción, análisis y kits de análisis para la ciclosporina o cualquiera de sus análogos. Los reactivos de extracción también se describen en la literatura como reactivos de lisis.

5

Se han preparado numerosos derivados o análogos de rapamicina. Por ejemplo, estos incluyen la preparación de derivados mono-éster y di-éster de rapamicina (Solicitud Internacional PCT WO 92/05179), 27-oximas de rapamicina (Patente Europea EP 0 467606); análogo 42-oxo de rapamicina (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.023.262); rapamicinas bicíclicas (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.120.725); dímeros de rapamicina (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.120.727); sililéteres de rapamicina (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.120.842); y arilsulfonatos y sulfamatos (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.177.203). La rapamicina fue sintetizada recientemente en su forma enantiomérica de origen natural (K. C. Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, desde 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 descripción comprende reactivos de extracción, métodos de extracción, análisis y kits de análisis para la rapamicina o cualquiera de sus análogos.

15

Otro análogo inmunosupresor de rapamicina es FK-506, también conocido como tacrolimus, que se aisló de una cepa de *S. tsukubaensis*. La fórmula química de FK-506 está publicada en la Patente Europea EP 0 293 892 B1. Los análogos de FK-506 incluyen los productos naturales relacionados FR-900520 y FR-900523, que difieren de FK-506 en su sustituyente alquilo en C-21, y se aislaron de *S. hygrosopicus yakushimaensis*. Otro análogo, FR-900525, producido por *S. tsukubaensis*, difiere de FK-506 en la sustitución de un radical de ácido piperídico por un grupo prolina. La descripción comprende reactivos de extracción, métodos de extracción, análisis y kits de análisis para FK-506 o cualquiera de sus análogos. Temsoralimus es otro derivado éster de sirolimus que puede ser supervisado con la descripción.

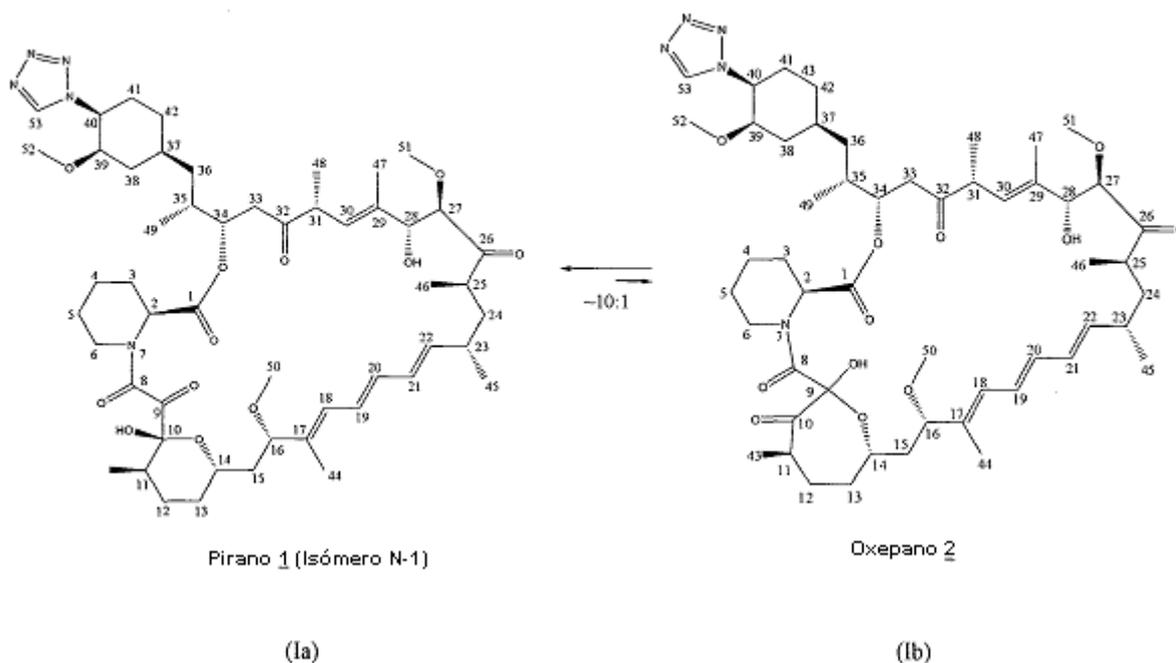
20

ABT-578 [40-epi-(1-tetrazolil)-rapamicina], más conocido hoy como zotatarolimus, es un antibiótico del macrólido del

25

trieno semi-sintético derivado de la rapamicina. La estructura de Zotarolimus 'se muestra en la Fórmula D.

**Fórmula D**  
**Isómeros de zotarolimus**



5 La descripción comprende reactivos de extracción, métodos de extracción, análisis y kits de análisis para zotarolimus o cualquiera de sus análogos. Según se utiliza en la presente memoria con referencia a una fármacos inmunosupresores, el término "estructuralmente similar" indica que los fármacos tienen estructuras suficientemente similares como para que los medicamentos se unan competitivamente a al menos un compañero de unión común (p. ej., una proteína de unión).

10 Según se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Este término abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de los mismos, así como moléculas modificadas a partir de secuencias de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como de una miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. 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.

20 Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de 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 responsables principalmente del

reconocimiento del antígeno. Los términos "cadena ligera variable (VL)" y "cadena pesada variable (VH)" se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

5 Los anticuerpos se encuentran en forma de inmunoglobulinas intactas o en forma de numerosos fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')<sub>2</sub>, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab')<sub>2</sub> se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo de esta manera el dímero (Fab')<sub>2</sub> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed, Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Si bien diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos Fab' se pueden sintetizar de novo o bien químicamente o bien mediante la utilización de la metodología del ADN recombinante.

15 Por lo tanto, el término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos de cadena sencilla (anticuerpos que existen en forma de una única cadena polipeptídica), más preferiblemente anticuerpos Fv de cadena sencilla (sFv o scFv), en los que una cadena pesada variable y una ligera variable se unen entre sí (directamente o por medio de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena sencilla es un heterodímero VH-VL unido covalentemente que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH y VL ya sea unidas directamente ya sea unidas por un conector que codifica un péptido (Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883). Mientras que la VH y la VL están conectadas entre sí en forma de una única cadena polipeptídica, los dominios VH y VL se asocian de forma no covalente. Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas, naturalmente agregadas, pero separadas químicamente de una región V del anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno son conocidos por los expertos en la técnica (véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.091.513, 5.132.405, y 4.956.778).

30 "Analito", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la sustancia a detectar, que se puede sospechar que está presente en la muestra de ensayo. El analito puede ser cualquier sustancia para la que existe un compañero de unión específica de origen natural o para la que se puede preparar un compañero de unión específica. Por lo tanto, un analito es una sustancia que puede unirse a uno o más compañeros de unión específica en un análisis.

35 Un "compañero de unión", según se utiliza en la presente memoria, es un miembro de un par de unión, es decir, un par de moléculas en las que 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 de antígeno y anticuerpo comúnmente utilizados en los inmunoanálisis, otros compañeros de unión específica pueden incluir biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, y similares. Los compañeros de unión específica inmunorreactivos 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.

45 El término "unión específica" se define en la presente memoria como la unión preferente de compañeros de unión a otro (p. ej., 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 (p. ej., afinidad) para la molécula diana/secuencia es de al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, y lo más preferiblemente al menos 10 ó 20 veces más que una molécula diana no específica (p. ej., una molécula generada aleatoriamente que carece del sitio o los sitios reconocidos específicamente).

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

55 El término "agente de captura" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a un compañero de unión que se une al analito, preferiblemente de manera específica. Se pueden anclar agentes de captura a una fase sólida. Según se utiliza en la presente memoria, la unión de un agente de captura fijado a la fase sólida para el analito forma un "complejo fijado a la fase sólida."

60 El término "agente de detección marcado" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a un compañero de unión que se une al analito, preferiblemente de manera específica, y está marcado con una marca detectable o se marca con una marca detectable durante su utilización en un análisis. Una "marca detectable" incluye un radical que es detectable o que se puede volver detectable.

Según se utiliza con referencia a un agente de detección marcado, una "marca directa" es una marca detectable que está anclada, por cualquier medio, al agente de detección.

5 Según se utiliza con referencia a un agente de detección marcado, una "marca indirecta" es una marca detectable que se une específicamente al agente de detección. Por lo tanto, una marca indirecta incluye un radical que es el compañero de unión específica de un radical del agente de detección. La biotina y la avidina son ejemplos de tales radicales que se emplean, por ejemplo, poniendo en contacto un anticuerpo biotinilado con avidina marcada para producir un anticuerpo marcado indirectamente.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "reactivo indicador" se refiere a cualquier agente que se pone en contacto con una marca para producir una señal detectable. Así, por ejemplo, en el marcaje de enzima convencional, un anticuerpo marcado con una enzima se puede poner en contacto con un sustrato (el reactivo indicador) para producir una señal detectable, tal como un producto de reacción coloreado.

15 El término "muestra de ensayo" se refiere a un componente, tejido o fluido del organismo de un animal que es la fuente del analito fármaco inmunosupresor. Estos componentes, tejidos y fluidos incluyen fluidos corporales humanos y animales tales como sangre entera, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos linfáticos y varias secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos, mielomas y similares; fluidos biológicos tales como sobrenadantes de cultivo celular; especímenes de tejido fijado; y especímenes de células fijadas. Preferiblemente, la muestra de ensayo es una muestra de sangre periférica humana.

## II. Composiciones de reactivo de extracción

25 Las composiciones de reactivos de extracción mejoradas de la descripción comprenden dimetilsulfóxido (DMSO), al menos una sal de metal divalente y agua. La composición de reactivo preferida de la descripción comprende DMSO y al menos uno de sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, sulfato de cadmio y sulfato de cobre. Una composición de reactivo más preferida comprende DMSO, al menos uno de etilenglicol y propilenglicol, o cualquier análogo de glicol adecuado y la sal de metal. Las composiciones preferidas de la descripción tienen presiones de vapor inferiores a la presión de vapor de agua, medida a 20 grados centígrados y una atmósfera de presión, y son miscibles con agua.

35 Se puede utilizar cualquier sal de metal divalente adecuada que no precipite de la composición de reactivo de la descripción y se prefieren las sales de cinc. Los metales divalentes adecuados ilustrativos incluyen cinc, cobre y cadmio. Los autores de la presente solicitud no han sometido a ensayo exhaustivamente todos los posibles cationes metálicos divalentes, pero han determinado que los sulfatos de estaño manganoso no eran adecuados a las concentraciones sometidas a ensayo. El anión de la sal metálica puede ser cualquier anión adecuado, incluyendo haluros, nitratos, sulfatos, sulfuros, fosfatos y acetatos. La sal metálica preferida es el sulfato de cinc.

40 La concentración de DMSO, cuando se utiliza sin EG o PG, en la composición de reactivo de extracción es de al menos aproximadamente 50%, y preferiblemente al menos aproximadamente 80%, hasta aproximadamente 95% en volumen de la composición de reactivo de extracción. La concentración de sal de metal es al menos 5 mM y se pueden utilizar concentraciones de hasta aproximadamente 400 mM. Un intervalo de concentración preferido para la sal de cinc es de aproximadamente 30 a aproximadamente 75 mM. El uso de altas concentraciones de sal, por ejemplo por encima de aproximadamente 75 mM, podría requerir el uso de un compuesto quelante, tal como ácido etilendiaminotetraacético, en una etapa de análisis subsiguiente para eliminar el exceso de metal. Las composiciones de reactivo de extracción se elaboran mediante cualquier método de mezcla adecuado para mezclar suficientemente el DMSO con el agua y disolver la sal de metal.

50 Los autores de la presente solicitud han encontrado que cuando se incluye EG o PG en la composición de reactivo de extracción, son más eficaces concentraciones más bajas de DMSO. En estas composiciones preferidas, EG, PG o mezclas de los mismos se encuentran presentes a una concentración de al menos aproximadamente 18%, y preferiblemente de aproximadamente 25% a aproximadamente 33% en volumen de la composición de reactivo de extracción, y el DMSO está presente a una concentración de al menos aproximadamente 50% en volumen de la composición de reactivo de extracción.

## II. Formación del extracto de la muestra de ensayo

60 Los métodos de la descripción se llevan a cabo generalmente en muestras de ensayo derivadas de un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

Los métodos de la descripción se pueden llevar a cabo utilizando cualquier muestra que pueda contener el analito de interés (p. ej., un fármaco inmunosupresor), tal como una muestra de sangre.

El extracto de la muestra de ensayo se formado por cualquier técnica de mezclado a cualquier temperatura deseable para poner en contacto cualquier cantidad elegida de la muestra de sangre con la composición de reactivo de extracción. Generalmente se mezclan de aproximadamente 100  $\mu$ L a aproximadamente 600  $\mu$ L de muestra de sangre con aproximadamente 200  $\mu$ L a aproximadamente 1.200  $\mu$ L de la composición de reactivo de extracción durante un máximo de aproximadamente cinco minutos. Preferiblemente, la extracción del inmunosupresor se lleva a cabo mezclando 150  $\mu$ L de muestra de sangre con 300  $\mu$ L de composición y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. Los autores de la presente solicitud prefieren llevar a cabo la extracción por calentamiento de la mezcla de extracción a una temperatura por encima de la temperatura ambiente en el intervalo de aproximadamente 30 grados centígrados a aproximadamente 50 grados centígrados durante unos cinco minutos a aproximadamente sesenta minutos. Después de mezclar, la suspensión resultante se centrifuga durante un tiempo adecuado a una velocidad de revolución adecuada para producir una fase de sobrenadante y una fase de precipitante. Preferiblemente, la mezcla se centrifuga a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitado. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separa utilizando cualquier método adecuado. El sobrenadante se analiza a continuación para determinar el inmunosupresor usando cualquier técnica adecuada, incluyendo cromatografía y el inmunoanálisis.

### III. Inmunoanálisis

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a inmunoanálisis que se pueden utilizar para la identificación cualitativa y/o la cuantificación del fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo. La descripción comprende por lo tanto un método para detectar el nivel de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) combinar una composición de reactivo de extracción que comprende DMSO, al menos una sal de metal divalente con la muestra de ensayo y agua para formar un extracto de la muestra de ensayo; (b) combinar al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse a un fármaco inmunosupresor con el extracto de la muestra de ensayo para formar una mezcla de ensayo; (c) incubar la mezcla de ensayo en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el anticuerpo y el fármaco inmunosupresor, si lo hubiera, que está presente en la muestra y es inmunológicamente reactivo con el anticuerpo; y (d) detectar la presencia de cualquier complejo formado. Los inmunoanálisis de la descripción se pueden llevar a cabo utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, un formato sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo análisis de inhibición competitiva tanto directos como inversos) o en un formato de polarización de fluorescencia. Los autores de la presente invención han descubierto que se puede realizar un excelente inmunoanálisis de inhibición competitiva después de usar las composiciones de reactivos de extracción de la descripción

En inmunoanálisis para la detección cualitativa o cuantitativa de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, al menos un anticuerpo o una proteína que se unen al fármaco inmunosupresor se ponen en contacto con al menos una muestra de ensayo o un extracto de la muestra de ensayo que se sospecha que contiene o que se sabe que contiene el fármaco inmunosupresor para formar un complejo inmunitario de anticuerpo-fármaco o de proteína-fármaco. Se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos o proteínas de unión adecuados (p. ej., FKBP) que se unen a la inmunosupresor concreto, en los inmunoanálisis descritos en la presente memoria.

Los anticuerpos para cada uno de sirolimus, tacrolimus, zotarolimus, ciclosporina y everolimus son conocidos en la técnica y/o se encuentran disponibles en el mercado, y cualquiera de estos puede ser utilizado. Se prefiere utilizar el anticuerpo monoclonal que es un componente del análisis IMx® Sirolimus asequible comercialmente de Abbott Laboratories para la medición de sirolimus (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), o cualquier otro kit de análisis de Sirolimus comercializado por Abbott Laboratories (p. ej., para su uso en una plataforma automatizada comercial diferente).

Se puede producir un protocolo ilustrativo para la producción de un anticuerpo específico para un fármaco inmunosupresor tal como sirolimus como sigue. Se administran a ratones hembra RBF/Dnj 3 refuerzos mensuales de un inmunógeno de sirolimus-27-CMO-toxoide de tétanos seguido de una inmunización con la preparación de sirolimus-42-HS-toxoide de tétanos en el cuarto mes. Siete meses más tarde, se administra un refuerzo pre-fusión intraesplénica al animal utilizando el inmunógeno de sirolimus-27-CMO-toxoide de tétanos 3 días antes de la fusión. A continuación se aíslan células B esplénicas y se utilizan en una fusión de polietilenglicol (PEG) convencional con el mieloma SP2/0. Los cultivos confluentes se escrutan para determinar la actividad anti-sirolimus 10-14 días más tarde en un EIA de microtitulación y los cultivos positivos se clonan a continuación, utilizando la técnica de clonación por dilución limitante. Los clones resultantes se aíslan y se aumentan a escala en medio de cultivo de tejidos IMDM w/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y el anticuerpo secretado se purifica por afinidad utilizando Proteína A. El anticuerpo sirolimus preferido descrita anteriormente también es eficaz para su uso en inmunoanálisis para sirolimus, everolimus y zotarolimus.

Un anticuerpo preferido ilustrativo para su uso en inmunoanálisis para tacrolimus es descrito por M. Kobayashi et al., en "A highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma", en las páginas 23-29 de "FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression", A transplantation Proceedings Reprint, Suplemento 6, Vol. XIX, Octubre 1987,

Editores T. Starzl, L. Makowka y S. Todo, publicado por Grune & Stratton, Inc., Filadelfia, PA.

Un anticuerpo preferido ilustrativo para su uso en inmunoanálisis para determinar la ciclosporina es el anticuerpo monoclonal que es un componente del análisis de ciclosporina AxSYM<sup>®</sup> disponible en el mercado de Abbott Laboratories para la medición de la ciclosporina.

Los complejos inmunitarios anticuerpo-fármaco se pueden detectar a continuación utilizando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con una marca detectable para detectar la presencia del complejo de anticuerpo-fármaco. Se puede utilizar cualquier marcador adecuado. La selección de una marca concreta no es crítica, pero la marca elegida debe ser capaz de producir una señal detectable por sí misma o junto con una o más sustancias adicionales.

Las marcas detectables útiles, su anclaje a anticuerpos o a otras proteínas de unión y los mecanismos de detección, por tanto, son conocidos en la técnica. Se puede utilizar cualquier marca detectable conocida en la técnica. Por ejemplo, la marca detectable puede ser una marca radiactiva, tal como, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P; una marca enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.; una marca quimioluminiscente, tal como por ejemplo, derivados de acridinio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc.; una marca fluorescente, tal como, fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3,6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclaro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (selenuro de cadmio protegido terminalmente con sulfuro de cinc); una marca termométrica; o una marca de reacción en cadena de la inmuno-polimerasa. Se encuentra una introducción a las marcas, los procedimientos de marcaje y la detección de marcas en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunochemistry*, 2<sup>a</sup> ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi* (1996), que es un manual y catálogo combinado publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Las marcas preferidas para su uso con la descripción son las marcas quimioluminiscentes tales como acridinio-9-carboxamida. Se pueden encontrar detalles adicionales en Mattingly, P.G., y Adamczyk, M. (2002) *Chemoluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamides* y su aplicación en análisis clínicos, en *Luminiscence Biotechnology: Instrument and Applications* (Dyke, K.V., Ed) págs. 77-105, CRC Press, Boca Ratón.

La marca detectable se puede unir al analito, al análogo de analito, o al anticuerpo, ya sea directamente ya sea a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que se puede utilizar es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, hidrocloreuro) que está disponible comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Otros agentes de acoplamiento que se pueden utilizar son conocidos en la técnica. Los métodos para unir una marca detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Además, se pueden adquirir o sintetizar muchas marcas detectables que ya contienen grupos terminales que facilitan el acoplamiento de la marca detectable al anticuerpo, tal 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, un segundo anticuerpo que se une a inmunosupresor y que contiene una marca detectable se puede añadir a la muestra de ensayo o al extracto de la muestra de ensayo y utilizar para detectar la presencia del complejo de anticuerpo-fármaco. En este aspecto se puede utilizar cualquier marca detectable adecuada.

Los inmunoanálisis de la descripción se pueden llevar a cabo utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, un formato sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo los análisis de inhibición competitiva tanto directos como inversos) o un formato de polarización de fluorescencia. Los formatos ilustrativos descritos a continuación se describen en términos de análisis de un fármaco inmunosupresor. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la técnica, los formatos descritos son aplicables a cualquier analito.

En los inmunoanálisis para la detección cuantitativa de un inmunosupresor, tales como un formato de tipo sándwich preferido, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el fármaco en la muestra de ensayo o el extracto de la muestra de ensayo. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes partes del fármaco formando un complejo inmunitario que se conoce como un "sándwich". En general, se pueden utilizar uno o más anticuerpos para capturar el inmunosupresor en la muestra de ensayo (estos anticuerpos se denominan con frecuencia anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se utilizan uno o más anticuerpos para unir una marca detectable (es decir, cuantificable) al sándwich (estos anticuerpos son referidos con frecuencia como anticuerpo de "detección") o anticuerpos de "detección"). En un análisis sándwich, se prefiere que ambos anticuerpos que se unen al fármaco no se vean disminuidos por la unión de cualquier otro anticuerpo en el análisis a su respectivo sitio de unión. En otras palabras, los anticuerpos se deben seleccionar de manera que los uno o más primeros anticuerpos puestos en contacto con una muestra de ensayo o un extracto de la muestra de ensayo que se sospecha que contienen un inmunosupresor no se unen a la totalidad o a parte del sitio de unión reconocido por el segundo anticuerpo o posteriores anticuerpos, interfiriendo de este modo en la capacidad de los uno o más segundos anticuerpos de detección para unirse al fármaco. En un análisis sándwich, los anticuerpos,

preferiblemente, el al menos un anticuerpo de captura, se utilizan en cantidades en exceso molar de la cantidad máxima de fármaco esperada en la muestra de ensayo o el extracto de la 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 la fase sólida.

5 En un aspecto, el al menos un primer anticuerpo de captura puede estar unido a un soporte sólido que facilita la separación del primer complejo de anticuerpo-fármaco de la muestra de ensayo. El soporte sólido o "fase sólida" utilizados en el inmunoanálisis descrito en la presente memoria no son críticos y pueden ser seleccionados por un experto en la técnica. Una fase sólida o un soporte sólido, según se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier material que sea insoluble, o pueda hacerse insoluble por medio de una reacción posterior. Fases sólidas o los soportes sólidos útiles son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen las paredes de los pocillos de 10 una bandeja de reacción, tubos de ensayo, cuentas de poliestireno, cuentas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, glóbulos rojos de oveja (u otro animal), y Duracytes® (una marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.), que son glóbulos rojos de la sangre "fijados" por medio de aldehído pirúvico y formaldehído, y otros. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones covalentes, hidrófobas, iónicas y similares. La fase sólida se puede elegir por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar el agente de captura. Alternativamente, la fase sólida puede comprender un receptor adicional que tiene la capacidad de atraer e inmovilizar el agente de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que tiene una carga opuesta con respecto al agente de captura como tal o a una sustancia cargada conjugada con el agente de captura. Como otra alternativa, la molécula receptora puede ser cualquier compañero del miembro de unión específica que está inmovilizado sobre (anclado a) la fase sólida y que tiene la capacidad de inmovilizar el agente de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula receptora permite la unión indirecta del agente de captura a un material en fase sólida antes de la realización del análisis o durante la realización del análisis.

25 Se puede utilizar cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a, soportes sólidos preparados a partir de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o cuentas. El anticuerpo (o anticuerpos) se pueden unir al soporte sólido mediante adsorción, mediante unión covalente usando un agente de acoplamiento químico o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que dicha unión no interfiera en la capacidad del anticuerpo para unirse al fármaco. Por otra parte, si es necesario, el soporte sólido puede ser derivatizado para permitir la reactividad con distintos grupos funcionales en el anticuerpo. Semejante derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no limitados a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

35 La fase sólida puede comprender cualquier material poroso adecuado con suficiente porosidad para permitir el acceso por los anticuerpos de detección y una afinidad superficial adecuada para unirse a los antígenos. Generalmente se prefieren estructuras microporosas, pero también se pueden utilizar materiales con estructura de gel en estado hidratado. Tales soportes sólidos útiles incluyen, pero no se limitan a nitrocelulosa y nailon. Se contempla que tales soportes sólidos porosos descritos en la presente memoria 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 es preferiblemente de aproximadamente 0,025 a 15 micras, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micras. La superficie de tales soportes se puede activar por medio de procesos químicos que causan la unión covalente del antígeno o el anticuerpo al soporte. La unión irreversible del antígeno o anticuerpo se obtiene, sin embargo, en general, por adsorción sobre el material poroso por medio de 45 fuerzas hidrófobas.

Una vez que el extracto de la muestra de ensayo sospechosa de contener o que contiene el inmunosupresor se pone en contacto con el al menos un primer anticuerpo de captura, la mezcla resultante se incuba para permitir la formación de un primer complejo de anticuerpo de captura (o anticuerpo múltiple)-fármaco. La incubación se puede llevar a cabo 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 periodo de tiempo adecuado desde al menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 4 a 20 minutos, lo más preferiblemente de aproximadamente 17-19 minutos.

55 Después de la adición de un agente de detección y la formación de un complejo marcado, se cuantifica la cantidad de marca en el complejo utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se utiliza una marca enzimática, el complejo marcado se hace reaccionar con un sustrato para la marca que proporciona una reacción cuantificable tal como el desarrollo de color. Si la marca es una marca radiactiva, la marca se cuantifica utilizando un contador de centelleo. Si la marca es una marca fluorescente, la marca se cuantifica mediante la estimulación de la marca con una luz de un color (que se conoce como "longitud de onda de excitación") y la detección de otro color (que se conoce como "longitud de onda de emisión") que es emitida por la marca en respuesta a la estimulación. Si la marca es una marca quimioluminiscente, la marca se cuantifica mediante la detección de la luz emitida, ya sea visualmente o mediante el uso de luminómetros, película de rayos x, o película fotográfica de alta velocidad, una 60

cámara CCD, etc. Una vez que la cantidad de la marca en el complejo ha sido cuantificada, se puede determinar la concentración de fármaco en la muestra de ensayo mediante el uso de una curva patrón que se ha generado, p. ej., utilizando diluciones seriadas de fármaco inmunosupresor de concentración conocida. Aparte del uso de diluciones seriadas del fármaco, la curva patrón puede ser generada por gravimetría, por espectroscopia de masas y mediante otros mecanismos conocidos en la técnica.

En un formato competitivo directo preferido, se utiliza 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 análisis de competición directa, se puede poner en contacto un anticuerpo inmovilizado de manera secuencial o simultánea con la muestra de ensayo y un fármaco marcado o análogo de fármaco del mismo. El fármaco o análogo de fármaco se pueden marcar con cualquier marca detectable adecuada, incluyendo aquellas marcas detectables discutidas anteriormente. En este análisis, el anticuerpo de captura de la presente descripción puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido usando las técnicas descritas previamente en la presente memoria. Alternativamente, el anticuerpo de captura se puede acoplar a un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

El fármaco marcado o análogo de fármaco, el extracto de la muestra de ensayo y el anticuerpo se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de análisis sándwich. A continuación, se generan dos tipos diferentes de complejos de anticuerpo-fármaco. Específicamente, uno de los complejos de anticuerpo-fármaco generado contiene una marca detectable mientras que el otro complejo de anticuerpo-fármaco no contiene una marca detectable. El complejo de anticuerpo-fármaco puede ser, pero no tiene que ser, separado del resto del extracto de la muestra de ensayo antes de la cuantificación de la marca detectable. Independientemente de si el complejo de anticuerpo-fármaco se separa del resto de la muestra de ensayo, a continuación, se cuantifica la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-fármaco. La concentración de fármaco en la muestra de ensayo se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-fármaco con una curva patrón. La curva patrón puede ser generada utilizando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por medio de espectroscopia de masas, por medio de gravimetría y por medio de otros mecanismos conocidos en la técnica.

El complejo de anticuerpo-fármaco se puede separar de la muestra de ensayo por la unión del anticuerpo a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos comentados anteriormente en relación con el formato de análisis sándwich, y la eliminación a continuación del resto de la muestra de ensayo del contacto con el soporte sólido.

En un análisis de competición inversa, se puede poner en contacto un fármaco inmunosupresor inmovilizado o un análogo del mismo o bien de manera secuencial o bien de manera simultánea con una muestra de ensayo o extracto de muestra de ensayo prueba y al menos un anticuerpo marcado o proteína marcada. El anticuerpo o proteína se pueden marcar con cualquier marca detectable adecuada, incluyendo aquellas marcas detectables comentadas anteriormente. El fármaco o análogo de fármaco se pueden unir a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos comentados anteriormente en relación con el formato de análisis sándwich.

El fármaco inmovilizado o análogo de fármaco, la muestra de ensayo o extracto de la muestra de ensayo, y al menos un anticuerpo marcado o proteína marcada se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de análisis sándwich. A continuación, se generan dos tipos diferentes de complejos de anticuerpo-fármaco o proteína-fármaco. Específicamente, uno de los complejos de anticuerpo-fármaco (o proteína-fármaco) generados se inmoviliza y contiene una marca detectable mientras que el otro complejo de anticuerpo-fármaco (o proteína-fármaco) no se inmoviliza y contiene una marca detectable. El complejo de fármaco-anticuerpo no inmovilizado y el resto de la muestra de ensayo o extracto de muestra de ensayo se retiran de la presencia del complejo de anticuerpo-fármaco inmovilizado a través de mecanismos conocidos en la técnica, tales como el lavado. Una vez que se elimina el complejo de anticuerpo-fármaco no inmovilizado, se cuantifica la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-fármaco inmovilizado. La concentración de fármaco en la muestra de ensayo se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-fármaco con una curva patrón. La curva patrón puede ser generada utilizando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por medio de espectroscopia de masas, por medio de gravimetría y por medio de otros mecanismos conocidos en la técnica.

En un análisis de polarización de fluorescencia, en un aspecto un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo se pone en contacto primero con una muestra de ensayo no marcada que contiene el fármaco inmunosupresor para formar un complejo de anticuerpo-fármaco no marcado. El complejo de anticuerpo-fármaco no marcado se pone en contacto a continuación con un fármaco marcado con fluorescencia o un análogo del mismo. El fármaco marcado o análogo de fármaco compiten con cualquier fármaco no marcado en la muestra de ensayo por la unión al anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo. La cantidad de complejo de anticuerpo-fármaco marcado formado se determina y la cantidad de fármaco en la muestra de ensayo se determina mediante el uso de una curva patrón.

En un aspecto adicional de la presente descripción, se describe un método para la detección del nivel de concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) combinar una composición de reactivo de extracción que comprende DMSO, al menos una sal de metal divalente y agua con la muestra de ensayo para formar un extracto de la muestra de ensayo; (b) combinar al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse a un fármaco inmunosupresor con el extracto de la muestra de ensayo para formar una mezcla; (c) incubar la mezcla en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el anticuerpo y el fármaco inmunosupresor, si lo hubiera, que está presente en la muestra y es inmunológicamente reactivo con el anticuerpo; y (d) detectar la presencia de cualquiera de los complejos de anticuerpo-fármaco inmunosupresor formados.

#### IV. Otros análisis de inmunosupresor

También se puede utilizar cualquier otro método de medición alternativo para la concentración de inmunosupresor con el reactivo de extracción descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el contenido de fármaco se puede determinar mediante un método basado en la espectrometría de masas, tal como la técnica de espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida rápida descrita por N. Brown et al., "Low Hematocrit and Serum Albumin Concentrations Underlie the Overestimation of Tacrolimus Concentrations by Microparticle Enzyme Immunoassay versus Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Clinical Chemistry*. 2005; 51: 586-592.

#### V. Instrumental

Se puede utilizar cualquier instrumental o automatización adecuados en la ejecución del contacto de la composición de reactivo de extracción con la muestra de sangre y en el rendimiento del análisis del nivel de concentración de fármaco. Se prefiere llevar a cabo el análisis de forma automatizada, tal como el sistema ARCHITECT® (una marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.), que utiliza la detección de quimioluminiscencia de los inmunoanálisis de de hibridación sándwich y competitivos. El análisis también se puede llevar a cabo en un formato miniaturizado, tal como en un dispositivo y sistema Lab-on-a-Chip.

#### VI. Kits de inmunoanálisis

En otro aspecto, la descripción comprende kits de inmunoanálisis para la detección de un fármaco inmunosupresor de la misma o similar estructura química a cualquiera de sirolimus o ciclosporina, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste de sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de los mismos, cuyos kits comprenden una composición de reactivo de extracción de la descripción. Estos kits también pueden incluir un agente de captura de anticuerpo o reactivo indicador de anticuerpo útil para llevar a cabo un inmunoanálisis sándwich. Los kits preferidos de la descripción comprenden recipientes que contienen, respectivamente, al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina; una composición de reactivo de extracción que comprende DMSO al 50% en volumen de la composición de reactivo de extracción, EG, PG o mezclas de los mismos al 30% - 33% en volumen de la composición de reactivo, agua y sulfato de cinc a una concentración de al menos 5 mM; y una composición de control que comprende al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de los mismos.

Se puede incluir cualquier composición de control adecuada para el análisis de fármaco inmunosupresor concreto en los kits de la descripción. Las composiciones de control comprenden generalmente el inmunosupresor real que se va a analizar junto con cualquier aditivo deseable. Por ejemplo, las composiciones de control para tacrolimus pueden ser la composiciones de control descritas en la Patente de los Estados Unidos 5.338.684, de Grenier et al.

Los kits de acuerdo con la descripción pueden incluir una fase sólida y un agente de captura que se fija a la fase sólida o que se convierte en una fase sólida fijada durante el análisis. En aspectos ilustrativos la fase sólida incluye una o más micropartículas o electrodos. Cuando tales kits se van a emplear para la realización de inmunoanálisis de tipo sándwich, los kits pueden incluir adicionalmente un agente de detección marcado. En ciertos aspectos el kit de ensayo incluye al menos una marca directa, tal como acridinio-9-carboxamida. Los kits de ensayo de acuerdo con la descripción también pueden incluir al menos una marca indirecta. Si la marca empleada generalmente requiere un reactivo indicador para producir una señal detectable, el kit de ensayo incluye preferiblemente uno o más reactivos indicadores adecuados.

Los kits de ensayo de acuerdo con la descripción incluyen preferiblemente instrucciones para llevar a cabo uno o más de los inmunoanálisis de la descripción. Las instrucciones incluidas en los kits de la descripción se pueden fijar al material de embalaje o se pueden incluir en forma de un prospecto. Si bien las instrucciones son materiales típicamente escritos o impresos no se limitan a los mismos. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final es contemplado por la presente descripción. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios electrónicos de almacenamiento (p. ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios

ópticos (p. ej., CD ROM), y similares. Según se utiliza en la presente memoria, 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 ilustrativos de la presente memoria, y cualquier análisis o kit de acuerdo con la descripción se puede adaptar u optimizar para su uso en sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquellos en los que hay una fase sólida que comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.089.424 y 5.006.309, y p. ej., las plataformas comercializadas por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo pero no limitadas a ARCHITECT®, AxSYM®, IMxR, ABBOTT PRISM®, y Quantum II, así como otras plataformas.

Además, los análisis y kits de la presente descripción, opcionalmente se pueden adaptar u optimizar para sistemas de análisis de puntos de atención, incluyendo el sistema de inmunoanálisis electroquímico Point of Care (i-STAT®) de Abbott Laboratories. Los inmunosensores y métodos para la fabricación y funcionamiento de los mismos en los dispositivos de ensayo de un solo uso se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos 5.063.081 y en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos 20030170881, 20040018577, 20050054078, y 20060160164. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el uso de DMSO combinado con sulfato de cinc para extraer sirolimus a partir de proteínas de unión en muestras de sangre. El sirolimus extraído se mide con un inmunoanálisis.

La composición de reactivo de extracción se preparó a concentraciones finales de 86% de DMSO, 14% de agua y sulfato de cinc 40 mM. La extracción de las muestras de sirolimus en sangre se llevó a cabo mezclando 100 µL de muestra de sangre con 200 µL de la composición de reactivo y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y el extracto de sobrenadante se analizó para determinar el sirolimus como sigue. El análisis fue ejecutado en un analizador ARCHITECT® i2000® automatizado (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) por medio de:

1. Mezcla de 10 - 40 µL de extracto de la muestra con 50 µL de micropartículas recubiertas con anticuerpo de cabra anti-ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y anticuerpo anti-sirolimus de ratón (preparado como se describe a continuación).
2. Incubación de la mezcla de reacción durante aproximadamente 18 minutos a 33 - 38 grados C. El sirolimus de la muestra se une al anticuerpo anti-sirolimus sobre las micropartículas.
3. Adición de 20 µL de producto conjugado de acridinio-sirolimus a la mezcla de reacción.
4. Incubación de la mezcla de reacción durante aproximadamente 4 minutos a 33 - 38 grados C. El producto conjugado de 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-activador (solución ácida) y Activador (solución alcalina) para hacer que la marca de acridinio-sirolimus capturada emita luz, que es medida por el aparato.

El anticuerpo de unión a sirolimus se produjo de la siguiente manera: se administraron a ratones hembra RBF/Dnj 3 refuerzos mensuales de un inmunógeno de sirolimus-27-CMO-toxoide de tétanos seguido de una inmunización con la preparación de sirolimus 42-HS-toxoide de tétanos en el 4º mes. Siete meses más tarde, se administró un refuerzo pre-fusión intraesplénica a los animales utilizando el inmunógeno de sirolimus-27-CMO-toxoide de tétanos 3 días antes de la fusión. Se aislaron células B esplénicas y se utilizaron en una fusión de PEG convencional con el mieloma SP2/0. Los cultivos confluentes fueron escrutados para determinar la actividad anti-sirolimus 10-14 días más tarde en un EIA de microtitulación, y los cultivos positivos se clonaron utilizando técnicas de clonación por dilución limitante. Los clones aislados se aumentaron a escala en medio de cultivo de tejidos IMDM w/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), y el anticuerpo secretado se purificó por afinidad utilizando proteína A.

Los datos de la curva de respuesta se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1 y demuestran que el sirolimus fue liberado de las proteínas de unión con la composición de DMSO/sulfato de cinc.

Tabla 1

Sirolimus (ng/mL)	URL
0	573660
3	474794
6	387.857
12	279516
20	191208
30	131426

Las mediciones de la señal en la Tabla 1 están en URL (Unidades Relativas de Luz). Las URL son la designación para la unidad óptica de medida utilizado en los sistemas Architect®. El sistema de óptica ARCHITCT es esencialmente un tubo fotomultiplicador (PMT) que realiza el recuento de fotones en la luz emitida por la reacción quimioluminiscente. La cantidad de luz generada por la reacción quimioluminiscente es proporcional a la cantidad de trazador de acridinio presente en la mezcla de reacción, y de ese modo permite la cuantificación del analito de la muestra del paciente que es también proporcional a la cantidad de acridinio restante en la mezcla de reacción en el momento en el que se produce la reacción quimioluminiscente.

El término Unidades Relativas de Luz proviene de la relación del recuento de fotones para una cierta cantidad de acridinio. Cada módulo óptico se calibra con un conjunto de patrones de acridinio. Cuando se produce la reacción quimioluminiscente, se emite luz y los fotones se miden durante un período de tiempo de 3 segundos. El PMT convierte los fotones contados en una señal digital, que es enviada a continuación a una placa de circuito para su procesamiento. La placa óptica de circuito convierte la señal digital del PMT en una señal analógica que es proporcional a los fotones contados, lo cual a su vez es proporcional a la cantidad de acridinio presente. Esta señal analógica se procesa adicionalmente para producir un valor de URL. Se estableció esta relación para producir un patrón para la calibración del módulo óptico, donde los diferentes patrones de acridinio tienen valores de URL asignados. Así, mientras que la unidad de URL en sí es arbitraria, es proporcional (es decir, relativa) a una cierta cantidad de acridinio.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la utilidad de la variación de las concentraciones de cinc en la composición.

La composición se preparó a diferentes concentraciones finales de sulfato de cinc (0, 10, 20, 40 y 80 mM) en DMSO al 90% y agua al 10%. La extracción de las muestras de sirolimus en sangre se llevó a cabo mezclando 400 µL de muestra de sangre con 800 µL de composición y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y el sobrenadante se sometió a análisis para determinar el sirolimus. El análisis de sirolimus se realizó como en el Ejemplo 1. Los datos del ensayo se muestran en la Tabla 2 y la Figura 2 e ilustran que la liberación de sirolimus a partir de proteínas de unión mejora por la adición de la sal de cinc. Los autores de la presente solicitud también han sometido a ensayo y han determinado que el cloruro de cinc, el nitrato de cinc, y el acetato de cinc también son eficaces.

Tabla 2

	URL				
Sirolimus (ng/mL)	Sin Zn	Zn 10 mM	Zn 20 mM	Zn 40 mM	Zn 80 mM
0	477005	509875	503822	517429	532760
3	464256	461998	435120	403487	414074
30	367821	214924	161065	99300	100777

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la utilidad de diferentes cationes divalentes en la composición.

La composición de extracción se preparó a diferentes concentraciones finales de sales de metales (sulfato de cinc, sulfato de cadmio, sulfato de cobre, sulfato de estaño y sulfato de manganeso) y DMSO como se muestra en la tabla de más abajo (el volumen restante era agua). La extracción de las muestras de sirolimus en sangre se llevó a cabo mezclando 200 µL de muestra de sangre con 400 µL de composición y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y el sobrenadante se analizó para determinar el sirolimus. El análisis de sirolimus se realizó como en el Ejemplo 1. Los datos del ejemplo se muestran en la Tabla 3 y demuestran que también se pueden utilizar sales de metales distintos de cinc.

Tabla 3

DMSO	90%	90%	50%	90%	90%
Sal de metal	Zn 40 mM	Cd 50 mM	Cu 50 mM	Sn 20 mM	Mn 20 mM
Sirolimus	URL	URL	URL	URL	URL

DMSO	90%	90%	50%	90%	90%
(ng/mL)					
0	550492	536394	523472	517375	524178
3	441164	413887	430245	475927	469885
30	107957	89515	126515	222690	220562

Ejemplo 4

5 Este ejemplo ilustra la utilidad de proporciones variables de DMSO y EG en la composición de reactivo de extracción.

10 La composición se preparó a diferentes proporciones de concentración final de DMSO y etilenglicol (el porcentaje de DMSO y el porcentaje de etilenglicol fueron 80:18, 75:23, 70:28, 65:33 y 60:33, respectivamente). Todas las composiciones tenían 2% de agua y sulfato de cinc 40 mM. La extracción de las muestras de sirolimus en sangre se llevó a cabo mezclando 150 µL de muestra de sangre con 300 µL de composición y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y el sobrenadante se analizó para determinar el sirolimus. El análisis de sirolimus se realizó como en el Ejemplo 1. Los datos del ejemplo se muestran en la Tabla 4 y la Figura 3 y demuestran que se puede mantener un poder desnaturalizante suficiente cuando la concentración de DMSO se disminuye si la concentración de etilenglicol se incrementa.

Tabla 4

	URL con diferentes proporciones de DMSO:EG				
Sirolimus (ng / mL)	80:18	75:23	70:28	65:33	60:38
0	457694	454223	428721	450344	446482
3	340579	346026	330247	364 041	363857
30	70582	78 831	72669	95479	94442

20 Las concentraciones de DMSO o etilenglicol que no son eficaces en absoluto o son eficaces sólo marginalmente cuando se utilizan solas (por ejemplo, DMSO al 65% o etilenglicol al 33%) son altamente eficaces combinadas. El propilenglicol puede ser sustituido por etilenglicol en las mezclas de DMSO:etilenglicol (datos no mostrados). Las mezclas de DMSO: etilenglicol tienen la ventaja adicional de la mayor solubilidad para el sulfato de cinc.

Ejemplo 5

25 Este ejemplo ilustra la mejora en la eficacia de la extracción de sirolimus lograda mediante el calentamiento de la mezcla de extracción.

30 La composición basada en DMSO se preparó a concentraciones finales de DMSO al 70%, etilenglicol al 28%, agua al 2% y sulfato de cinc 46 mM. La extracción de las muestras de sirolimus en sangre se llevó a cabo mezclando 150 µL de muestra de sangre con 300 µL de composición, sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos e incubando a diferentes temperaturas durante 15 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y el sobrenadante se analizó para determinar el sirolimus. El análisis de sirolimus se realizó como en el Ejemplo 1.

35 Los datos del ejemplo se muestran en la Tabla 5 y la Figura 4 y demuestran que la liberación más eficiente de sirolimus se produce cuando la mezcla de extracción se calienta (es decir, la diferencia entre 0 ng/mL de calibrador y 3 ng/mL de calibrador aumenta al aumentar la temperatura).

40

Tabla 5

	URL como una función de la temperatura				
	30 C	35 C	40 C	45 C	50 C
0 ng/mL Sirolimus	397353	395993	396009	395694	395957
3 ng/mL Sirolimus	281375	273856	264768	256660	254426

## Ejemplo 6

- 5 Este ejemplo ilustra la evaporación mínima de una composición de extracción con una base de DMSO en comparación con una composición de extracción típica con una base de metanol.

10 La composición con una base de DMSO se preparó a concentraciones finales de DMSO al 70%, etilenglicol al 28%, agua al 2% y sulfato de cinc 46 mM. La composición con una base de metanol se preparó a concentraciones finales de metanol al 80%, etilenglicol al 18%, agua al 2% y sulfato de cinc 50 mM. La extracción de las muestras de sirolimus en sangre, con cualquier composición se llevó a cabo mezclando 125 µL de muestra de sangre con 250 µL de composición y sometiendo a vórtice vigorosamente durante 5 - 10 segundos. La mezcla de extracción de la composición con una base de DMSO se incubó a 42°C durante 10 minutos y la mezcla de extracción de la composición con una base de metanol se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Las mezclas de extracción se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar el precipitante y los sobrenadantes se decantaron en las copas de muestra utilizadas en el analizador ARCHITECT® i2000®. Se sometió a ensayo un conjunto de muestras para la evaporación inmediata (tiempo cero) y a las 1, 2 y 3 horas después de decantación en la copa de muestra (las muestras dejaron reposar a temperatura ambiente, aproximadamente a 22°C). Los datos del ensayo se muestran en la Tabla 6 y la Figura 5 e ilustran la rápida evaporación de composiciones con una base de metanol, que se manifiesta en forma de concentraciones de sirolimus más altas. En menos de 2 horas, el error en la concentración de sirolimus había excedido de 10% con la composición con una base de metanol, pero no se produjo esencialmente ningún cambio en la concentración con la composición de DMSO. El error en la concentración de sirolimus sería mayor si la humedad fuera inferior o si la temperatura de incubación fuera mayor (algunos analizadores de análisis inmunoquímicos Incubaban las muestras a temperaturas próximas a 37°C).

25

Tabla 6

Horas	Sirolimus (ng/mL)	
	DMSO	MeOH
0	11,47	11,14
1	11,37	12,47
2	11,18	12,88
3	11,50	13,83

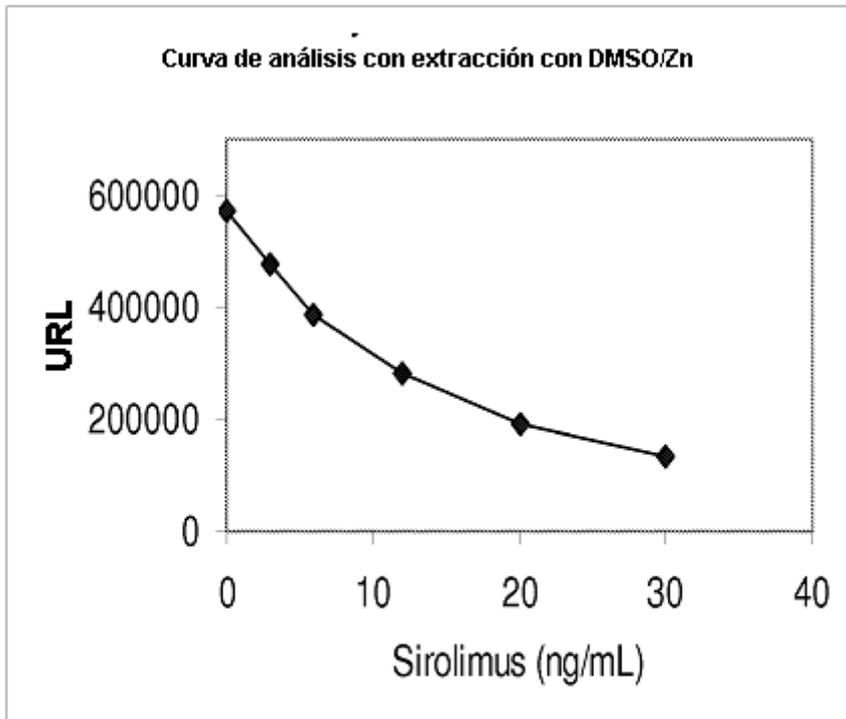
## REIVINDICACIONES

1. Un método para la evaluación de la concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre humana que comprende las etapas de:
- 5 (a) combinar una composición de reactivo de extracción que comprende al menos 50% en volumen de DMSO, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, y de 30 mM a 75 mM de una sal metálica de cinc con una muestra de sangre humana y agua para formar una extracto de la muestra de ensayo;
- 10 (b) combinar al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse a un fármaco inmunosupresor con el extracto de la muestra de ensayo para formar una mezcla de ensayo, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina;
- (c) incubar la mezcla de ensayo en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el anticuerpo y el fármaco inmunosupresor, si lo hubiera, que está presente en la muestra y es inmunológicamente reactivo con el anticuerpo; y
- 15 (d) detectar la presencia de cualquier complejo formado.
2. Un método para la evaluación de la concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre humana, que comprende poner en contacto una muestra de sangre humana con una composición de reactivo de extracción que comprende al menos 50% en volumen de dimetilsulfóxido, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, y de 30 mM a 75 mM de una sal metálica de cinc y agua para producir una fase sólida y una fase de sobrenadante, separar la fase de sobrenadante, y analizar la fase de sobrenadante mediante inmunoanálisis para determinar la concentración de un fármaco inmunosupresor, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la separación de cualquier fase sólida resultante del contacto de la muestra de sangre humana con la composición de reactivo de extracción de cualquier fase de sobrenadante resultante y el análisis de la fase de sobrenadante para determinar un fármaco inmunosupresor.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) o mezclas de EG y PG.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sal metálica de cinc comprende sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, o mezclas de dos o más de estas sales metálicas.
- 35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición de reactivo de extracción se pone en contacto con la muestra de sangre a una temperatura de al menos 30 grados centígrados.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición de reactivo de extracción tiene una presión de vapor inferior a la presión de vapor de agua a 20 grados centígrados y a la presión atmosférica normal.
- 45 8. Una composición de reactivo de extracción para la extracción de un fármaco inmunosupresor a partir de una muestra de sangre, comprendiendo la composición al menos 50% en volumen de dimetilsulfóxido, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, y de 30 mM a 75 mM de una sal metálica de cinc y agua, en donde el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.
9. La composición de reactivo de extracción de la reivindicación 8, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) o mezclas de EG y PG.
- 50 10. La composición de reactivo de extracción de las reivindicaciones 8 ó 9, en donde la composición de reactivo de extracción comprende una sal metálica de cinc seleccionada del grupo que consiste en sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc, cloruro de cinc, o mezclas de dos o más de estas sales metálicas.
- 55 11. Un kit de ensayo que comprende recipientes separados que contienen cada uno un componente seleccionado entre
- (a) al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina; y
- 60 (b) una composición de reactivo de extracción que comprende al menos dimetilsulfóxido al 50% en volumen de la composición de reactivo de extracción, un glicol que tiene de dos a seis átomos de carbono, y de 30 mM a 75 mM de una sal metálica de cinc y agua.
12. El kit de ensayo de la reivindicación 11, en donde el glicol comprende etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) o mezclas de EG y PG.

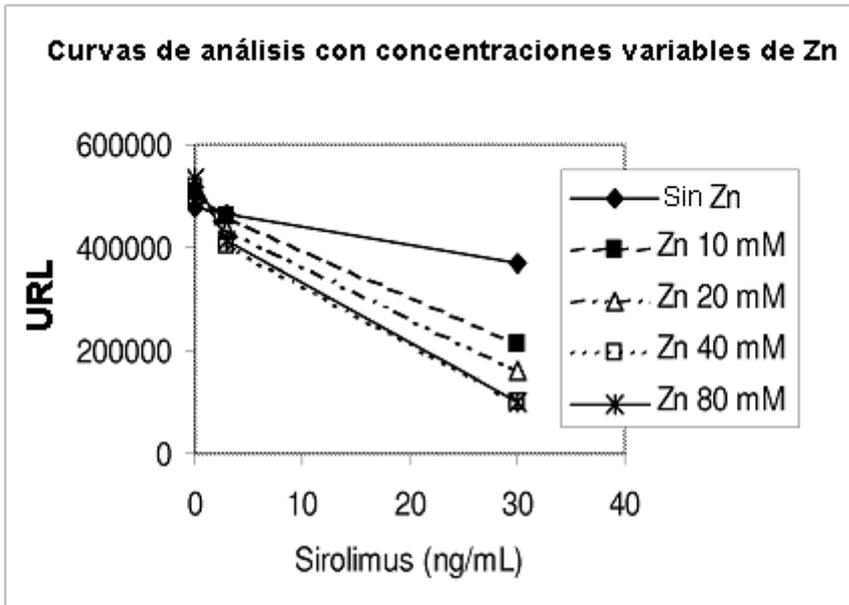
13. El kit de ensayo de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende adicionalmente un recipiente que contiene una composición de control que comprende al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

5 14. El kit de ensayo de las reivindicaciones 11 - 13, en donde la sal de cinc comprende sulfato de cinc, acetato de cinc, nitrato de cinc o cloruro de cinc.

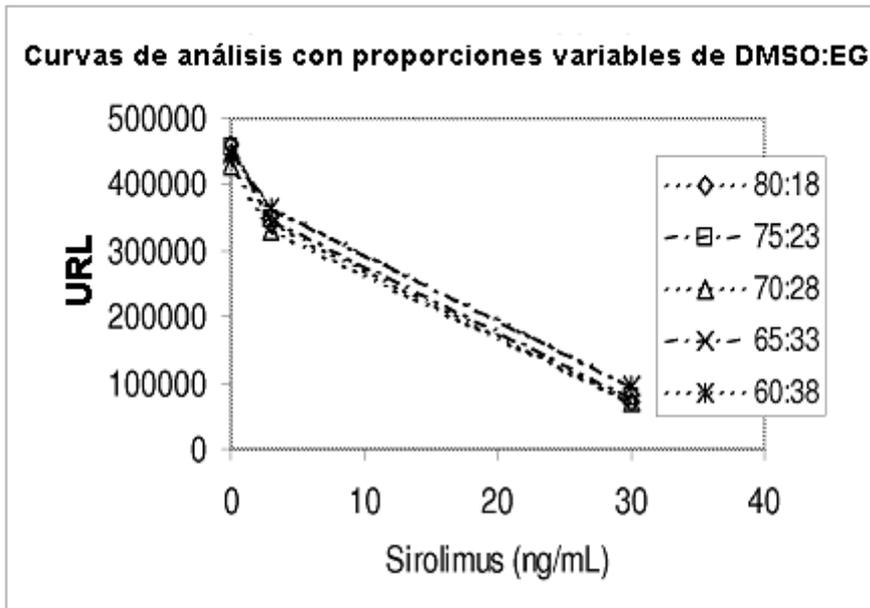
10 15. El kit de ensayo de la reivindicación 11, en donde dicho kit de ensayo que comprende recipientes separados que contienen cada uno un componente seleccionado entre (a) al menos un anticuerpo o una proteína capaces de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus y ciclosporina; y (b) una composición de reactivo de extracción que comprende adicionalmente etilenglicol, propilenglicol o mezclas de los mismos al 30% - 33% en volumen de la composición de reactivo de extracción, y que comprende sulfato de cinc; y una composición de control que comprende al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.  
15



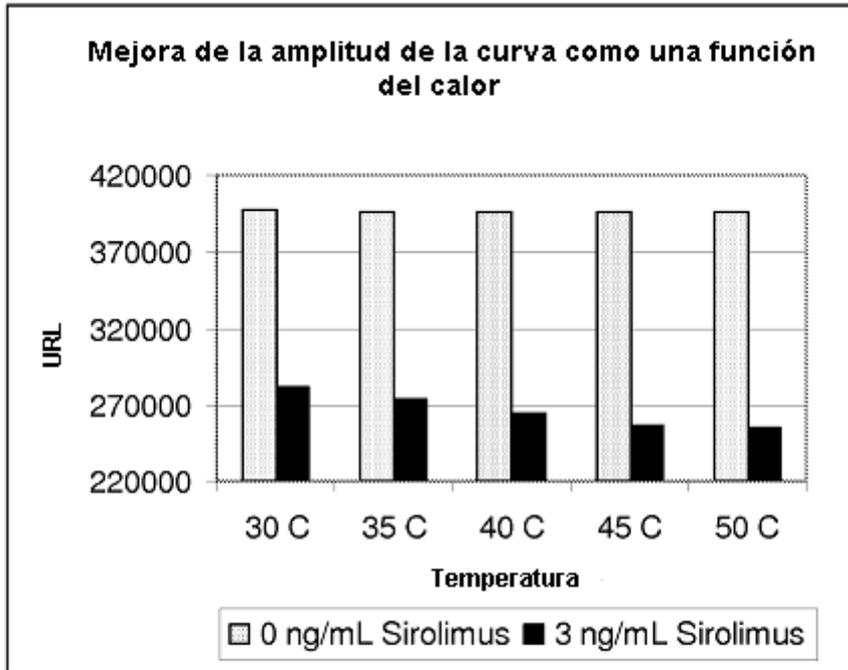
**Figura 1**



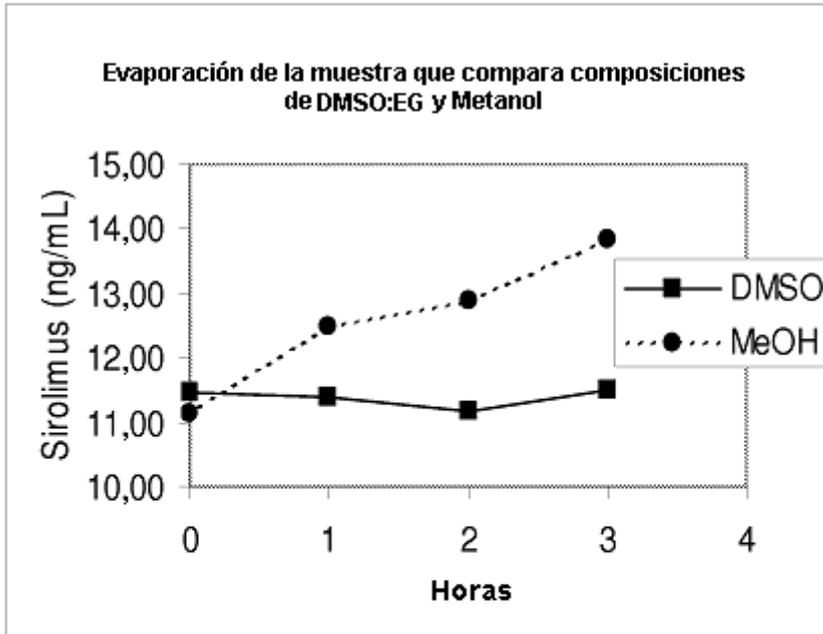
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**