

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 247**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/566** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2008 PCT/US2008/086602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09079374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08862673 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2217926**

54 Título: **Métodos para la detección de fármacos hidrófobos**

30 Prioridad:

**14.12.2007 US 956603**

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

**13.03.2017**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
(100.0%)  
1717 DEERFIELD ROAD  
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**WEI, TIE Q.;  
CRAIG, ALAN y  
POSEY, AMY**

74 Agente/Representante:

**LOZANO GANDIA, José**

**ES 2 605 247 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).

**MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE FÁRMACOS HIDRÓFOBOS****DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes**

La invención se refiere a métodos para la determinación de fármacos hidrófobos tales como, por ejemplo, fármacos inmunosupresores, en muestras, tales como muestras de pacientes, que se sabe o se sospecha que contienen uno o más de tales fármacos hidrófobos.

10 El organismo se basa en un complejo sistema de respuesta inmunitaria para distinguir moléculas propias de ajenas. Algunas veces, el sistema inmunitario del organismo debe controlarse con el fin o bien de aumentar una respuesta deficiente respuesta o bien de suprimir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando se trasplantan órganos tales como riñón, corazón, sistema cardiopulmonar, médula ósea e hígado en seres humanos, el organismo con frecuencia rechazará el tejido trasplantado mediante un proceso denominado rechazo de aloinjerto.

15 En el tratamiento del rechazo de aloinjerto, con frecuencia se suprime el sistema inmunitario de una manera controlada con terapia farmacológica. Se administran con cuidado fármacos inmunosupresores a receptores de trasplantes con el fin de ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido ajeno. Dos fármacos inmunosupresores muy comúnmente administrados para prevenir el rechazo de órganos en pacientes sometidos a trasplante son ciclosporina (CSA) y FK-506 (FK o tacrolimús). Otro fármaco que encuentra uso como inmunosupresor en los Estados Unidos y otros países es sirolimús, también conocido como rapamicina. También se dice que derivados de sirolimús son útiles como inmunosupresores. Tales derivados incluyen, por ejemplo, everolimús y similares.

20 Los efectos secundarios asociados con algunos fármacos inmunosupresores pueden controlarse en parte controlando cuidadosamente el nivel de fármaco presente en un paciente. Se requiere una monitorización terapéutica de concentraciones de fármacos inmunosupresores y fármacos relacionados en la sangre para optimizar pautas posológicas para garantizar una inmunosupresión máxima con toxicidad mínima. Aunque los fármacos inmunosupresores son agentes inmunosupresores altamente eficaces, su uso debe gestionarse con cuidado porque el intervalo de dosis eficaz es con frecuencia estrecho y una dosificación excesiva puede dar como resultado efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosificación demasiado escasa de un inmunosupresor puede conducir a rechazo tisular. Dado que la distribución y el metabolismo de un fármaco inmunosupresor pueden variar en gran medida entre pacientes y debido al amplio intervalo y gravedad de reacciones adversas, resulta esencial una monitorización precisa del nivel de fármaco.

25 En el campo de la monitorización de fármacos terapéuticos, detectar de manera selectiva el fármaco original con respecto a sus metabolitos es, con frecuencia, un objetivo importante para diseñar inmunoensayos. Esto es especialmente cierto para fármacos inmunosupresores. Por ese motivo, los ensayos de HPLC con EM en tándem se han convertido en métodos convencionales para la medición de sirolimús y otros fármacos inmunosupresores debido a su capacidad para medir de manera selectiva el fármaco original.

30 La mayoría de los ensayos de sangre completa para detectar fármacos inmunosupresores requieren una etapa manual usando reactivos para extraer el fármaco de constituyentes de la sangre. Como resultado, las moléculas de fármaco y las moléculas de metabolitos de fármaco se disocian de proteínas de unión endógenas y se extraen a una disolución relativamente limpia en la que se retiran proteínas de plasma y partículas de lipoproteínas así como la mayoría de las demás moléculas. Dado que habitualmente se usan técnicas de precipitación, la muestra extraída está básicamente libre de la mayoría de las macromoléculas de la sangre incluyendo proteínas de unión a fármaco. Por tanto, en las muestras extraídas, el fármaco original y sus metabolitos se disuelven como moléculas individuales, no unidas, y compiten entre sí por la reacción con un anticuerpo de ensayo en la mezcla de inmunorreacción. La unión del anticuerpo de ensayo al fármaco se produce en ausencia de la mayoría de las sustancias endógenas en estos ensayos. La reactividad cruzada de un metabolito de fármaco depende principalmente de su afinidad de unión a anticuerpo en tales ensayos.

35 En un ensayo homogéneo para detectar un fármaco inmunosupresor en el que no hay ninguna extracción o separación manual del fármaco de constituyentes de la sangre, un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor tiene que detectar el fármaco en presencia de la mayoría o la totalidad de los constituyentes de la sangre, cuya presencia puede interferir con la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor. Además, las muestras contienen metabolitos del fármaco y la alta reactividad cruzada de metabolitos presenta un grave problema de precisión en ensayos para detectar fármacos inmunosupresores.

40 El documento WO 2008/082974 A2 da a conocer un método para preparar una muestra de prueba para su uso en un ensayo que comprende poner en contacto la muestra de prueba con un reactivo de lisis para formar una mezcla de lisis, que comprende un glicol o un análogo del mismo así como un alcohol de hasta cinco átomos de carbono por molécula.

45 El documento WO 2008/147982 A1 se refiere a un inmunoensayo para evaluar la cantidad de un analito en una

muestra de prueba, en el que el analito es un fármaco hidrófobo que se metaboliza para formar metabolitos con reacción cruzada, comprendiendo el inmunoensayo las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de prueba con uno o más reactivos de tratamiento previo para formar una primera mezcla, que somete a lisis cualquier célula y solubiliza cualquier analito presente en la muestra de prueba, (b) poner en contacto la primera mezcla con un anticuerpo específico para el analito para formar una segunda mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con analito o metabolito, (c) lavar la segunda mezcla para eliminar cualquier analito y cualquier metabolito no complejado con el anticuerpo y para formar una tercera mezcla en la que se reduce la concentración de analito, (d) poner en contacto la tercera mezcla con una pareja de unión específica del anticuerpo marcada con un marcador detectable ("indicador") para formar una cuarta mezcla que comprende un complejo del anticuerpo con indicador, (e) lavar la cuarta mezcla para eliminar cualquier indicador no complejado con anticuerpo, y (f) detectar el complejo anticuerpo-indicador como medida de la cantidad de analito presente en la muestra, en el que el inmunoensayo tiene una reactividad cruzada de menos de aproximadamente el 10% con uno cualquiera o más metabolitos con reacción cruzada presentes en la muestra.

El documento US 2005/0112778 A1 describe nuevos derivados de FK506 que son útiles para determinar los niveles de FK 506 en una muestra que pueden usarse para procedimientos de ensayo.

Por tanto, existe una necesidad continuada de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir niveles de fármacos inmunosupresores o derivados de los mismos en pacientes. Los métodos deben ser totalmente automatizados y ser precisos incluso cuando se realizan con muestras de sangre completa sin extracción usando un ensayo homogéneo en el que un anticuerpo empleado en el ensayo tiene que detectar el fármaco en presencia de la mayoría, si no la totalidad, de los constituyentes de la sangre y en presencia de metabolitos de fármaco. El ensayo debe detectar de manera selectiva el fármaco original al tiempo que minimiza las imprecisiones resultantes de la reactividad cruzada de sus metabolitos.

## Sumario

La presente invención se refiere a un método para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolímús, sirolimús, everolimús y ciclosporina con respecto a la de metabolitos del fármaco hidrófobo, comprendiendo el método: (a) proporcionar en combinación en un medio: (i) una muestra de sangre completa, (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco hidrófobo y los metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco hidrófobo y (iii) un agente de solubilidad selectiva para el fármaco hidrófobo en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen, y (b) incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio.

La presente invención se refiere además a un método para determinar un fármaco hidrófobo en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene el fármaco hidrófobo que comprende el método para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolímús, sirolimús, everolimús y ciclosporina con respecto a la de metabolitos del fármaco hidrófobo según la reivindicación 1, en el que la combinación en el medio comprende además un agente hemolítico y en el que en la etapa (b) el medio se incuba en condiciones para hemolizar células en la muestra y para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio, y en el que el método comprende además: (c) añadir reactivos al medio para determinar la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra, en el que los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el fármaco hidrófobo, y (d) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el fármaco hidrófobo y el anticuerpo para el fármaco hidrófobo, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor, comprendiendo el método: (a) proporcionar en combinación en un medio: (i) la muestra, (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y los metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor y (iii) un agente de solubilidad selectiva para el fármaco inmunosupresor en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen, (b) incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio, (c) añadir al medio (i) un reactivo que comprende (I) un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor y (II) una enzima y (ii) partículas magnéticas que comprenden el fármaco inmunosupresor o un análogo del mismo, y (d) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor y el anticuerpo para el fármaco inmunosupresor, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, sirolimús y everolimús.

Finalmente, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia o cantidad de un fármaco inmunosupresor en un medio que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor, comprendiendo el método:

5 (a) proporcionar en combinación en un medio: (i) una muestra de sangre completa, (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y los metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor y (iii) un agente de solubilidad selectiva para el fármaco inmunosupresor en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi- 2-propanol, o una combinación de los mismos, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen, (b)

10 incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio, (c) añadir al medio (i) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (ii) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociada con una segunda partícula, en el que un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor está asociado con la primera partícula o la segunda partícula o ambas, (d) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente, y (e) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando la cantidad de luminiscencia relacionada con la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolimús, ciclosporina, sirolimús y everolimús.

20 Alternativamente, en la realización anterior, una de la primera partícula o la segunda partícula comprende el anticuerpo y la otra partícula comprende un análogo de fármaco para el fármaco inmunosupresor. Se somete la combinación a condiciones para la competencia de las partículas recubiertas con análogo de fármaco y el fármaco inmunosupresor, si está presente, por el anticuerpo para el fármaco. Alternativamente, en la realización anterior, la primera partícula o la segunda partícula comprenden estreptavidina, que se combina con un análogo biotinilado para

25 el fármaco inmunosupresor en el medio. Se somete la combinación a condiciones para la competencia de análogo de fármaco biotinilado y el fármaco inmunosupresor por el anticuerpo para el fármaco. En cualquiera de las realizaciones alternativas anteriores, se irradia el fotosensibilizador con luz y se detecta la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente. La cantidad de luminiscencia está relacionada con la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.

### 30 Descripción detallada de realizaciones específicas

#### Discusión general

35 Los presentes inventores han reconocido que la reactividad cruzada de metabolitos de fármaco puede reducirse haciendo que el fármaco y los metabolitos estén menos unidos a proteínas y potenciando la solubilidad del fármaco hidrófobo en una mezcla de ensayo con respecto a metabolitos del fármaco hidrófobo, que los presentes inventores reconocen que son más hidrófilos que el propio fármaco. La naturaleza más hidrófila de los metabolitos de fármaco parece deberse a grupos hidroxilo adicionales que resultan del metabolismo del fármaco a través del hígado

40 mediante desmetilación e hidroxilación. La interacción hidrófoba es un mecanismo importante y común para la unión de fármaco-proteína en sangre acuosa. Los presentes inventores observaron que metabolitos hidrófilos tienden a tener menor afinidad por las proteínas de unión y se difunden más libremente en sangre acuosa y mezcla de ensayo. Por ese motivo, una mayor parte de las moléculas de metabolitos están libres, no unidas a proteínas y más accesibles para el anticuerpo de ensayo que el fármaco original en la mezcla de ensayo acuosa. Suponiendo que un metabolito de fármaco tiene la misma afinidad de unión al anticuerpo de ensayo que el fármaco original, el metabolito formará más inmunocomplejos con el anticuerpo que el fármaco original debido a su mayor accesibilidad. El reconocimiento anterior es contrario a una creencia común de que la reactividad cruzada de metabolitos sólo es función de la afinidad de unión al anticuerpo. Los presentes inventores han determinado que la reactividad cruzada de un metabolito en tales ensayos depende no sólo de su afinidad de unión al anticuerpo sino también de su afinidad

50 de unión a las proteínas de unión endógenas.

Aspectos de los ensayos descritos en el presente documento son inmunoensayos homogéneos, que también pueden denominarse inmunoensayos esencialmente libres de reparto. Aspectos de los presentes ensayos detectan de manera selectiva el fármaco original al tiempo que minimizan la reactividad cruzada de un anticuerpo para el

55 fármaco con los metabolitos de tal fármaco. El uso de agentes de solubilidad selectiva que son disolventes orgánicos, no volátiles, miscibles con agua, en un ensayo libre de reparto de muestra aumenta de manera selectiva la biodisponibilidad del fármaco original con respecto a la de los metabolitos, y aumenta de manera selectiva la accesibilidad del fármaco hidrófobo al anticuerpo de ensayo con respecto a los metabolitos. Los diferenciales de solubilidad reordenados mediante los agentes de solubilidad selectiva anteriores con respecto a disoluciones de reactivo acuosas habituales minimiza la detección de metabolitos más hidrófilos y potencia la detección del fármaco hidrófobo original. Es decir, los agentes de solubilidad selectiva aumentan de manera selectiva la biodisponibilidad del fármaco original con respecto a los metabolitos. Por tanto, los agentes de solubilidad selectiva añadidos a un medio de ensayo ajustan la selectividad o biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a medios acuosos que se emplean habitualmente en tales ensayos. Los agentes de solubilidad selectiva también pueden potenciar la

60 biodisponibilidad de un anticuerpo hidrófobo que se emplea en un ensayo.

Los métodos actuales se centran en la mitigación de resultados de ensayo imprecisos provocados por reactividad cruzada de metabolitos de fármaco con el anticuerpo reactivo empleado en un inmunoensayo. Los presentes métodos tienen aplicación para ensayos homogéneos totalmente automatizados en los que, antes del ensayo, no hay ninguna extracción o separación del fármaco hidrófobo de otros constituyentes de la muestra incluyendo metabolitos de fármaco. En un ensayo de “extracción no manual”, una muestra tal como una muestra de sangre completa se combina con un agente de hemólisis y un agente de liberación en un medio y, tras un periodo de incubación para permitir la hemólisis y liberación del fármaco de otros constituyentes de la sangre, se añaden reactivos para llevar a cabo un ensayo para detectar el fármaco hidrófobo al medio y se lleva a cabo el ensayo. Se ha encontrado que la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo en un ensayo para detectar el fármaco puede potenciarse con respecto a los metabolitos del fármaco incubando una muestra que se sospecha que contiene el fármaco hidrófobo con un agente de liberación y un agente de solubilidad selectiva que potencia la disponibilidad del fármaco hidrófobo para su posterior unión a un anticuerpo para el fármaco durante un ensayo para detectar la presencia y/o cantidad del fármaco en el que están presentes otros constituyentes de la muestra.

El término “fármaco hidrófobo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un fármaco, habitualmente un fármaco terapéutico, en el que el fármaco presenta una característica de absorción mediante un resto lipófilo tal como, por ejemplo, una lipoproteína, o de solubilidad reducida en un medio polar. La absorción o ausencia de solubilidad es tal que interfiere con la cuantificación del fármaco en un ensayo para detectar el fármaco. La interferencia con la cuantificación del fármaco significa que la capacidad para realizar una determinación cuantitativa precisa del fármaco en un ensayo se reduce en al menos aproximadamente el 10%, en al menos aproximadamente el 15%, en al menos aproximadamente el 20%, en al menos aproximadamente el 25%, en al menos aproximadamente el 30%, y así sucesivamente. Un “anticuerpo hidrófobo” es un anticuerpo que presenta una solubilidad reducida en un medio acuoso en comparación con otros anticuerpos.

Los fármacos inmunosupresores son un ejemplo de fármacos hidrófobos. Los fármacos inmunosupresores son fármacos terapéuticos que se administran a receptores de trasplantes con el fin de ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido ajeno. Los fármacos inmunosupresores pueden clasificarse de la siguiente manera: glucocorticoides, compuestos citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre inmunofilinas y otros fármacos tales como interferones, proteínas de unión a INF de opiáceos, micofenolato, FTY720 y similares. Una clase particular de fármacos inmunosupresores comprende aquellos fármacos que actúan sobre inmunofilinas. Las inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión específica de alta afinidad que tienen importancia fisiológica. Actualmente se conocen dos familias diferenciadas de inmunofilinas: ciclofilinas y macrofilinas, las últimas de las cuales se unen específicamente, por ejemplo, a tacrolimús o sirolimús. Los fármacos inmunosupresores que actúan sobre inmunofilina incluyen, por ejemplo, ciclosporina (incluyendo ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F, ciclosporina G, ciclosporina H, ciclosporina I), tacrolimús (FK506, PROGRAF®), sirolimús (rapamicina, RAPAMUNE®), everolimús (RAD, CERTICAN®) y así sucesivamente.

El término “biodisponibilidad” tal como se usa en el presente documento con respecto a un “fármaco hidrófobo” se refiere a la cantidad de fármaco hidrófobo en una muestra que está disponible para su medición tal como, por ejemplo, disponible para la unión a un anticuerpo para el fármaco hidrófobo particularmente en un ensayo en el que hay constituyentes en la muestra que va a analizarse tales como metabolitos del fármaco que reaccionan de manera cruzada con un anticuerpo para el fármaco, interfiriendo así con la precisión de un ensayo para detectar el fármaco. Un factor primario que afecta a la biodisponibilidad y que es preocupante en los presentes métodos es la presencia en una muestra de metabolitos de fármaco que se unen a anticuerpo para el fármaco y que hacen que un ensayo para detectar el fármaco sea impreciso, particularmente cuando hay una mínima o ninguna separación de tales metabolitos con respecto al fármaco y mínima o ninguna separación de otros componentes en una muestra. El término “biodisponibilidad” tal como se usa en el presente documento con respecto a un “anticuerpo hidrófobo” se refiere a la cantidad de anticuerpo hidrófobo que se emplea en un ensayo y que está disponible para su unión a un analito.

Según los presentes aspectos “biodisponibilidad potenciada” o “potenciación de la biodisponibilidad” o “potenciar la biodisponibilidad” con respecto a un fármaco hidrófobo significa que hay una potenciación o aumento en la cantidad del fármaco hidrófobo disponible para su detección en una muestra que contiene metabolitos del fármaco que reaccionan de manera cruzada con un anticuerpo para el fármaco. Según los presentes aspectos “biodisponibilidad potenciada” o “potenciación de la biodisponibilidad” o “potenciar la biodisponibilidad” con respecto a un anticuerpo hidrófobo significa que hay una potenciación o aumento en la cantidad del anticuerpo hidrófobo disponible para su unión a un analito.

Según los presentes aspectos “biodisponibilidad potenciada de manera selectiva” o “potenciación selectiva de la biodisponibilidad” o “potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad” con respecto a un fármaco hidrófobo significa que hay una potenciación o aumento en la cantidad del fármaco hidrófobo disponible para su unión a un anticuerpo para el fármaco hidrófobo y, por tanto, para su detección en una muestra, con respecto a la cantidad de metabolitos del fármaco hidrófobo que reaccionan de manera cruzada con un anticuerpo para el fármaco y que están disponibles para reaccionar de manera cruzada con el anticuerpo para el fármaco hidrófobo.

La frase “al menos” tal como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados

puede ser igual o superior al número mencionado. La frase “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento significa que el número mencionado puede diferir en más o menos el 10%; por ejemplo, “aproximadamente 5” significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

5 Por consiguiente, tal como se mencionó anteriormente, una realización de la presente invención es un método para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo con respecto a metabolitos del fármaco hidrófobo. Se forma una combinación en un medio en el que la combinación comprende la muestra, un agente de liberación y un agente de solubilidad selectiva para el fármaco hidrófobo. El agente de liberación desplaza el fármaco hidrófobo, y sus metabolitos, de restos de unión endógenos. El agente de solubilidad selectiva fomenta la  
10 igualación de la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo y la de los metabolitos en el medio. El agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua y está presente en el medio en una concentración suficiente para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio.

15 La muestra que va a analizarse es una que se sospecha que contiene uno o más analitos de fármacos hidrófobos. La muestra comprende normalmente uno o más restos de unión endógenos que se unen al fármaco hidrófobo. Los restos de unión endógenos pueden ser proteínas de unión que se unen a un fármaco hidrófobo tales como una lipoproteína, por ejemplo, una proteína que comprende un resto lipídico u otras sustancias que se unen al fármaco hidrófobo tales como colesterol, triglicérido, y así sucesivamente. Las muestras son preferiblemente de seres  
20 humanos o animales e incluyen líquidos biológicos tales como sangre completa, suero, plasma, esputo, líquido linfático, semen, mucosa vaginal, heces, orina, líquido cerebroespinal, saliva, deposiciones, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosa y similares; tejido biológico tal como cabello, piel, secciones o tejidos escindidos de órganos u otras partes del cuerpo; y así sucesivamente. La muestra es sangre completa. La muestra no se trata previamente para eliminar tales restos de unión endógenos.

25 La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. La naturaleza del medio se comenta con más detalle a continuación. Un agente de liberación y un agente de solubilidad selectiva para el fármaco hidrófobo según los presentes métodos se combinan en el medio, que también puede incluir un agente hemolítico.

### 30 Agente hemolítico

Un agente hemolítico es un compuesto o una mezcla de compuestos que alteran la integridad de las membranas de glóbulos rojos liberando así el contenido intracelular de las células. Se conocen numerosos agentes hemolíticos en  
35 la técnica. Los agentes hemolíticos incluyen, por ejemplo, detergentes no iónicos, detergentes aniónicos, detergentes anfóteros, disoluciones acuosas de baja fuerza iónica (disoluciones hipotónicas), agentes bacterianos, anticuerpos que provocan lisis dependiente del complemento, y similares. Los detergentes no iónicos que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen tanto detergentes sintéticos como detergentes naturales. Los ejemplos de detergentes sintéticos incluyen TRITON™ X-100, TRITON™ N-101, TRITON™ X-114, TRITON™ X-405, TRITON™ SP-135, TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano), TWEEN® 80 (monooleato de polioxietileno (20)-sorbitano), DOWFAX®, ZONYL®, palmitato de pentaeritrito, ADOGEN® 464, tensioactivo ALKANOL® 6112, 1,2-butoxilato-bloque-etoxilato de alcohol alílico HLB 6, BRIJ®, tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato)tetraol de etilendiamina, IGEPAL®, MERPOL®, poli(etilenglicol), etil éter de 2-[etil[(heptadecafluorooctil)sulfonil]amino], polietileno-bloque-poli(etilenglicol), tetraoleato de polioxietileno-sorbitano,  
45 hexaoleato de polioxietileno-sorbitol, TERGITOL® NP-9, GA-FAC® (RHODAFAC®, un éster fosfato de alquil-polioxietilenglicol tal como, por ejemplo, fosfato de alfa-dodecil-omegahidroxi-poli(oxi-1,2-etanedilo)), y EP110® y similares. Los detergentes que se producen de manera natural que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, ácido graso neutralizado con sodio o potasio, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidilserina neutralizada, fosfatidato, fosfatidiletanolamina neutralizada, fosfatidil-colina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, sal biliar, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También pueden emplearse combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes que se producen de manera natural y combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes que se producen de manera natural.

55 La naturaleza y cantidad o concentración de agente hemolítico empleado depende de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco hidrófobo, la naturaleza del resto de los componentes reactivos, las condiciones de reacción y similares. La cantidad del agente hemolítico es al menos suficiente para provocar la lisis de glóbulos rojos para liberar el contenido de las células. En algunos aspectos la cantidad del agente hemolítico es de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,4%, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,3%, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,2%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3%, de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,2%, y así sucesivamente (el porcentaje es en peso/volumen).

### 65 Agente de liberación

El agente de liberación desplaza el fármaco hidrófobo de restos de unión endógenos. El agente de liberación puede desplazar, y en muchos casos desplaza metabolitos del fármaco hidrófobo de restos de unión endógenos. En muchos aspectos el agente de liberación tiene alta afinidad de unión a las proteínas de unión endógenas de modo que desplaza fácilmente el fármaco hidrófobo, y sus metabolitos, de proteínas de unión endógenas. Además, el agente de liberación no se une en ningún grado significativo a un anticuerpo para el fármaco que se usa en el ensayo. Mediante la frase “no se une en ningún grado significativo” quiere decirse que el grado de unión debe ser lo suficientemente bajo de modo que puede llevarse a cabo un ensayo preciso para detectar el fármaco. El agente de liberación puede ser cualquier resto, ya sea un compuesto individual o una mezcla de compuestos, que logra el resultado deseado de desplazamiento sin unión significativa a un anticuerpo de ensayo. En muchos aspectos el agente de liberación desplaza el fármaco hidrófobo y su metabolito de sustancias de unión endógenas para hacer que tanto el fármaco hidrófobo como los metabolitos estén accesibles de manera sustancialmente igual para un anticuerpo para el fármaco hidrófobo. “Accesible de manera sustancialmente igual” significa que la cantidad de fármaco hidrófobo disponible para su unión a anticuerpo no varía en ningún grado significativo con respecto a la cantidad total de metabolitos del fármaco hidrófobo que están disponibles para su unión al anticuerpo. La cantidad de metabolitos disponibles para su unión a un anticuerpo para el fármaco hidrófobo depende de consideraciones tales como, por ejemplo, la afinidad de unión de metabolitos particulares para el anticuerpo para el fármaco hidrófobo. Los porcentajes anteriores se basan en la suposición de que los metabolitos de fármaco tienen aproximadamente la misma afinidad de unión por el anticuerpo para el fármaco hidrófobo que el propio fármaco hidrófobo. De lo contrario, los porcentajes anteriores deben ajustarse basándose en la afinidad de unión real de los metabolitos de fármaco hidrófobo.

En algunos aspectos el agente de liberación es un análogo, incluyendo análogos estructurales, del fármaco hidrófobo. Un análogo de fármaco hidrófobo es un fármaco modificado que puede desplazar el fármaco hidrófobo análogo de una proteína de unión pero no compite en ningún grado sustancial por un receptor tal como un anticuerpo para el fármaco hidrófobo. La modificación proporciona medios para unir un análogo de fármaco hidrófobo a otra molécula. El análogo de fármaco hidrófobo se diferenciará habitualmente del fármaco hidrófobo en más de una sustitución de un hidrógeno por un enlace que une el análogo de fármaco a un núcleo o marcador, pero no es necesario. El análogo de fármaco hidrófobo puede ser, por ejemplo, el fármaco hidrófobo conjugado con otra molécula a través de un grupo de unión, y así sucesivamente. Para fármacos hidrófobos que comprenden una funcionalidad hidroxilo o ácido carboxílico, el agente de liberación puede ser un éster del fármaco hidrófobo, que tiene una alta afinidad de unión para proteínas de unión endógenas con respecto al fármaco hidrófobo que va a detectarse y que no tiene ninguna afinidad de unión significativa para un anticuerpo para el fármaco hidrófobo. Por ejemplo, en una determinación para detectar sirolimús, puede emplearse un éster de sirolimús como agente de liberación siempre que cumpla los requisitos anteriores. Un análogo estructural es un resto que tiene características estructurales o espaciales iguales o similares a las del fármaco hidrófobo de tal manera que el análogo estructural logra un resultado igual o similar al del análogo del fármaco hidrófobo. El análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el fármaco hidrófobo. Por ejemplo, en una determinación para detectar sirolimús, puede emplearse un éster de tacrolimús como el agente de liberación. El éster puede ser, por ejemplo, un carbamato, un carbonato, un éster de un ácido carboxílico C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y similares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.186.518. Otros ejemplos de agentes de liberación incluyen [Thr<sub>2</sub>,Leu<sub>5</sub>,D-Hiv<sub>8</sub>,Leu<sub>10</sub>]-ciclosporina A para ciclosporina A, FK506 para sirolimús, sirolimús para FK506, y similares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.187.547.

La concentración del agente de liberación en el medio es la suficiente para lograr el resultado deseado de desplazar el fármaco hidrófobo, y en muchos casos los metabolitos del fármaco hidrófobo, de restos de unión endógenos para hacer que el fármaco y los metabolitos estén accesibles para su unión a un anticuerpo para el fármaco tal como se comentó anteriormente. La cantidad o concentración del agente de liberación empleado depende de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco hidrófobo, la naturaleza de los metabolitos de fármaco, la naturaleza de otros componentes reactivos, las condiciones de reacción y similares. En algunos aspectos, la cantidad del agente de liberación es de aproximadamente el 0,000001% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 0,4%, de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,3%, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,2%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3%, de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,5%, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,2%, y así sucesivamente (el porcentaje es en peso/volumen).

#### 55 Agente de solubilidad selectiva

El agente de solubilidad selectiva fomenta la igualación de la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo y la de los metabolitos en el medio. La naturaleza del agente de solubilidad selectiva es tal como para proporcionar un medio casi hidrófobo para disolver fármaco y/o metabolitos de fármaco, que se liberan de restos de unión endógenos mediante el agente de liberación. Al usar el agente de solubilidad selectiva, el fármaco y el metabolito se vuelven accesibles de manera similar para el anticuerpo de ensayo, dando como resultado una reducción de la reactividad cruzada de metabolito que de lo contrario sería superior debido a su menor unión a proteínas y mayor solubilidad en una disolución acuosa pura en comparación con el fármaco original. La presencia de un agente de solubilidad selectiva según los aspectos en el presente documento garantiza que tanto el fármaco liberado como los metabolitos se disuelven de manera sustancialmente igual en el medio de tratamiento previo y/o en el medio de ensayo. En

algunos aspectos el agente de solubilidad selectiva potencia la biodisponibilidad de un anticuerpo hidrófobo que se emplea en un ensayo.

5 El agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua y es habitualmente un líquido a temperatura ambiente (de aproximadamente 18°C a aproximadamente 23°C). El agente de solubilidad selectiva debe comprender una región hidrófila o polar en la molécula para ser miscible con agua y una región hidrófoba o no polar de modo que pueda disolver fármacos hidrófobos y, por tanto, tener una capacidad de disolución de fármaco hidrófobo. No obstante, la polaridad global es tal que el disolvente orgánico es miscible con agua. El disolvente orgánico es miscible con agua cuando puede disolverse en agua en todas las proporciones a 10 una temperatura de aproximadamente 1 a aproximadamente 50°C. Los disolventes orgánicos que pueden usarse como agente de solubilidad selectiva tienen solubilidad ilimitada en un medio acuoso.

15 Tal como se mencionó anteriormente, el agente de solubilidad selectiva, cuando se añade al medio de tratamiento previo o medio de ensayo, ayuda a disolver fármacos hidrófobos en el medio. El grado en el cual se disuelve un fármaco hidrófobo en un medio que contiene el agente de solubilidad selectiva frente al mismo medio en ausencia del agente de solubilidad selectiva es superior a aproximadamente el 80%, o superior a aproximadamente el 85%, o superior a aproximadamente el 90%, o superior a aproximadamente el 95%, o aproximadamente 100% o superior. Por ejemplo, si se disuelven 2 ng/ml de fármaco hidrófobo en un medio sin el agente de solubilidad selectiva y se disuelven 4 ng/ml de fármaco hidrófobo en el mismo medio que contiene la solubilidad selectiva en el intervalo 20 apropiado, el aumento será del 100%.

25 El término "no volátil" significa que el disolvente orgánico tiene una presión de vapor de tan sólo, o inferior a, la de agua pura a una temperatura dada, y, tras la combinación con agua en un porcentaje según los presentes métodos, el medio resultante tiene una presión de vapor, a una temperatura dada, de tan sólo, o inferior a, la de agua pura. Por ejemplo, la presión de vapor de DMSO a 8°C es de 21,7 Pa y la presión de vapor de agua a 8°C es de 1044 Pa; la presión de vapor de DMSO al 15% en agua es de 978 Pa, lo cual es inferior a la del agua pura. Por otro lado, el etanol, por ejemplo, no será un agente de solubilidad selectiva adecuado según los presentes métodos porque su presión de vapor a 8°C es de 2754 Pa, muy superior a la del agua pura. La presión de vapor de una mezcla de etanol al 10% en agua tiene una presión de vapor de 1115 Pa, lo cual es superior a la del agua pura.

30 Aspectos del agente de solubilidad selectiva incluyen dimetilsulfóxido y/o 1-metoxi-2-propanol.

35 La concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es suficiente para lograr la potenciación selectiva de la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo, con respecto a la de los metabolitos, en el medio. La potenciación selectiva de la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de sus metabolitos se logra cuando la cantidad de fármaco hidrófobo que puede detectarse se aumenta con respecto a la obtenida en ausencia del agente de solubilidad selectiva en al menos aproximadamente el 50%, en al menos aproximadamente el 75%, en al menos aproximadamente el 90%, en al menos aproximadamente el 100%, en al menos aproximadamente el 125%, en al menos aproximadamente el 150%, en al menos aproximadamente el 175%, en al menos aproximadamente el 200%, 40 en al menos aproximadamente el 225%, en al menos aproximadamente el 250%, en al menos aproximadamente el 275%, en al menos aproximadamente el 300%, en al menos aproximadamente el 325%, en al menos aproximadamente el 350%, en al menos aproximadamente el 375%, en al menos aproximadamente el 400%, y así sucesivamente. En otras palabras, la potenciación selectiva de la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de sus metabolitos se logra cuando la cantidad de fármaco hidrófobo que puede detectarse se 45 aumenta con respecto a la obtenida en ausencia del agente de solubilidad selectiva en de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 veces, o de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 4 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 veces, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5 veces, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 veces, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 veces, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 veces, o de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 3,5 veces, o de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 3 veces, o de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 2,5 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 veces, y así sucesivamente.

55 La cantidad o concentración de agente de solubilidad selectiva empleado depende de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco hidrófobo, la naturaleza del disolvente orgánico, la naturaleza de otros componentes reactivos, las condiciones de reacción, si el medio es un medio de tratamiento previo o un medio de ensayo, y similares. En algunos aspectos la cantidad del agente de solubilidad selectiva en un medio de tratamiento previo es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 11% a aproximadamente el 25%, 60 de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 13% a aproximadamente el 19%, de aproximadamente el 14% a aproximadamente el 18%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 17%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 25%, de aproximadamente el 16% a aproximadamente el 24%, de aproximadamente el 17% a aproximadamente el 23%, de aproximadamente el 18% a aproximadamente el 22%, de aproximadamente el 19% a aproximadamente el 21%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20%, 65 de aproximadamente el 16% a aproximadamente el 19%, y así sucesivamente (volumen con respecto a volumen). En algunos aspectos la cantidad del agente de solubilidad selectiva en un medio de ensayo es de aproximadamente



el 1,0% a aproximadamente el 10%, de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 9,0%, de aproximadamente el 2,1% a aproximadamente el 8,0%, de aproximadamente el 2,2% a aproximadamente el 7,0%, de aproximadamente el 2,3% a aproximadamente el 6,0%, de aproximadamente el 2,4% a aproximadamente el 5%, de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 4,5%, de aproximadamente el 3,0% a aproximadamente el 6,0%, de aproximadamente el 3,1% a aproximadamente el 5,0%, de aproximadamente el 3,2% a aproximadamente el 4,9%, de aproximadamente el 3,3% a aproximadamente el 4,8%, de aproximadamente el 3,4% a aproximadamente el 4,7%, de aproximadamente el 3,5% a aproximadamente el 4,5%, y así sucesivamente (volumen con respecto a volumen).

#### 10 Tratamiento previo de muestra

La muestra, un agente hemolítico (si se emplea), el agente de liberación y el agente de solubilidad selectiva se combinan en un medio, que, tal como se mencionó anteriormente, es habitualmente un medio acuoso y se denomina en el presente documento medio de tratamiento previo. Todo lo anterior puede combinarse simultáneamente en el medio o uno o más de los reactivos anteriores pueden añadirse secuencialmente en concentraciones tal como se comentó anteriormente. El medio también puede comprender uno o más conservantes tal como se conoce en la técnica tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomycin, y similares. El pH para el medio estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el periodo de incubación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Tales agentes se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de tampones y conservantes, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o la función deseados.

El medio se incuba en condiciones para hemolizar células en la muestra, para liberar el fármaco hidrófobo y sus metabolitos de restos de unión endógenos y para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo. El periodo de incubación puede ser de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 3 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 20 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 segundos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 6 minutos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 3 minutos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 minutos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 segundos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 20 segundos, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 10 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 6 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 3 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 2 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 30 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 20 segundos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 3 minutos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 2 minutos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 30 segundos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 6 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 3 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 minuto, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, o similares.

La temperatura durante la incubación es habitualmente de aproximadamente 10°C a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, o

similares.

Descripción general de ensayos para detectar un fármaco hidrófobo

5 Tras el periodo de incubación anterior, se añaden reactivos para determinar la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra al medio. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo que va a realizarse. En general, el ensayo es un método para la determinación o medición de la presencia y/o cantidad de un analito hidrófobo. A continuación se comentan diversos métodos de ensayo a modo de ilustración y no de limitación.

10 En muchos aspectos los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el fármaco hidrófobo. Mediante la frase "anticuerpo para el fármaco hidrófobo" quiere decirse un anticuerpo que se une específicamente al fármaco hidrófobo y no se une en ningún grado significativo a otras sustancias que alterarían el análisis para detectar el fármaco hidrófobo.

15 Los anticuerpos específicos para un fármaco hidrófobo para su uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonal) o mediante preparación de líneas celulares híbridas continuas y recogida de las proteínas secretadas (monoclonal) o mediante clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

20 Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')<sub>2</sub>, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

25 Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos (policlonal) mediante técnicas bien establecidas que implican inmunización de un animal, tal como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Se proporcionan revisiones del estado de la técnica por Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, J. Immunol. Met. 7: 1-24 (1975); Broughton y Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).

30 También pueden obtenerse anticuerpos mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose tales anticuerpos comúnmente anticuerpos monoclonales. Pueden producirse anticuerpos monoclonales según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Part B): 3-46 (1981).

35 En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica para sitios de unión a anticuerpo puede escindirse del ADN cromosómico e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión a anticuerpo correspondientes.

40 Tal como se comentó anteriormente, un anticuerpo seleccionado para su uso en un inmunoensayo para detectar un fármaco hidrófobo, por ejemplo, debe unirse de manera específica y preferible al fármaco hidrófobo y sus metabolitos farmacéuticamente activos con respecto a otros ligandos tales como otros metabolitos o fármacos relacionados. Por ejemplo, un anticuerpo para tacrolímús debe unirse de manera específica y preferible a tacrolímús con respecto, por ejemplo, a rapamicina. En general, un anticuerpo debe poder distinguir entre un fármaco hidrófobo con respecto a un segundo fármaco hidrófobo. Al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, del primer fármaco hidrófobo se unirá al anticuerpo si el anticuerpo se combina con una muestra que contiene el fármaco hidrófobo. Aunque la unión también depende de la concentración relativa del fármaco hidrófobo, la unión será superior para el primer fármaco hidrófobo si la constante de unión para el primer fármaco hidrófobo es mayor que la constante de unión para el segundo fármaco hidrófobo, al menos aproximadamente 10 veces superior o al menos aproximadamente 50 veces superior y hasta 1000 veces o superior.

45 Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que va a llevarse a cabo. Tales ensayos implican habitualmente reacciones entre parejas de unión tales como un analito de fármaco hidrófobo y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y una pareja de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Por consiguiente, la pareja de unión puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. La pareja de unión puede ser un miembro de un par de unión específica ("miembro de sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tienen una zona en la superficie o en una cavidad que se unen específicamente a, y se define de ese modo como complementaria a, una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque pares de unión específica tales como

biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótido tales como ADN-ADN, ADN-ARN, y similares no son pares inmunológicos pero se incluyen dentro del alcance de miembro de sbp.

5 Por consiguiente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de diversos factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas. Parejas de unión preferidas son anticuerpos.

10 Pueden emplearse muchos tipos de inmunoensayos en los presentes métodos para determinar la presencia y/o cantidad de un analito de fármaco hidrófobo en una muestra que se sospecha que contiene tales analitos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados.

15 Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden habitualmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión de la luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida, ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, y así sucesivamente.

20 En muchos de los ensayos comentados en el presente documento, se emplea un marcador; el marcador es habitualmente parte de un sistema de producción de señal ("sps"). La naturaleza del marcador depende del formato de ensayo particular. Un sps incluye habitualmente uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador detectable, que genera una señal detectable que está relacionada con la cantidad de marcador unido y/o no unido, es decir la cantidad de marcador unido o no unido al fármaco hidrófobo que está detectándose o a un agente que refleja la cantidad del fármaco hidrófobo que va a detectarse. El marcador es cualquier molécula que produce o puede inducirse que produzca una señal, y puede ser, por ejemplo, un agente que fluoresce, radiomarcador, enzima, agente con quimioluminiscencia o fotosensibilizador. Por tanto, la señal se detecta y/o se mide detectando la actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radiactividad, y así sucesivamente, según sea el caso.

25 Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa del rábano; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores; colorantes; agentes que fluorescen, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; agentes con quimioluminiscencia tales como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcadores tales como  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{57}\text{Co}$  y  $^{75}\text{Se}$ ; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas incluyendo partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo ( $\text{CrO}_2$ ), y similares; sol metálica; cristalito; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Se dan a conocer enzimas y coenzimas adecuadas en Litman, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.275.149, columnas 19-28, y Boguslaski, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.318.980, columnas 10-14; se dan a conocer agentes que fluorescen y agentes con quimioluminiscencia adecuados en Litman, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.275.149, en las columnas 30 y 31.

35 El marcador puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, agentes que fluorescen, pueden absorber luz ultravioleta y visible, en las que la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las sube a un nivel energético excitado. Después se disipa esta energía absorbida mediante emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes.

40 Alternativamente, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluirá entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Tales otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias que generan señales. Puede encontrarse una discusión detallada de sistemas de producción de señales adecuados en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.185.243, columnas 11-13.

45 El marcador u otros miembros de sps pueden unirse a un soporte. Un derivado o análogo de fármaco hidrófobo puede unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre únicamente que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de los análogos para unirse a un anticuerpo. En algunos aspectos, el derivado o análogo de fármaco hidrófobo puede estar recubierto o unido de manera covalente directamente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas de portador tales como poliaminoácidos incluyendo proteínas tales como albúminas séricas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (hidratos de carbono) tales como, por ejemplo,

dextrano o derivados de dextrano. También pueden usarse grupos de unión para acoplar de manera covalente el soporte sólido y el fármaco hidrófobo. También son posibles otros métodos de unión de los derivados de fármaco hidrófobo. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina, un anticuerpo, etc., y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse al derivado de fármaco hidrófobo o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970).

El soporte puede estar compuesto por un material orgánico o inorgánico, sólido o líquido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, vástago, superficies planas tales como, por ejemplo, placa, papel, etc., fibra, y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede poder suspenderse o no en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes que pueden suspenderse son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, partículas magnéticas, y similares. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; usados o bien en sí mismos o bien junto con otros materiales.

El soporte puede ser una partícula. Las partículas deben tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunos aspectos las partículas tienen un diámetro promedio de desde aproximadamente 0,05 micrómetros hasta aproximadamente 20 micrómetros, o desde aproximadamente 0,3 micrómetros hasta aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente de desde aproximadamente 0,7 g/ml hasta aproximadamente 1,5 g/ml, y compuesta por material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, virus, y similares. Las partículas también pueden ser partículas compuestas por polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas, y similares. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

Las partículas de polímero pueden formarse mediante polímeros de adición o condensación. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables para permitir la conjugación con un análogo de fármaco hidrófobo, o bien directa o bien indirectamente a través de un grupo de unión. Las partículas también pueden derivarse de materiales que se producen de manera natural, materiales que se producen de manera natural que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de interés particular están los polisacáridos, particularmente polisacáridos reticulados, tales como agarosa, que está disponible como Sepharose, dextrano, disponible como Sephadex y Sephacryl, celulosa, almidón, y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, poli(alcohol vinílico), homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidades hidroxilo libres, y similares.

El marcador y/u otro miembro de sps puede unirse a un miembro de sbp u otra molécula. Por ejemplo, el marcador puede unirse de manera covalente a un miembro de sbp tal como, por ejemplo, un anticuerpo; un receptor para un anticuerpo, un receptor que puede unirse a una molécula pequeña conjugada con un anticuerpo, o un análogo de ligando. La unión del marcador al miembro de sbp puede lograrse mediante reacciones químicas que dan como resultado la sustitución de un átomo de hidrógeno del marcador por un enlace con el miembro de sbp o puede incluir un grupo de unión entre el marcador y el miembro de sbp. Otros miembros de sps también pueden unirse de manera covalente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros de sps tales como un agente que fluoresce y un agente de extinción pueden unirse cada uno a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo pone el agente que fluoresce y el agente de extinción en estrecha proximidad, permitiendo, por tanto, que el agente de extinción interactúe con el agente que fluoresce para producir una señal. En la técnica se conocen bien métodos de conjugación. Véase, por ejemplo, Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837.

Enzimas de particular interés como proteínas marcadoras son enzimas redox, particularmente deshidrogenasas tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc., y enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante para dar un colorante. Las combinaciones particulares incluyen sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, o compuesto heterocíclico oxidasas, tales como uricasa y xantino oxidasas, acoplada con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa del rábano, lactoperoxidasa o microperoxidasa. En la técnica se conocen combinaciones de enzimas adicionales. Cuando se usa una única enzima como marcador, otras enzimas pueden encontrar uso tales como hidrolasas, transferasas y oxidoreductasas, preferiblemente hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa. Alternativamente, pueden usarse luciferasas tales como luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana.

Las coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H], etc., habitualmente coenzimas que implican reacciones de ciclización. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.318.980.

Con proteínas marcadoras tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 600.000 o desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 300.000 de peso molecular. Habitualmente hay al menos aproximadamente 1 análogo de fármaco hidrófobo por aproximadamente 200.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 150.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 100.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 50.000 de peso molecular, y así sucesivamente. En el caso de enzimas, el número de grupos de análogo de fármaco hidrófobo es habitualmente de desde 1 hasta aproximadamente 20, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.

El término “marcadores distintos de poliaminoácidos” incluye aquellos marcadores que no son proteínas (por ejemplo, enzimas). El marcador distinto de poliaminoácidos puede detectarse directamente o puede detectarse mediante una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores distintos de poliaminoácidos incluyen, por ejemplo, radioisótopos, compuestos luminiscentes, soportes, por ejemplo, partículas, placas, perlas, etc., polinucleótidos, y similares. Más particularmente, el marcador distinto de poliaminoácidos puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un polinucleótido que codifica para un catalizador, promotor, colorante, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña (incluyendo, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, y similares), secuencia de polinucleótido amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como partícula de látex o carbono o partícula de dióxido de cromo (cromo) o similares, sol de metal, cristalito, liposoma, célula, etc., que puede estar adicionalmente marcada o no con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

Un grupo general de inmunoensayos que pueden emplearse incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales tal como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos libres de separación en los que los reactivos marcados modulan la señal de marcador tras reacciones de unión de fármaco hidrófobo-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos de competencia limitados por reactivo de anticuerpo marcado para detectar fármaco hidrófobo que evitan el uso de haptenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, el analito de fármaco hidrófobo inmovilizado en fase sólida está presente en una cantidad constante, limitada. El reparto de un marcador entre el analito de fármaco hidrófobo inmovilizado y analito de fármaco hidrófobo libre depende de la concentración de analito en la muestra.

Los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneos) o bien con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se muestran a modo de ejemplo mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) dado a conocer en Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345, columna 17, línea 59 a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización de enzimas (“ECIA”) tales como los dados a conocer en Maggio, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia (“FPIA”) tal como se da a conocer, por ejemplo, entre otros, en la patente estadounidense n.º 5.354.693; y así sucesivamente.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático (“EMMIA”) dado a conocer por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato (“SLFIA”) dado a conocer por Oellerich, J. Clin. Chem. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donador enzimático combinado (“CEDIA”) dados a conocer por Khanna, *et al.*, Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; inmunoensayos marcados con partículas homogéneas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas (“PETINIA”), inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas (“PETIA”), etc.; y similares.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol (“SPIA”), el inmunoensayo de colorante dispersado (“DIA”); el metaloinmunoensayo (“MIA”); los inmunoensayos de membrana enzimática (“EMIA”); luminoinmunoensayos (“LIA”); y así sucesivamente. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada con anticuerpo tras la unión de un fármaco hidrófobo. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores de semiconductor, ensayos de inmunosensores de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodos amperométricos, y similares.

En unos aspectos, el ensayo es un inmunoensayo de luminiscencia inducida, que se describe en la patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*) titulada “Assay Method Utilizing Photoactivated Chemiluminiscent

Label" ("ensayo de luminiscencia inducida"). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula de marcador que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula de marcador se conjuga con un miembro de sbp, por ejemplo, un anticuerpo para el fármaco hidrófobo que puede unirse al analito de fármaco hidrófobo para formar un complejo, o a un segundo miembro de sbp para formar un complejo, en relación con la presencia del analito de fármaco hidrófobo. Si el analito de fármaco hidrófobo está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente entran en proximidad. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando los dos marcadores están en estrecha proximidad. Posteriormente, el compuesto quimioluminiscente activado produce luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez está relacionada con la cantidad de analito de fármaco hidrófobo presente.

A modo de ilustración adicional, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con las mismas tal como mediante incorporación en las mismas o fijación a las mismas. Un miembro de sbp que se une al analito de fármaco hidrófobo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para un fármaco hidrófobo, se une a un polisacárido que recubre las partículas. Un segundo miembro de sbp que se une al analito de fármaco hidrófobo es parte de un conjugado de biotina. La estreptavidina se conjuga con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado con las mismas. La unión de la estreptavidina a este segundo conjunto de partículas (partículas de fotosensibilizador) puede implicar o no un polisacárido en las partículas. Las partículas quimioluminiscentes se mezclan con una muestra que se sospecha que contiene un analito de fármaco hidrófobo y las partículas de fotosensibilizador. El medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan al analito de fármaco hidrófobo gracias a la unión de los miembros de sbp al analito de fármaco hidrófobo. Después, se irradia el medio con luz para excitar el fotosensibilizador, que puede, en su estado excitado, activar oxígeno para dar un estado de singlete. Dado que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora en estrecha proximidad con el fotosensibilizador gracias a la presencia del analito de fármaco hidrófobo, se activa mediante oxígeno singlete y emite luminiscencia. Después se examina el medio para detectar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando la presencia de la misma relacionada con la presencia y/o cantidad del analito de fármaco hidrófobo.

Otro ejemplo particular de un ensayo que puede emplearse para la determinación de un analito de fármaco hidrófobo se comenta en la patente estadounidense n.º 5.616.719 (Davalian, *et al.*), que describe inmunoensayos de canalización de oxígeno fluorescentes.

En algunos aspectos pueden usarse inmunoensayos de múltiples analitos en los que el analito de fármaco hidrófobo puede ser el objeto de detección junto con uno o más de otros analitos tales como otros fármacos y similares. Tales sistemas de múltiples analitos se describen, por ejemplo, en Loo, *et al.*, J. Anal. Toxicol. 12: 299 (1988).

Los ensayos comentados anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona sensibilidad de ensayo óptima. El pH para el medio de ensayo estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será habitualmente un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como miembros del sistema de producción de señal, y así sucesivamente.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Con frecuencia, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de la unión, o similares.

Pueden aplicarse uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. Se incuba el medio habitualmente a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación oscilan normalmente entre aproximadamente 5º y aproximadamente 99ºC, habitualmente entre aproximadamente 15ºC y aproximadamente 70ºC, más habitualmente de 20ºC a aproximadamente 45ºC. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50ºC, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40ºC.

La concentración de analito que puede someterse a ensayo varía generalmente desde aproximadamente  $10^{-5}$  hasta aproximadamente  $10^{-17}$  M, más habitualmente desde aproximadamente  $10^{-6}$  hasta aproximadamente  $10^{-14}$  M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (con respecto a la cantidad de analito de fármaco hidrófobo presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito determinan normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente mediante el intervalo de concentración de interés del analito de fármaco hidrófobo, la naturaleza del ensayo, y similares. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos se determina normalmente de manera empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en la concentración de analito de fármaco hidrófobo que es significativa debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señal y la naturaleza de los analitos determinan normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

Aunque el orden de adición puede variarse ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse de manera secuencial. Opcionalmente, puede implicarse una etapa de incubación tras cada adición tal como se comentó anteriormente.

#### Etapa de examen

En una siguiente etapa del método según la presente divulgación, se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el fármaco hidrófobo y el anticuerpo para el fármaco hidrófobo. La presencia y/o cantidad del complejo indica la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.

La frase "medir la cantidad de un analito de fármaco hidrófobo" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito de fármaco hidrófobo. Se considera que métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para determinar el analito de fármaco hidrófobo, son métodos de medición de la cantidad del analito de fármaco hidrófobo. Por ejemplo, se considera que un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito de fármaco hidrófobo en una muestra que se sospecha que contiene el analito de fármaco hidrófobo, está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detectar" y "determinar", así como otros sinónimos comunes para medir, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

En muchos aspectos el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o cantidad de la señal está relacionada con la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sps. Tal como se comentó anteriormente, hay numerosos métodos mediante los cuales un marcador de un sps puede producir una señal detectable mediante medios externos, de manera deseable mediante examen visual, e incluyen, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radiactividad, reactivos químicos y así sucesivamente.

La activación de un sistema de producción de señal depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señal. Para aquellos miembros de un sistema de producción de señal que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Para miembros de sistemas de producción de señales que están en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Otros métodos de activación se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la vista de las divulgaciones en el presente documento. Para algunos sistemas de producción de señales, no se necesita ningún agente para la activación tales como los sistemas que implican un marcador que es un marcador radiactivo, una enzima, y así sucesivamente. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

El examen para detectar la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico, y similares. La presencia y cantidad de señal detectada está relacionada con la presencia y cantidad del compuesto de fármaco hidrófobo presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente entre aproximadamente  $10^{\circ}$  y aproximadamente  $70^{\circ}\text{C}$ , o entre aproximadamente  $20^{\circ}$  y aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ , o de aproximadamente  $20^{\circ}$  a aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ . En un enfoque se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de los analitos que van a examinarse. Tal como se comentó anteriormente, también pueden usarse calibradores y otros controles.

#### Aspectos específicos de ensayos

En un ensayo homogéneo después de haber combinado todos los reactivos, se determina la señal y se relaciona

con la cantidad de analito en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT® para detectar un fármaco hidrófobo, se combina una muestra que se sospecha que contiene el fármaco hidrófobo en un medio acuoso o bien simultáneamente o bien secuencialmente con un conjugado enzimático del fármaco hidrófobo, es decir, un análogo para el fármaco hidrófobo, y anticuerpo que puede reconocer el fármaco hidrófobo. Generalmente, se añade un sustrato para la enzima, lo que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras una reacción catalizada por enzima. Enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero pueden emplearse otras enzimas. El analito de fármaco hidrófobo y los restos del conjugado enzimático compiten por sitios de unión en el anticuerpo. Entonces se determina la actividad enzimática en el medio, habitualmente mediante medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad enzimática determinada cuando se someten a prueba calibradores o muestras de referencia en las que está presente una cantidad conocida del fármaco hidrófobo. Normalmente, los calibradores se someten a prueba de una manera similar a las pruebas de la muestra que se sospecha que contiene los analitos de fármaco hidrófobo. Los calibradores contienen normalmente concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito de fármaco hidrófobo que va a determinarse. Preferiblemente, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcan el intervalo de concentraciones de analito de fármaco hidrófobo sospechadas en muestras desconocidas.

Los ensayos anteriormente mencionados pueden llevarse a cabo usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mutante como enzima del conjugado enzimático. Esta enzima mutante se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.567 y 6.033.890. Además, el ensayo puede llevarse a cabo usando anticuerpos para el fármaco hidrófobo y usando procedimientos tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.328.828 y 5.135.863.

Los ensayos heterogéneos implican habitualmente una o más etapas de separación y pueden ser de competencia o no de competencia. Se da a conocer una variedad de formatos de ensayos de competencia y no de competencia en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un tipo de ensayo de competencia, se pone en contacto un soporte, tal como se comenta en el presente documento, que tiene anticuerpos para el fármaco hidrófobo unidos al mismo con un medio que contiene la muestra y conjugados enzimáticos apropiados del fármaco hidrófobo. Tras separar el soporte y el medio, se determina la actividad enzimática del soporte o el medio mediante técnicas convencionales y se relaciona con la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.

En determinados aspectos puede emplearse una segunda enzima además de la enzima del conjugado enzimático. Las enzimas del par de enzimas están relacionadas en cuanto a que un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima.

Otro aspecto de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el anticuerpo para el fármaco hidrófobo se une de manera covalente a una partícula magnética. La muestra se incuba con estas partículas para permitir que el fármaco hidrófobo en la muestra se una a los anticuerpos para el fármaco hidrófobo. Posteriormente, una enzima que tiene el fármaco hidrófobo o un derivado del fármaco hidrófobo unido de manera covalente se incuba con las partículas magnéticas. Tras el lavado, se mide la cantidad de enzima que está unida a las partículas magnéticas y se relaciona de manera inversa con la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.

En un aspecto se mezcla la muestra de prueba o un patrón de sirolimús con un conjugado de sirolimús, es decir, por ejemplo, un análogo de sirolimús que está unido a biotina. Se deja que el sirolimús de la muestra de prueba y el análogo de sirolimús compitan por la unión al anticuerpo para el sirolimús, que puede unirse a sirolimús o al análogo de sirolimús. Tras aclarar con un tampón de lavado apropiado, puede añadirse una molécula de detección que consiste en estreptavidina o avidina conjugada con una enzima, molécula fluorescente o quimioluminiscente o resto reactivo al medio, que entonces se examina para detectar la presencia y/o cantidad de señal. La presencia y/o cantidad de señal está relacionada con la presencia y/o cantidad de sirolimús.

En un aspecto, el ensayo empleado es un ensayo de luminiscencia inducida tal como se describió anteriormente. Los reactivos incluyen dos reactivos de perlas de látex y un anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado anti-sirolimús. El primer reactivo de perla se recubre con sirolimús o un análogo de sirolimús y contiene colorante quimioluminiscente. El segundo reactivo de perla se recubre con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. En una primera etapa, se incuba una muestra que se sospecha que contiene sirolimús con anticuerpo biotinilado para sirolimús, lo cual permite que sirolimús de la muestra sature una fracción del anticuerpo biotinilado que está directamente relacionada con la concentración de sirolimús. En una segunda etapa, se añade el primer reactivo de perla y conduce a la formación de inmunocomplejos de perla/anticuerpo biotinilado con la fracción no saturada del anticuerpo biotinilado. Después se añade el segundo reactivo de perla y se une a la biotina para formar inmunocomplejos de par de perlas. Cuando se ilumina mediante luz a 680 nm, el segundo reactivo de perla convierte oxígeno disuelto en la disolución de reacción en la forma más energética de oxígeno singlete. En los pares de perlas, el oxígeno singlete se difunde al primer reactivo de perla desencadenando así una reacción quimioluminiscente. La señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración de sirolimús en la muestra. La cantidad de esta señal está relacionada con la presencia y/o cantidad de sirolimús en la muestra.



- Un ejemplo específico de otro formato de ensayo es ACMIA (inmunoensayo mediado por dióxido de cromo de afinidad). Para el formato de ensayo de ACMIA, se emplean partículas de cromo, que están recubiertas con sirolimús o un análogo de sirolimús, como primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para sirolimús. Este anticuerpo, reticulado con una enzima indicadora (por ejemplo, beta-galactosidasa), se añade a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad superior a la requerida para unirse a todo el analito que puede estar presente en una muestra. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con una muestra que se sospecha que contiene sirolimús para permitir que el analito de sirolimús se una al anticuerpo. A continuación, se añade el reactivo de partículas de cromo para unirse a cualquier exceso de conjugado de anticuerpo-enzima. Después, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y exceso de anticuerpo-enzima de la suspensión mediante tracción, y se transfiere el sobrenadante a un recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima indicadora se añade al recipiente de reacción final, y se mide la actividad enzimática de manera espectrofotométrica como cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la presencia y/o cantidad de sirolimús en la muestra.
- En un formato de ensayo de tipo sándwich, se emplean un primer reactivo que comprende partículas de cromo recubiertas con anticuerpos anti-sirolimús y un segundo reactivo que comprende un segundo anticuerpo (o proteína de unión) para el primer anticuerpo conjugado con una enzima indicadora. En este formato, la muestra que se sospecha que contiene sirolimús se incuba con las partículas de cromo de modo que todo el sirolimús, si está presente en la muestra, se une a las partículas de cromo. Se lavan las partículas de cromo, usando un imán para separar el analito unido del sobrenadante. Después, se incuba el segundo reactivo, es decir, anticuerpo (o proteína de unión) conjugado con una enzima indicadora, con las partículas de cromo para formar un "sándwich". Tras el lavado, se mide la cantidad de enzima que está unida al cromo y se relaciona con la presencia y/o cantidad de sirolimús en la muestra.
- Otro formato de ensayo es EMIT® (tecnología de inmunoensayo mediado por enzimas). En este formato de ensayo, se forma un conjugado enzimático tal como, por ejemplo, un conjugado de G-6-PDH y un análogo de sirolimús. Se incuba un anticuerpo para sirolimús con el conjugado enzimático y una muestra que se sospecha que contiene sirolimús. El anticuerpo para sirolimús se une al analito de sirolimús en la muestra en lugar de unirse al conjugado enzimático, lo cual reduce la cantidad de inhibición de la actividad enzimática que podría producirse de lo contrario en ausencia de sirolimús en la muestra. De esta manera, las muestras con más analito de sirolimús producirán una mayor actividad enzimática, y las muestras sin analito de sirolimús tendrán la máxima inhibición y la menor actividad enzimática. La cantidad de reducción de inhibición de la actividad enzimática está relacionada con la cantidad de sirolimús en la muestra.
- Los reactivos para llevar a cabo un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de un analito de fármaco hidrófobo. En una realización, un kit comprende en combinación envasada un anticuerpo para un analito de fármaco hidrófobo y otros reactivos para realizar un ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos envasados de manera separada para realizar un ensayo tal como detectar miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, y así sucesivamente.
- Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que se necesita que se produzcan durante el presente método y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método según la presente invención tal como se describió anteriormente.

#### Otros aspectos

- Un aspecto descrito en el presente documento es un método para someter a tratamiento previo una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolimús, sirolimús y ciclosporina para llevar a cabo un método de ensayo para detectar el fármaco hidrófobo. Se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende (i) la muestra, (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco hidrófobo y sus metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco hidrófobo o un éster de un metabolito del fármaco hidrófobo, y (iii) un agente de solubilidad selectiva que proporciona solubilidad sustancialmente igual del fármaco hidrófobo y sus metabolitos en el medio. El agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, y está presente en el medio en una concentración suficiente para proporcionar una solubilidad sustancialmente igual del fármaco hidrófobo y sus metabolitos en el medio, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen. Se incuba el medio en condiciones para liberar el fármaco hidrófobo y sus metabolitos de restos de unión endógenos.

Otro aspecto de la divulgación es un método para determinar un fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolímús, sirolímús y ciclosporina en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco hidrófobo. Se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende (i) la muestra, (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco hidrófobo y sus metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco hidrófobo o un éster de un metabolito del fármaco hidrófobo, y (iii) un agente de solubilidad selectiva que proporciona una solubilidad sustancialmente igual del fármaco hidrófobo y sus metabolitos en el medio, en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, y en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es suficiente para proporcionar una solubilidad sustancialmente igual del fármaco hidrófobo y sus metabolitos en el medio, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen. La combinación en el medio comprende además un agente hemolítico. Se incuba el medio en condiciones para hemolizar células en la muestra y para liberar el fármaco hidrófobo y sus metabolitos de restos de unión endógenos. Al medio se le añaden reactivos para determinar la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra en el que los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el fármaco hidrófobo. Se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el fármaco hidrófobo y el anticuerpo para el fármaco hidrófobo, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.

Otro aspecto de la divulgación es un método para determinar un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, rapamicina y everolimús en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor. Se forma una combinación en un medio en el que la combinación comprende la muestra, un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y sus metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor o un éster de un metabolito del fármaco inmunosupresor, y un agente de solubilidad selectiva para el fármaco inmunosupresor y sus metabolitos. El agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos. La concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es suficiente para proporcionar una solubilidad sustancialmente igual del fármaco inmunosupresor y sus metabolitos en el medio, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen. Se incuba el medio en condiciones para liberar el fármaco inmunosupresor y sus metabolitos de restos de unión endógenos. Al medio se le añaden (i) un reactivo que comprende (I) un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor y (II) una enzima y (ii) partículas magnéticas que comprenden el fármaco inmunosupresor o un análogo del mismo. Se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor y el anticuerpo para el fármaco inmunosupresor, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.

Otro aspecto de la divulgación es un método para determinar un fármaco inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, rapamicina y everolimús en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor. Se forma una combinación en un medio en el que la combinación comprende la muestra, un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y sus metabolitos de restos de unión endógenos, en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor o un éster de un metabolito del fármaco inmunosupresor, y un agente de solubilidad selectiva para el fármaco inmunosupresor y sus metabolitos. El agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, y la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es suficiente para proporcionar una solubilidad sustancialmente igual del fármaco inmunosupresor y sus metabolitos en el medio, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen. Se incuba el medio en condiciones para proporcionar una solubilidad sustancialmente igual del fármaco inmunosupresor y sus metabolitos en el medio. Al medio se le añaden (i) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (ii) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociada con una segunda partícula, en el que un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor está asociado con la primera partícula o la segunda partícula o ambas. Se somete la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente. Se irradia el fotosensibilizador con luz y se detecta la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente. La cantidad de luminiscencia está relacionada con la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.

Alternativamente, en el aspecto anterior, una de la primera partícula o la segunda partícula comprende el anticuerpo y la otra partícula comprende un análogo de fármaco para el fármaco inmunosupresor, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, rapamicina y everolimús. Se somete la combinación a condiciones para la competencia de las partículas recubiertas con análogo de fármaco y el fármaco inmunosupresor, si está presente, por el anticuerpo para el fármaco. Alternativamente, en el aspecto anterior, la primera partícula o la segunda partícula comprenden estreptavidina, que se combina con un análogo biotinilado para el fármaco inmunosupresor en el medio, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, rapamicina y everolimús. Se somete la combinación a condiciones para la competencia de análogo de fármaco biotinilado y el fármaco inmunosupresor por el anticuerpo para el

fármaco. En cualquiera de los aspectos alternativos anteriores, se irradia el fotosensibilizador con luz y se detecta la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente. La cantidad de luminiscencia está relacionada con la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.

- 5 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y se pretende que describan y no limiten el alcance de la invención. Las partes y los porcentajes dados a conocer en el presente documento son en volumen a menos que se indique lo contrario.

## 10 Ejemplos

### 10 Materiales:

15 Todos los productos químicos se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis MO) a menos que se indique lo contrario. El sirolimús en polvo y sus metabolitos, excepto por 27,39-O-didesmetil- (o 32,41-O-didesmetil)-sirolimús, se obtuvieron todos de Wyet Pharmaceuticals. Se obtuvo 27,39-O-didesmetil- (o 32,41-O-didesmetil)-sirolimús del laboratorio del Dr. Uwe Christains del Departamento de Anestesiología, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Colorado, Denver, Colorado.

20 Se realizaron pruebas usando el analizador DIMENSION® RxL, disponible de Dade Behring Inc., Newark DE. Se empleó el instrumento usando tecnología de inmunoensayo ACMIA. El método de ensayo ACMIA se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 7.186.518, 5.147.529, 5.128.103, 5.158.871, 4.661.408, 5.151.348, 5.302.532, 5.422.284, 5.447.870, 5.434.051. En la realización del método ACMIA usado en el presente documento y comentado con más detalle a continuación, se utilizó competencia entre análogo de sirolimús en partículas de cromo y sirolimús (SIRO) en muestras de pacientes para detectar anticuerpo para sirolimús conjugado con una enzima (conjugado) para determinar la cantidad de sirolimús en las muestras de pacientes. Se eliminó conjugado que se une al análogo de sirolimús en partículas de cromo mediante separación magnética. Se mide la actividad enzimática del conjugado restante en el sobrenadante y es directamente proporcional a la cantidad de sirolimús en la muestra de paciente. En el formato de ensayo ACMIA empleado, la actividad enzimática observada cuando se somete a prueba una muestra que no contiene sirolimús fue indicativa de la cantidad de actividad enzimática que no estaba unida al anticuerpo activo (es decir, no puede unirse a sirolimús en partículas de cromo). La actividad enzimática observada cuando están presentes partículas de cromo, es indicativa de la cantidad total de actividad enzimática en el conjugado. Estos valores pueden usarse para estimar el porcentaje de actividad enzimática unida al anticuerpo activo.

### 35 EJEMPLO 1.

Inmunoensayo automatizado para fármacos hidrófobos con diversos grados de reactividad cruzada de metabolitos utilizando un tratamiento previo no manual

#### 40 Preparación de disolución de tratamiento previo sin carbamato de FK-506 (FKE)

Se preparó esta disolución de tratamiento previo para contener hemisal de sodio de PIPES™ 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, PLURONIC® 25R2 al 0,09%, Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. No se añadió ningún disolvente orgánico en esta disolución.

#### 45 Preparación de disolución de tratamiento previo que contiene FKE 3,75 µg/ml

50 Se preparó esta disolución de tratamiento previo para contener 3,75 µg/ml de un compuesto de carbamato de FK-506 (o éster de tacrolimús), hemisal de sodio de PIPES™ 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, PLURONIC® 25R2 al 0,09%, Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. No se añadió ningún disolvente orgánico en esta disolución. La concentración de FKE en la mezcla de reacción final fue de 0,86 µg/ml.

#### Preparación de disolución de tratamiento previo que contiene FKE 15 µg/ml

55 Se preparó esta disolución de tratamiento previo para contener 15 µg/ml de un compuesto de carbamato de FK-506 (o éster de tacrolimús), hemisal de sodio de PIPES™ 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, PLURONIC® 25R2 al 0,09%, Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. No se añadió ningún disolvente orgánico en esta disolución. La concentración de FKE en la mezcla de reacción final fue de 3,4 µg/ml.

#### 60 Preparación de disolución de tratamiento previo que contiene dimetilsulfóxido al 10% (DMSO)

65 Se preparó esta disolución de tratamiento previo añadiendo DMSO hasta una concentración final del 10% (v/v) en un tampón que contenía hemisal de sodio de PIPES™ 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, 15 µg/ml de un compuesto de carbamato de FK-506 (o éster de tacrolimús), PLURONIC® 25R2 al 0,09%, Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. La concentración de DMSO en la mezcla

de reacción final fue de aproximadamente el 2,3%.

Preparación de disolución de tratamiento previo que contiene DMSO al 15%

5 Se preparó esta disolución de tratamiento previo añadiendo DMSO hasta una concentración final del 15% (v/v) en un tampón que contenía hemisal de sodio de PIPES™ 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, 15 µg/ml de un compuesto de carbamato de FK-506 (o éster de tacrolímús), PLURONIC® 25R2 al 0,09%, Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. La concentración de DMSO en la mezcla de reacción final fue de aproximadamente el 3,4%.

10

Preparación de disolución de tratamiento previo que contiene 1-metoxi-2-propanol al 10%

15 Se preparó esta disolución base de tratamiento previo añadiendo 1-metoxi-2-propanol (MP) hasta una concentración final del 10% (v/v) en un tampón que contenía hemisal de sodio de PIPES 6,8 mg/ml, EDTA de disodio 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, 15 µg/ml de un compuesto de carbamato de FK-506 (o éster de tacrolímús), Proclin 300 al 0,2%, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN<sub>3</sub> 0,99 mg/ml, pH 6,5. La concentración de MP en la mezcla de reacción de ACMIA final fue de aproximadamente el 2,3%.

20 La tabla 1 muestra la composición del reactivo de tratamiento previo para su uso en el tratamiento previo de una muestra que contiene sirolímús (AI = tal como se indica).

Tabla 1

Composición del reactivo de tratamiento previo para el ensayo ACMIA de sirolímús		
Nombre	Cantidad (por ml)	Función
Éster de FK506	15 µg	disocia sirolímús de proteína de unión
DMSO o MP	AI	disolver fármaco y metabolitos
SesquiNa PIPES	6,8 mg	tampón
EDTA de disodio	0,3 mg	previene la formación de coágulos
Saponina	1,0 mg	lisis de glóbulos rojos
Pluronic	0,9 µl	
Proclin 300	2 µl	conservante
Sulfato de neomicina	0,024 mg	conservante
NaN <sub>3</sub>	0,99 mg	conservante, matriz

25 Preparación de conjugado de β-galactosidasa-anticuerpo anti-tacrolímús

30 Se conjugó anticuerpo monoclonal anti-sirolímús (Wyet Pharmaceuticals, Cambridge MA) con β-galactosidasa usando un grupo de unión SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) heterobifuncional convencional según técnicas conocidas. La disolución de conjugado de anticuerpo contenía conjugado de β-galactosidasa-anticuerpo anti-sirolímús a aproximadamente 7,5 µg/ml, albúmina sérica bovina libre de proteasa 30 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 0,126 mg/ml, 0,03 ml/ml de etilenglicol, hemisal de sodio de PIPES 35,14 mg/ml, NaCl 50 mg/ml y beta-gal-muteína (beta-galactosidasa inactivada), pH 6,5.

35 Preparación de partículas de cromo magnéticas

40 Se prepararon partículas de cromo-sirolímús (fase sólida del inmunoensayo) conjugando conjugado de sirolímús-C26- o -C32-CMO con partículas de DA10-dexal-dióxido de cromo usando química de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.231.982. Las partículas de cromo-sirolímús se convierten entonces en comprimidos de partículas de cromo-sirolímús. Cada comprimido de sirolímús contiene aproximadamente 2 mg de suspensión de partículas de cromo-sirolímús, 30,4 mg de dihidrato de trehalosa y 3,6 mg de CARBOWAX® 100 µm.

Ensayo de sirolímús

45 El principio y el funcionamiento del ensayo ACMIA para detectar sirolímús fueron tal como sigue: se añadió reactivo de tratamiento previo sin FKE o con FKE que contenía disolvente orgánico como agente de solubilidad selectiva a un recipiente de reacción en el analizador DIMENSION® RxL. A continuación, se añadieron 18 µl de sangre completa que contenía sirolímús o sus metabolitos. Se tomaron muestras de la sangre completa a partir de un recipiente convencional mezclando en primer lugar la sangre con la sonda de muestra de ultrasonidos. El mezclado de la muestra de sangre completa con la disolución de tratamiento previo garantizó la hemólisis de la sangre completa y el desplazamiento de las moléculas de sirolímús unidas a proteínas de sus sitios de unión cuando estaban presentes moléculas de carbamato de tacrolímús. A continuación se añadió conjugado de β-galactosidasa-anticuerpo anti-sirolímús (50 µl) y se permitió que reaccionara con el sirolímús en la muestra. Se añadieron las partículas de cromo con sirolímús-CMO-DA10-Dexal inmovilizado (50 µl) y se permitió que se unieran al conjugado sin unir. El conjugado de β-galactosidasa-anticuerpo anti-sirolímús unido a sirolímús no se unió a las partículas de cromo sino que

55

permaneció en el sobrenadante cuando se aplicó un campo magnético a la mezcla de reacción anterior para separar la disolución de las partículas de cromo. Se detectó el conjugado unido a sirolimús transfiriendo el sobrenadante del recipiente de reacción a una cubeta fotométrica y midiendo la tasa enzimática del conjugado en presencia de clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido (CPRG). Se midió la tasa bicromáticamente a 577 y 700 nm.

#### Comparación de diferentes reactivos de tratamiento previo

Se usó DMSO al 10 ó 15% o MP al 10% con FKE para preparar disoluciones de tratamiento previo independientes (tal como se comentó con más detalle anteriormente) para el ensayo ACMIA llevado a cabo en el analizador DIMENSION® RxL para medir concentraciones de sirolimús y sus metabolitos en muestras de sangre completa. Se preparó otra disolución de tratamiento previo sin los disolventes orgánicos mencionados anteriormente y FKE como control para el ensayo ("Control"). Se usaron las disoluciones de tratamiento previo con y sin adiciones conocidas de los disolventes orgánicos mencionados para preparar los cartuchos de reactivo para el ensayo ACMIA de sirolimús en el analizador de química clínica DIMENSION®. Cuando no se usaron los disolventes mencionados anteriormente y FKE, todos los metabolitos mostraron altas recuperaciones en la muestras de sangre completa. En las siguientes tablas se notifican las recuperaciones de metabolitos de sirolimús como porcentaje de la recuperación del fármaco original, sirolimús.

Durante el experimento, se liberó una cantidad sustancial de fármaco sirolimús por FKE tal como se muestra mediante un gran aumento en la separación de señal frente al control sin FKE. El experimento anterior se realizó sin disolvente orgánico añadido y la mezcla de reacción fue básicamente una disolución acuosa. La adición de disolvente orgánico miscible con agua tal como alcohol o DMSO en el reactivo de tratamiento previo redujo significativamente la reactividad cruzada de metabolito tal como se indica en la tabla. Cuando no se añadió ningún disolvente orgánico, la reactividad cruzada de metabolito fue la más alta (el control en la tabla 2 a continuación). Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

Reactividad cruzada de metabolito* usando reactivo que contiene diversos disolventes orgánicos			
Tratamiento	% de disolvente en el react. de tratamiento previo**	% de disolvente en la mezcla de reacción	% de reactividad cruzada
Control	-	-	180
DMSO	10	2,3	100
DMSO	15	3,4	88
Metoxipropanol	10	2,3	92

\* Se usa 27,39-didesmetil-sirolimús en este estudio  
 \*\* El reactivo de tratamiento previo contiene éster de FK506 15 µg/ml

En el estudio al que se hace referencia en la tabla 2 anterior, se usó 27,39-didesmetil-sirolimús para el examen de disolventes orgánicos debido a su hidrofiliya relativamente alta.

La tabla 3 ilustra el efecto de FKE y disolvente orgánico mostrado a modo de ejemplo por DMSO sobre el porcentaje de reactividad cruzada de metabolitos de sirolimús.

Tabla 3

Efecto de FKE y DMSO sobre la reactividad cruzada de metabolitos de sirolimús			
Metabolito	PT* sin FKE ni DMSO	PT con FKE 15 µg/ml	PT con FKE 15 µg/ml y DMSO al 15%
41-O-desmetil-(sur) hidroxí-sirolimús	62	7	-1
7-O-desmetil-sirolimús	6	7	-3
11-hidroxí-sirolimús	315	78	35
11-hidroxí-sirolimús (isómero del anterior)	114	34	9
(sur)hidroxí-siro-2H	17	11	0
(N-óxido) de hidroxí-sirolimús	152	49	13
(sur)hidroxí-siro-2H (isómero) 41-O-desmetil-(sur)dihidroxí-siro-2H	32	7	0
41-O-desmetil-sirolimús	48	39	40
32-O-desmetil-sirolimús	34	8	-3
27,39-didesmetil- sirolimús	569	165	88

\*PT = Reactivo de tratamiento previo

- 5 En los reactivos de inmunoensayo acuosos habituales que no contienen FKE ni DMSO, se detectó el 315% de reactividad cruzada para 11-hidroxi-sirolimús debido a su naturaleza hidrófila. En presencia de FKE pero sin DMSO, su reactividad cruzada fue del 78%, significativamente más baja que en ausencia de FKE pero más alta que cuando estaban presentes tanto FKE como DMSO. La reactividad cruzada de 11-hidroxi-sirolimús fue la más baja (35%) cuando se formularon tanto FKE como DMSO en el reactivo de tratamiento previo. La reactividad cruzada de otros metabolitos de sirolimús siguió el mismo patrón: la reactividad cruzada es la más alta cuando el reactivo de tratamiento previo no contiene FKE ni DMSO y es la más baja cuando ambos están presentes.

## REIVINDICACIONES

1. Método para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolimús, sirolimús, everolimús y ciclosporina con respecto a la de metabolitos del fármaco hidrófobo, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) una muestra de sangre completa,
- (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco hidrófobo y los metabolitos de restos de unión endógenos en el que el agente de liberación es un éster del fármaco hidrófobo, y
- (iii) un agente de solubilidad selectiva para el fármaco hidrófobo en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen, y
- (b) incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio.
2. Método para determinar un fármaco hidrófobo en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene el fármaco hidrófobo que comprende el método para potenciar de manera selectiva la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en tacrolimús, sirolimús, everolimús y ciclosporina con respecto a la de metabolitos del fármaco hidrófobo según la reivindicación 1, en el que la combinación en el medio comprende además un agente hemolítico y en el que en la etapa (b) el medio se incuba en condiciones para hemolizar células en la muestra y para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio, y en el que el método comprende además:
- (c) añadir al medio reactivos para determinar la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra en el que los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el fármaco hidrófobo, y
- (d) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el fármaco hidrófobo y el anticuerpo para el fármaco hidrófobo, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco hidrófobo en la muestra.
3. Método según la reivindicación 2, en el que los reactivos en la etapa (c) comprenden además un análogo del fármaco hidrófobo y al menos uno del anticuerpo para el fármaco hidrófobo o el análogo comprende un marcador.
4. Método según la reivindicación 2, en el que en la etapa (c) se añade un segundo anticuerpo al medio en el que el segundo anticuerpo se une a un complejo del fármaco hidrófobo y el anticuerpo para el fármaco hidrófobo.
5. Método según la reivindicación 4, en el que al menos uno de los anticuerpos para el fármaco hidrófobo y el segundo anticuerpo comprende un marcador.
6. Método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre completa que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) la muestra,
- (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y los metabolitos de restos de unión endógenos en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor y
- (iii) un agente de solubilidad selectiva para el inmunosupresor en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen,
- (b) incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio,

- (c) añadir al medio (i) un reactivo que comprende (I) un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor y (II) una enzima y (ii) partículas magnéticas que comprenden el fármaco inmunosupresor o un análogo del mismo, y
- 5 (d) examinar el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor y el anticuerpo para el fármaco inmunosupresor, indicando la presencia y/o cantidad del complejo la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra,
- 10 en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, sirolímús y everolímús.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el examen comprende separar las partículas magnéticas del medio.
- 15 8. Método según la reivindicación 6, en el que las partículas magnéticas son partículas de dióxido de cromo.
9. Método para determinar la presencia o cantidad de un fármaco inmunosupresor en un medio que se sospecha que contiene un fármaco inmunosupresor, comprendiendo el método:
- 20 (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) una muestra de sangre completa,
- 25 (ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor y los metabolitos de restos de unión endógenos en el que el agente de liberación es un éster del fármaco inmunosupresor y
- 30 (iii) un agente de solubilidad selectiva para el fármaco inmunosupresor en el que el agente de solubilidad selectiva comprende un disolvente orgánico, no volátil, miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en dimetilsulfóxido y 1-metoxi-2-propanol, o una combinación de los mismos, en el que la concentración del agente de solubilidad selectiva en el medio es del 10% al 30% en volumen,
- (b) incubar el medio en condiciones para potenciar la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio,
- 35 (c) añadir al medio (i) un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que puede generar oxígeno singlete, y (ii) una composición quimioluminiscente que puede activarse mediante oxígeno singlete y asociada con una segunda partícula, en el que un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor está asociado con la primera partícula o la segunda partícula o ambas,
- 40 (d) someter la combinación a condiciones para la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor, si está presente, y
- 45 (e) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, estando la cantidad de luminiscencia relacionada con la cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra,
- en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolímús, ciclosporina, sirolímús y everolímús.
- 50 10. Método según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo está asociado con la primera partícula y en el que la segunda partícula comprende un análogo del fármaco inmunosupresor unido a la misma.