

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 326**

51 Int. Cl.:

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2011 PCT/US2011/041412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11163340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011 E 11798829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2585832**

54 Título: **Reducción de resultados falsos en mediciones de ensayo**

30 Prioridad:

25.06.2010 US 823953

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

WEI, TIE, Q.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 665 326 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reducción de resultados falsos en mediciones de ensayo

Antecedentes

5 La invención se refiere a métodos y kits para la determinación de la concentración de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. Más particularmente, la invención se refiere a la reducción de resultados falsos en las mediciones realizadas durante los métodos anteriores para la determinación de la concentración de un analito en una muestra.

10 El cuerpo se apoya en un sistema de respuesta inmune complejo para distinguir el propio de uno no propio. A veces, el sistema inmunitario del cuerpo debe ser controlado para aumentar una respuesta deficiente o suprimir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando los órganos como el riñón, corazón, corazón-pulmón, médula ósea e hígado se trasplantan en humanos, el cuerpo a menudo rechazará el tejido trasplantado mediante un proceso denominado rechazo de aloinjerto.

15 En el tratamiento del rechazo de aloinjerto, el sistema inmune se suprime con frecuencia de forma controlada con terapia farmacológica. Se administran medicamentos inmunosupresores cuidadosamente a los receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjertos de tejido no propio. Los dos fármacos inmunosupresores más comúnmente administrados para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados son la ciclosporina (CSA) y FK-506 (FK o tacrolimus). Otro fármaco que se usa como inmunosupresor en los Estados Unidos y en otros países es el sirolimus, también conocido como rapamicina. También se dice que los derivados de sirolimus son útiles como inmunosupresores. Tales derivados incluyen, por ejemplo, Everolimus, y similares.

20 Los efectos secundarios asociados con algunos fármacos inmunosupresores se pueden controlar en parte controlando cuidadosamente el nivel del fármaco presente en un paciente. La monitorización terapéutica de las concentraciones de fármacos inmunosupresores y fármacos relacionados en la sangre es necesaria para optimizar los regímenes de dosificación para asegurar una inmunosupresión máxima con una toxicidad mínima. Aunque los fármacos inmunosupresores son agentes inmunosupresores altamente efectivos, su uso debe manejarse con cuidado debido a que el rango de dosis efectiva es a menudo estrecho y la dosificación excesiva puede dar lugar a efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosis muy baja de un inmunosupresor puede provocar el rechazo del tejido. Debido a que la distribución y el metabolismo de un fármaco inmunosupresor puede variar mucho entre los pacientes y debido al amplio rango y la gravedad de las reacciones adversas, es esencial un control preciso del nivel del fármaco.

30 En el campo de la monitorización de fármacos terapéuticos, la detección selectiva del fármaco original sobre sus metabolitos a menudo es un objetivo importante para diseñar inmunoensayos. Esto es especialmente cierto para los fármacos inmunosupresores. Por esa razón, los ensayos HPLC en tándem con MS se han convertido en métodos estándar para la medición de sirolimus, tacrolimus y otros fármacos inmunosupresores debido a su capacidad para medir selectivamente el fármaco original. Sin embargo, los métodos anteriores son costosos y consumen mucho tiempo y a menudo se emplean para verificar resultados positivos obtenidos por otro método de ensayo en lugar de utilizarse en laboratorios como una determinación inicial.

40 La mayoría de los análisis de sangre entera para fármacos inmunosupresores requieren una etapa manual usando reactivos para extraer el fármaco de los constituyentes de la sangre. Como resultado, las moléculas de fármaco y las moléculas de metabolito de fármaco se disocian de proteínas de unión endógenas y se extraen en una solución relativamente limpia en la que se eliminan las proteínas plasmáticas y las partículas de lipoproteínas, así como la mayoría de las otras moléculas. Debido a que las técnicas de precipitación se usan habitualmente, la muestra extraída está básicamente libre de la mayoría de las macromoléculas sanguíneas, incluidas las proteínas de unión a fármacos. Por lo 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 anticuerpos en tales ensayos.

50 En un ensayo homogéneo para un fármaco inmunosupresor en el que no hay extracción o separación manual del fármaco de los constituyentes sanguíneos, un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor tiene que detectar el fármaco en presencia de la mayoría de o todos los constituyentes sanguíneos, cuya presencia podría interferir con la unión del anticuerpo al fármaco inmunosupresor y conducir a un falso resultado del ensayo.

Existe, por lo tanto, una necesidad continua de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir los niveles de analitos en muestras tomadas de un paciente. Los métodos deben ser totalmente automatizables y precisos incluso cuando se realicen en muestras que tengan varias sustancias interferentes. El ensayo debe proporcionar una medición precisa de la cantidad de analito en la muestra, al tiempo que se minimizan las imprecisiones resultantes de

sustancias interferentes presentes en la muestra. La reducción en las mediciones de ensayo falso es importante para la precisión de los métodos.

Resumen

5 Una realización de la presente invención es un método para reducir resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. El método comprende medir la señal de ensayo resultante del fondo solamente y medir la señal del ensayo resultante de la presencia de analito en la muestra más el fondo y la sustracción de (a) de (b) para determinar la concentración de analito en la muestra.

10 Otra realización de la presente invención es un método para reducir resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. En el método, el resultado de medición 1 se determina por medio de un ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente secuestrado y el resultado de medición 2 se determina por medio del ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente no secuestrado. El resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra.

15 Otra realización de la presente invención es un método para reducir resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. El resultado de medición 1 se determina por medio de un ensayo llevado a cabo en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente secuestrado. El resultado de la medición 2 se determina por medio del ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra no está sustancialmente secuestrado. El ensayo comprende añadir reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra del resultado de medición 1 y a un medio que comprende la muestra del resultado de medición 2 donde los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito. Se mide una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito para cada ensayo. El resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra.

25 Descripción detallada de realizaciones específicas

La presente invención se refiere a la medición precisa de una concentración de analito en una muestra mediante la reducción o eliminación de resultados falsos de ensayo. En realizaciones de los presentes métodos, se llevan a cabo al menos dos mediciones de ensayo. La primera medición mide el nivel de señal generado solo por los componentes de la muestra distintos del analito, que se unen a los reactivos empleados en el ensayo de forma específica o no específica. La segunda medición mide el nivel de señal generado por el analito y los otros componentes de la muestra, que se unen a los reactivos del ensayo. La diferencia entre las dos mediciones representa el nivel de señal del analito solamente y, por lo tanto, es representativa de solo la cantidad de analito en la muestra.

35 Las realizaciones de los presentes métodos están dirigidas a reducir resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. Una muestra para analizar se obtiene de una fuente de muestra y se divide en porciones. En el método, el resultado de medición 1 se determina por medio de un ensayo realizado en una porción de la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente secuestrado y el resultado de medición 2 se determina mediante el ensayo realizado en otra porción de la muestra de igual tamaño donde el analito en la muestra está sustancialmente no secuestrado. El resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra.

40 La muestra que se probará puede ser no biológica o biológica. Las "muestras no biológicas" son aquellas que no se relacionan con un material biológico e incluyen, por ejemplo, muestras de suelo, muestras de agua, muestras de aire, muestras de otros gases y muestras de minerales. La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser sólida, semisólida o líquida (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, un aspirado corporal, una sección corporal o un extracto corporal. El cuerpo es generalmente el de un mamífero y en algunas realizaciones el cuerpo es un cuerpo humano. Las excreciones corporales son aquellas sustancias que se excretan del cuerpo (aunque también se pueden obtener por escisión o extracción) como, por ejemplo, orina, heces, heces, moco vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, líquido de ampollas e inflamación exudado. Las secciones corporales son aquellos materiales que se extirpan de un cuerpo como, por ejemplo, muestras de piel, cabello y tejidos, incluidas biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Los aspirados corporales son aquellos materiales que se aspiran de un cuerpo como, por ejemplo, el moco, la saliva y el esputo. Los extractos corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo tal como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, fluido espinal, fluido espinal cerebral, fluido linfático, fluido sinovial y fluido peritoneal.

55 El analito puede secuestrarse sustancialmente como resultado de una o más de la presencia de componentes que se producen naturalmente en la muestra (que incluye retener un reactivo de un medio de ensayo que de otro modo

ayudaría a hacer que el analito esté disponible para unirse a un asociado de unión (secuestrando así la señal del analito) o la adición de un agente secuestrante a la muestra o una combinación de los anteriores. En el contexto de las presentes realizaciones, "sustancialmente secuestrado" significa que el analito es al menos 80% o al menos 90%, o al menos el 95%, o al menos el 99%, o al menos el 99.5%, o al menos el 99.9% o está 100% no disponible para la detección durante un ensayo. Por ejemplo, el analito puede no estar disponible para ser detectado por un asociado vinculante el analito que se emplea para unirse al analito para formar un complejo inmune que sirve como base para determinar la cantidad de analito en una muestra.

Los agentes secuestrantes que se producen naturalmente son aquellos componentes de una muestra que están presentes en la muestra como tomados de una fuente, esto es, los componentes son endógenos a la muestra. La naturaleza de los agentes secuestrantes de origen natural depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza de la fuente de la muestra, la naturaleza del analito y la naturaleza del complejo molecular que comprende el analito, por ejemplo. Los agentes secuestrantes de origen natural incluyen, a modo ilustrativo y no limitativo, materiales lipófilos tales como, por ejemplo, lipoproteínas, bicapa lipídica y membranas de plasma; células tales como, por ejemplo, glóbulos rojos; y proteínas tales como, por ejemplo, proteínas de unión a fármacos endógenas tales como, por ejemplo, FKBP12, inmunofilina, glicoproteínas ácidas $\alpha 1$, diana de rapamicina (TOR), anticuerpos antianalito y receptores.

Los agentes secuestrantes que pueden añadirse a la muestra son agentes que son externos a la muestra e incluyen materiales naturales y sintéticos. La naturaleza de los agentes secuestrantes que pueden agregarse depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza de la fuente de la muestra, la naturaleza del analito y la naturaleza del complejo molecular que comprende el analito, por ejemplo. El agente secuestrante no debe interferir con otros reactivos usados en un ensayo tal como, por ejemplo, asociados de unión y reactivos que producen señal; el agente secuestrante externo no debe interferir con la generación de una señal de ensayo. Los agentes secuestrantes de origen natural que pueden añadirse a la muestra para secuestrar un analito incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, materiales lipófilos tales como, por ejemplo, lipoproteínas, proteínas de unión tales como inmunofilinas, proteínas de unión a FK y TOR; receptores tales como, por ejemplo, receptores de proteínas que incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos (policlonales y monoclonales, por ejemplo), proteína A, anticuerpos antianalito y anticuerpos fragmentados antianalito; construcciones sintéticas tales como, por ejemplo, liposomas; lipoproteínas tales como, por ejemplo, quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia y lipoproteínas de alta densidad; o una combinación de dos o más de los anteriores. La cantidad de agente secuestrante añadido a la muestra depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza de la fuente de la muestra, la naturaleza del analito y la naturaleza del complejo molecular que comprende, por ejemplo, el analito.

La cantidad de agente secuestrante que se agrega a la muestra es la que es suficiente para secuestrar el analito de modo que la señal obtenida en un ensayo en la muestra sea representativa únicamente de los componentes en la muestra y no del analito. En algunas realizaciones, la cantidad de agente secuestrante está en el intervalo (porcentajes son en peso) de aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 0.00001% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 2%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 80%.

En algunas realizaciones, el analito no secuestrado en la porción de muestra 1 se puede eliminar de la muestra antes de realizar un ensayo en la porción de muestra 1. Los métodos para retirar o extraer el analito de la muestra incluyen extracción con disolvente usando, por ejemplo, un disolvente, o una combinación de un disolvente orgánico y agua, por ejemplo.

En algunas realizaciones, el analito en una muestra puede ser parcialmente secuestrado por agentes secuestrantes de origen natural. En dichas realizaciones, se puede añadir un agente secuestrante que es externo a la muestra de modo que el analito quede sustancialmente secuestrado. La cantidad de agente secuestrante externo que se agrega es suficiente para secuestrar el analito no secuestrado de modo que el analito en la muestra se secuestra sustancialmente y la señal obtenida en un ensayo en la muestra es representativa de los componentes en la muestra y no del analito.

En algunas realizaciones, el analito en una muestra puede ser total o parcialmente secuestrado retirando un agente que de otro modo podría añadirse para ayudar en la medición del analito. En dichas realizaciones, un agente

potenciador de señal de analito que es externo a la muestra puede eliminarse de los reactivos de ensayo de modo que el analito quede sustancialmente secuestrado. Por ejemplo, el reactivo de liberación para el ensayo de tacrolimus contiene tres componentes principales para aumentar la señal del ensayo. El primer componente es el éster de FK (FKE), que libera el fármaco de las proteínas de unión endógenas. Este agente puede aumentar significativamente la señal del analito porque más del 90% del fármaco está unido a proteínas y no es accesible para el anticuerpo del ensayo. Liberar el fármaco de las proteínas de unión da como resultado un aumento de la señal de 7 veces. Si se elimina FKE del reactivo de pretratamiento, la señal del analito queda sustancialmente secuestrada. El segundo componente es un agente de lisis tal como, por ejemplo, un detergente. El detergente hace que el tacrolimus hidrófilo sea más miscible en agua en una mezcla de ensayo acuosa, haciéndolo así más accesible por los agentes de medición de ensayo tales como anticuerpos de ensayo. Si los detergentes se eliminan del reactivo, las moléculas del fármaco son menos accesibles para el anticuerpo del ensayo, lo que da como resultado una señal de analito secuestrada. El tercero es un detergente que puede evitar que el fármaco se difunda en partículas de lipoproteínas u otro tipo de liposomas. Por ejemplo, el detergente PLURONIC® es un detergente utilizado en un ensayo de tacrolimus para evitar que el fármaco se difunda en el núcleo de los complejos de lipoproteínas. La eliminación de dicho detergente de los reactivos de ensayo potencia la difusión del fármaco en las lipoproteínas, lo que da como resultado una señal de analito sustancialmente secuestrado.

El analito es una sustancia de interés o el compuesto o composición por detectar y/o cuantificar. Los analitos incluyen, a modo ilustrativo y no limitativo, fármacos terapéuticos, fármacos de abuso, metabolitos, pesticidas, compuestos orgánicos volátiles, compuestos orgánicos semivolátiles, compuestos orgánicos no volátiles, proteínas, polisacáridos, contaminantes, toxinas, lípidos y ácidos nucleicos, (ADN, ARN), por ejemplo.

Los analitos de fármacos representativos, a modo de ilustración y sin limitación, incluyen alcaloides, esteroides, lactamas, aminoalquilbencenos, benzeterocíclicos, purinas, fármacos derivados de la marihuana, hormonas, polipéptidos que incluyen proteínas, inmunosupresores, vitaminas, prostaglandinas, antidepresivos tricíclicos, antineoplásicos, nucleósidos y nucleótidos, incluidos polinucleótidos y polinucleótidos, medicamentos diversos que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistamínicos, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos y metabolitos y derivados de todo lo anterior.

También se incluyen dentro del término analito metabolitos relacionados con estados de enfermedad, aminoglucósidos, tales como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amicacina, y pesticidas tales como, por ejemplo, bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos y sulfenamidas polihalogenadas y sus metabolitos y derivados.

El término analito también incluye combinaciones de dos o más de polipéptidos y proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Tales combinaciones incluyen, por ejemplo, componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos y membranas celulares. Los analitos proteicos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos cancerosos, marcadores nutricionales y antígenos específicos de tejidos. Dichas proteínas incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas no clasificadas, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas que se encuentran en el plasma humano, factores de coagulación sanguínea, hormonas proteicas tales como, por ejemplo, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citoquinas, antígenos cancerosos tales como, por ejemplo, PSA, CEA, afetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9 y CA125, antígenos específicos de tejido, tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son mucopolisacáridos y polisacáridos. Como se indicó anteriormente, el término analito incluye además oligonucleótidos y analitos de polinucleótidos tales como ARNm, ARNm, ARNt, ADN y dúplex ADN-ARN, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, se emplea una porción de la misma muestra para realizar ensayos para determinar cada uno de los resultados de medición 1 y 2. Para las mediciones, la porción de muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. El tamaño de la porción de muestra depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los diversos reactivos para realizar el ensayo y la naturaleza del complejo que comprende el analito, por ejemplo. El tamaño de la porción de muestra debe ser el mismo para ambas mediciones. En algunas realizaciones, el volumen de la porción de muestra es de aproximadamente 1 µL a aproximadamente 100 µL, o aproximadamente 2 µL a aproximadamente 100 µL, o aproximadamente 5 µL a aproximadamente 100 µL, o aproximadamente 10 µL a aproximadamente 100 µL, o aproximadamente 1 µL a aproximadamente 80 µL, o aproximadamente 1 µL a aproximadamente 60 µL, o aproximadamente 1 µL a aproximadamente 40 µL, o aproximadamente 1 µL a aproximadamente 20 µL, o aproximadamente 5 µL a aproximadamente 50 µL, o aproximadamente 10 µL a aproximadamente 50 µL, por ejemplo.

La porción de la muestra para llevar a cabo un ensayo para obtener el resultado de medición 1 se trata con un agente secuestrante para el analito si el analito no está ya sustancialmente secuestrado por uno o más agentes secuestrantes

endógenos como se discutió anteriormente. Como se menciona anteriormente, la cantidad de agente secuestrante que se agrega a la muestra es la que es suficiente para secuestrar el analito de modo que la señal obtenida en un ensayo en la muestra sea representativa únicamente de los componentes en la muestra y no del analito. Después de la adición de un agente secuestrante externo, la muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para secuestrar sustancialmente el analito. La duración y las condiciones de la incubación dependen de una o más de la naturaleza del agente secuestrante, la naturaleza del analito y la concentración sospechada del analito, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. La incubación normalmente se lleva a cabo en un medio, que por conveniencia puede ser un medio de ensayo como se analiza en el presente documento, pero no es necesario.

Después del tratamiento, si es necesario, de una primera porción de la muestra con un agente secuestrante, la porción de muestra se somete a un ensayo para determinar el resultado de la medición 1. Como se explica más detalladamente a continuación, se puede emplear cualquier ensayo. El ensayo comprende añadir reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra. En algunas realizaciones, el ensayo es un inmunoensayo y los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito. Se mide una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito. De esta manera, la primera medición mide el nivel de señal generado solo por componentes de la muestra distintos del analito que se une al anticuerpo para que el analito forme un complejo que comprende el anticuerpo para el analito.

De acuerdo con las presentes realizaciones, una segunda porción de la muestra se somete al mismo ensayo en el que el analito en la porción de muestra no está sustancialmente secuestrado y se determina un resultado 2 de medición del ensayo. En algunas realizaciones que dependen de la naturaleza de la muestra y del analito, se añaden uno o más agentes de liberación a la muestra para liberar el analito de cualquier sustancia de unión endógena presente en la muestra. La naturaleza de los agentes liberadores depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza de la muestra, la naturaleza de las sustancias de unión endógenas en la muestra y la naturaleza de los materiales de unión del analito, como, por ejemplo, proteínas de enlace al analito, por ejemplo. El agente de liberación puede, y en muchos casos, desplazar el analito y los metabolitos del analito de unidades estructurales de unión endógenas. En algunas realizaciones, el agente de liberación tiene una alta afinidad de unión a las proteínas de unión endógenas de modo que desplaza fácilmente el analito y, en algunos casos, sus metabolitos, de las proteínas de unión endógenas. Además, el agente liberador no se une en ningún grado significativo a un anticuerpo para el analito que se usa en el ensayo. Con la expresión "no se une a ningún grado significativo" se quiere decir que el grado de unión debe ser lo suficientemente bajo como para que pueda llevarse a cabo un ensayo preciso para el analito.

El agente de liberación puede ser cualquier unidad estructural, ya sea un compuesto único o una mezcla de compuestos, que logra el resultado deseado de desplazamiento sin unión significativa a los reactivos de ensayo tales como, por ejemplo, un anticuerpo de ensayo. En algunas realizaciones, el agente liberador desplaza el analito, y sus metabolitos si es necesario, de sustancias de unión endógenas para hacer que tanto el analito como los metabolitos sean sustancialmente igualmente accesibles a un asociado de unión para el analito, como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito. La cantidad de metabolitos disponibles para unirse a un anticuerpo para el analito depende de consideraciones tales como, por ejemplo, la afinidad de unión de metabolitos particulares por el anticuerpo para el analito.

En algunas realizaciones, el agente de liberación es un análogo, que incluye análogos estructurales, del analito. Un análogo de analito es un analito modificado que puede desplazar el analito análogo de una proteína de unión pero que no compite en un grado sustancial con un receptor tal como un anticuerpo para el analito. La modificación proporciona medios para unir un analito análogo a otra molécula. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que una el análogo del analito a un núcleo o etiqueta, pero no es necesario. El análogo del analito puede ser, por ejemplo, el analito conjugado a otra molécula a través de un grupo de enlace, y así sucesivamente. Para analitos que comprenden una funcionalidad hidroxilo o ácido carboxílico, el agente liberador puede ser un éster del analito, que tiene una alta afinidad de unión por proteínas de unión endógenas en relación con el analito por detectar y que no tiene una afinidad de unión significativa por un anticuerpo para el analito. Un análogo estructural es una unidad estructural que tiene las mismas o similares características espaciales o estructurales que el analito, de modo que el análogo estructural logra el mismo o similar resultado que el análogo del analito. El análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el analito.

En algunas realizaciones, el agente de liberación puede ser un agente que interrumpe las membranas celulares en las que está atrapado el analito. Por ejemplo, un analito que está atrapado dentro de los glóbulos rojos puede ser liberado de los glóbulos rojos mediante el empleo de un agente hemolítico. Un agente hemolítico es un compuesto o mezcla de compuestos que interrumpe la integridad de las membranas de los glóbulos rojos liberando de ese modo contenidos intracelulares de las células y, en particular, de los eritrocitos. Numerosos agentes hemolíticos son conocidos en la técnica. Los agentes hemolíticos incluyen, por ejemplo, detergentes no iónicos, detergentes aniónicos,

detergentes anfóteros, soluciones acuosas de baja fuerza iónica (soluciones hipotónicas), agentes bacterianos, anticuerpos que causan lisis dependiente del complemento y similares. Los detergentes no iónicos que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen detergentes sintéticos y detergentes naturales. 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) sorbitán), TWEEN® 80 (polioxietileno (20) sorbitan monooleato), DOWFAX®, ZONYL®, pentaeritritil palmitato, ADOGEN® 464, tensioactivo ALKANOL® 6112, alcohol alílico 1,2-butoxilato-bloque-etoxilato HLB 6, BRIJ®, etilendiamina tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato)tetrol, IGEPAL®, MERPOL®, poli(etilenglicol), 2-[etil[(heptadecafluorooctil)sulfonil]amino]etil éter, polietileno-bloque-poli(etilenglicol), polioxietileno sorbitán tetraoleato, polioxietileno sorbitol hexaoleato, TERGITOL® NP-9, GAFAC® (RHODAFAC®, un alquilpolioxietilenglicol fosfato éster tal como, por ejemplo, alfa-dodecil-omega-hidroxi-poli(oxi-1,2-etanodiol)fosfato) y EP110® y similares. Los detergentes de origen natural que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, ácidos grasos neutralizados con sodio o potasio, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidilserina neutralizada, fosfatidato, fosfatidiletanolamina neutralizada, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, sales biliares, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También se pueden emplear combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes naturales y combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes naturales.

Otros agentes de liberación que se pueden emplear en las presentes realizaciones incluyen reactivos de solubilidad tales como, por ejemplo, una pequeña cantidad de un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, metoxipropanol y DMSO; y agentes para llevar a cabo la digestión de proteínas tales como, por ejemplo, proteinasas, tripsina, pepsina, peptidasas; por ejemplo.

La concentración del agente de liberación en el medio es suficiente para lograr el resultado deseado de liberación del analito y, en algunos casos, metabolitos del analito, de unidades estructurales de unión endógenas para hacer que el analito y los metabolitos sean accesibles para la unión a un anticuerpo para el analito como se discutió anteriormente. El analito se vuelve sustancialmente no secuestrado. En el contexto de las presentes realizaciones, "sustancialmente no secuestrado" significa que el analito es al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99%, o al menos 99.5%, o al menos 99.9% o está 100% disponible para la detección durante un ensayo. La cantidad o concentración del agente liberador empleado depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del analito, la naturaleza de los metabolitos del analito, la naturaleza de otros componentes reactivos y las condiciones de reacción, por ejemplo. En algunas realizaciones, la cantidad del agente de liberación es de aproximadamente 0.000001% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 0.4%, aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.3%, aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.2%, aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3%, aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.2%, y así sucesivamente (el porcentaje es peso/volumen).

Después de la adición de un agente de liberación, la segunda porción de muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para liberar sustancialmente el analito. La duración y las condiciones de la incubación dependen de una o más de las características del agente liberador, la naturaleza del analito, la concentración sospechada del analito, la afinidad del anticuerpo y la avidéz y la fragmentación del anticuerpo, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. La incubación normalmente se lleva a cabo en un medio, que por conveniencia puede ser un medio de ensayo como se analiza en el presente documento, pero no es necesario.

Después del tratamiento, si es necesario, de una segunda porción de la muestra con un agente de liberación, la porción de muestra se somete al mismo ensayo que para la primera porción de la muestra para determinar un resultado de medición de ensayo 2. Como se discute más completamente abajo, cualquier ensayo puede ser empleado. El ensayo comprende añadir reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra. Para los inmunoensayos, los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito. Se mide una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito y la cantidad del complejo se relaciona con la concentración del analito y otras sustancias en la muestra. De esta manera, la segunda medición mide el nivel de señal generado por el analito y otros componentes de la muestra, que, por ejemplo, se unen al anticuerpo para que el analito forme un complejo que comprende el anticuerpo para el analito. Por consiguiente, la expresión "complejo que comprende el anticuerpo para el analito" se refiere a un complejo en el que el anticuerpo para el analito está complejado con una o más sustancias que pueden ser uno o más del analito y otras sustancias en una muestra que se unen al anticuerpo para el analito.

Los ensayos realizados en la primera y segunda porciones de muestra se pueden llevar a cabo secuencialmente o de forma concomitante en recipientes de reacción separados o secuencialmente en el mismo recipiente de reacción.

Después de los ensayos realizados en la primera y segunda porciones de muestra para obtener el resultado de medición 1 y el resultado de medición 2, respectivamente, el resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra, la cual es representativa de la concentración de solo el analito en la muestra. La diferencia entre las dos mediciones, por lo tanto, representa el nivel de señal del analito solamente.

Descripción general de los ensayos para un analito

Se puede emplear cualquier ensayo adecuado para determinar el resultado de medición de ensayo 1 y el resultado de medición de ensayo 2 como se discutió anteriormente. Los ensayos pueden realizarse en las porciones de muestra como una continuación inmediata del tratamiento de las porciones como se discutió anteriormente o el ensayo puede llevarse a cabo en un punto posterior. Los ensayos se realizan combinando las porciones de muestra respectivas con reactivos para determinar la cantidad de analito en la muestra. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo que se va a realizar. En general, el ensayo es un método para la determinación de la cantidad de un analito en una muestra. El ensayo puede ser un inmunoensayo o un ensayo no inmunitario. Diversos métodos de ensayo se discuten a continuación a modo de ilustración y no de limitación.

En muchas realizaciones, los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito y el ensayo generalmente se denomina inmunoensayo, a diferencia de los ensayos que no utilizan un anticuerpo, los cuales se denominan ensayos no inmunitarios. Por la expresión "anticuerpo para el analito" se entiende un anticuerpo que se une específicamente al analito (y a análogos estructurales estrechamente relacionados del analito, como los metabolitos del analito) y no se une de manera significativa a otras sustancias que distorsionarían el análisis para el analito.

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 tales como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el analito. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos homogéneos sin separación en los que los reactivos marcados modulan la señal de etiqueta tras las reacciones de unión analito-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye análisis competitivos limitados de reactivos marcados para analitos que evitan el uso de haptenos etiquetados problemáticos. En este tipo de ensayo, un analito inmovilizado en fase sólida está presente en una cantidad constante y limitada. La partición de una etiqueta entre el analito inmovilizado y el analito libre depende de la concentración de analito en la muestra.

Los anticuerpos específicos para un analito para uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como inmunización de un huésped y colección de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares continuas híbridas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

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')₂, 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 por una molécula particular.

Como se discutió anteriormente, un anticuerpo seleccionado para uso en un inmunoensayo para un analito, por ejemplo, debería unir específicamente y preferencialmente el analito (y sus metabolitos activos farmacéuticamente, si es necesario o deseado) con otros ligandos tales como otros metabolitos o sustancias relacionadas.

Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que se realizará. Dichos ensayos usualmente implican reacciones entre asociados de unión tales como un analito y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y un asociado de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Por consiguiente, el asociado de unión puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. El asociado de unión puede ser un miembro de un par de unión específico ("miembro sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente y se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico generalmente serán miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específica tales como, por ejemplo, biotina-avidina, receptores de hormonas-hormona, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, y los pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, no son pares inmunológicos, pero están incluidos dentro del alcance del miembro sbp.

En consecuencia, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para el otro en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre las moléculas que es relativamente independiente de las estructuras

superficiales específicas. La unión no específica puede ser el resultado de varios factores, incluidas las interacciones hidrofóbicas entre moléculas. En muchas realizaciones de ensayos, las parejas de unión preferidas son anticuerpos y los ensayos se denominan inmunoensayos.

5 Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden habitualmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión de 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 en fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida, ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, y así sucesivamente.

15 En algunas realizaciones, pueden emplearse inmunoensayos homogéneos; tales ensayos también pueden denominarse inmunoensayos esencialmente libres de partición. Los presentes métodos tienen aplicación a ensayos homogéneos completamente automatizados en los que, antes del ensayo, no hay extracción o separación del analito de otros constituyentes de la muestra que incluyen metabolitos del analito. En un ensayo de "extracción no manual", una muestra tal como una muestra de sangre entera, sin extracción en, por ejemplo, un disolvente orgánico, se combina con reactivos para realizar un ensayo para el analito en un medio adecuado y se realiza el método de ensayo. Los presentes métodos también encuentran aplicación a los ensayos de extracción manual.

20 Los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) descrito en Rubenstein, et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los descritos en Ullman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los descritos en Maggio, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se describe, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de los Estados Unidos No. 5,354,693; etc.

25 Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por enzimas moduladas ("EMMIA") discutido por Ngo and Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116: 285-288; el sustrato marcado inmunoensayo de fluorescencia ("SLFIA") descrito por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22: 895-904; los inmunoensayos combinados de donantes de enzimas ("CEDIA") divulgados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185: 231-240; inmunoensayos marcados con partículas homogéneas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica mejorados con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico mejorado con partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

30 Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos enzimáticos de membrana ("EMIA"); luminoimunoensayos ("LIA"); inmunoensayos de marca de éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como una fase sólida (inmunoensayos ADVIA Centaur); etc. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican el control de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada por anticuerpo tras la unión de un fármaco hidrófobo. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor de semiconductor, ensayos de inmunosensor de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico y similares.

35 En muchos de los ensayos discutidos en este documento para la determinación de un analito, se emplea una etiqueta; la etiqueta suele ser parte de un sistema de producción de señal ("sps"). La naturaleza de la etiqueta depende del formato de ensayo particular. Un sps generalmente incluye uno o más componentes, al menos un componente es una etiqueta detectable, que genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de etiqueta unida y/o no unida, esto es, la cantidad de etiqueta unida o no ligada al analito que se detecta o a un agente que refleja la cantidad del analito que se detectará. La etiqueta es cualquier molécula que produce o puede ser inducida para producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un fluorescente, radiomarcador, enzima, quimioluminiscente o fotosensibilizador. Por lo tanto, la señal se detecta y/o mide detectando actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radioactividad, y demás, según sea el caso.

40 Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores; colorantes; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimioluminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridinio, por ejemplo; sensibilizadores; coenzimas; sustratos de enzima; radiomarcadores tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO₂) y similares; sol de metal; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con

un tinte, catalizador u otro grupo detectable. Enzimas y coenzimas adecuadas se describen en Litman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149, columnas 19-28, y Boguslaski, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,318,980, columnas 10-14; fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se describen en Litman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149, en las columnas 30 y 31.

5 La etiqueta puede producir directamente una señal y, por lo tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitada. Esta energía absorbida se disipa luego mediante la emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes.

10 De forma alternativa, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Dichos otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, devoradores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señal. Puede encontrarse una discusión detallada de sistemas de producción de señal adecuados en Ullman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,185,243, columnas 11-13.

La etiqueta u otros miembros sps se pueden unir a un soporte. Un derivado o análogo de un fármaco eritrocitófilo se puede unir a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, con la condición solamente de que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de los análogos de unirse a un anticuerpo. En algunas realizaciones, el derivado o análogo de fármaco eritrocitófilo puede estar recubierto o unido covalentemente directamente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas vehículo tales como poli(aminoácidos) que incluyen proteínas tales como albúminas séricas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (carbohidratos) tales como, por ejemplo, dextrano o derivados de dextrano. Los grupos de enlace también pueden usarse para acoplar covalentemente el soporte sólido y el fármaco eritrocitófilo. También son posibles otros métodos de unión de los derivados del fármaco eritrocitófilo. 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 eritrocitófilo o viceversa. La unión de los componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y se puede llevar a cabo mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura. 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 insoluble en agua orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo cuentas, películas, membranas, tubos, pozos, tiras, varillas, superficies planas tales como, por ejemplo, placas, papel, etc., fibras y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no suspenderse en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles 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), nylon, butirato de poli(vinil butirato), etc.; ya sea usado solo o en conjunto con otros materiales.

40 El soporte puede ser una partícula. Las partículas deberían tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micras y no más de aproximadamente 100 micras. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micras a aproximadamente 20 micras, o de aproximadamente 0.3 micras a aproximadamente 10 micras. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente una densidad que se aproxima al agua, generalmente de aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de 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 de 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 a partir de polímeros de adición o condensación. Las partículas se dispersarán fácilmente en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables para permitir la conjugación con un análogo de fármaco eritrocitófilo, directa o indirectamente a través de un grupo de unión. Las partículas también pueden derivarse de materiales naturales, materiales naturales que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de particular interés están los polisacáridos, particularmente los polisacáridos reticulados, tales como la 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 acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidades hidroxilo libres, y similares.

El marcador y/u otro miembro sps pueden estar unidos a un miembro sbp u otra molécula. Por ejemplo, la etiqueta puede unirse covalentemente a un miembro de sbp tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor para un anticuerpo, un receptor que es capaz de unirse a una molécula pequeña conjugada con un anticuerpo, o a un análogo de ligando (analito). La unión de la etiqueta al miembro sbp puede realizarse mediante reacciones químicas que dan como resultado la sustitución de un átomo de hidrógeno de la etiqueta con un enlace al miembro sbp o puede incluir un grupo de unión entre la etiqueta y el miembro sbp. Otros miembros de sps también pueden estar vinculados covalentemente a los miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros de sps, como un fluorescente y un inactivador, pueden estar unidos a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo acerca el fluorescente y el inactivador, lo que permite que el inactivador interactúe con el fluorescente para producir una señal. Los métodos de conjugación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Rubenstein, et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,817,837.

Las enzimas de particular interés como proteínas marcadoras son enzimas rédox, 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 colorante precursor de un tinte. Las combinaciones particulares incluyen sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, junto con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, esto es, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa, o microperoxidasa. Se conocen combinaciones de enzimas adicionales en la técnica. Cuando se utiliza una única enzima como una etiqueta, otras enzimas pueden encontrar uso tales como hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas, preferiblemente hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa. Alternativamente, se pueden usar luciferasas tales como luciferasa de 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 cíclicas. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,318,980.

Con proteínas marcadoras, tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 600.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 300.000 de peso molecular. Habitualmente hay al menos aproximadamente 1 análogo de fármaco eritrocitófilo 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, para ejemplo. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos de fármacos eritrocitófilos es de 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 2 a aproximadamente 15, aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o aproximadamente 6 a aproximadamente 10, por ejemplo.

El término "marcadores que no son de poli(aminoácidos)" incluye aquellos marcadores que no son proteínas (por ejemplo, enzimas). El marcador no poli(aminoácido) es capaz de detectarse directamente o es detectable a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores que no son de poli(aminoácido) incluyen, por ejemplo, radioisótopos, compuestos luminiscentes, soportes, por ejemplo, partículas, placas, perlas, etc., polinucleótidos y similares. Más particularmente, el marcador no poli(aminoácido) puede ser isotópico o no isotópico, generalmente no isotópico, y puede ser un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, colorante, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, un pequeño compuesto orgánico molécula (que incluye, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, y similares), secuencia polinucleotídica amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como partículas de látex o partículas de carbono o dióxido de cromo (cromo) o similares, sol de metal, cristalita, liposoma, célula, etc., que pueden estar o no marcados adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

En una realización, el ensayo es un inmunoensayo de luminiscencia inducido, que se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,340,716 (Ullman, et al.) titulada "Assay Method Utilizing Photoactivated Chemiluminescent Label" ("ensayo de luminiscencia inducida"). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula marcadora que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula marcadora se conjuga con un miembro sbp, por ejemplo, un anticuerpo para el analito que es capaz de unirse al analito para formar un complejo, o a un segundo miembro sbp para formar un complejo, en relación con la cantidad del analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente están muy cerca. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están muy cerca. El compuesto quimioluminiscente activado posteriormente produce luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que comprende anticuerpos para el analito.

A modo de ilustración adicional, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con ellas, tal como por incorporación en las mismas o unión a las mismas. Un miembro de sbp que se une al analito, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para analito, se une a un polisacárido que recubre las partículas. Un segundo miembro de sbp que se une al analito es parte de un conjugado de biotina. La estreptavidina se conjuga con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado. La unión de la

estreptavidina a este segundo conjunto de partículas (partículas fotosensibilizadoras) puede implicar o no un polisacárido en las partículas. Las partículas quimioluminiscentes se mezclan con la porción respectiva de la muestra sospechosa de contener un analito y con las partículas fotosensibilizadoras. Con respecto a la primera porción de la muestra, el medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan a sustancias o componentes en la muestra distintos del analito. Con respecto a la segunda porción de la muestra, el medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los miembros del sbp al analito. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora muy cerca del fotosensibilizador en virtud de la presencia de las sustancias y/o el analito, se activa por oxígeno singlete y emite luminiscencia. El medio se examina a continuación para determinar la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada su presencia con la cantidad de sustancias que se unen al anticuerpo para el analito o la cantidad de analito.

Otro ejemplo particular de un ensayo que puede emplearse para la determinación de un analito se trata en la patente de los Estados Unidos No. 5,616,719 (Davalian, et al.), que describe inmunoensayos de canalización de oxígeno fluorescente.

Los ensayos discutidos anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente aquel que proporcione una sensibilidad de ensayo óptima. El pH para el medio de ensayo estará habitualmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. El pH generalmente será 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 los miembros de un sistema de producción de señal, y así sucesivamente.

Se pueden usar diversos reguladores para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de unión, o similares. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseados.

Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y, por lo general, temperatura constante, preferiblemente temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre aproximadamente 5° y aproximadamente 99°C, o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 70°C, o entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 45°C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50°C, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 40°C.

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

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el intervalo de concentración de interés del analito, la naturaleza del ensayo, la afinidad del anticuerpo y aidez y la fragmentación del anticuerpo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el rango. Es decir, una variación en la concentración de analito que es significativa debería proporcionar una diferencia de señal exactamente medible. Consideraciones tales como la naturaleza de un sistema de producción de señales y la naturaleza del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden más simple de adición es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos se pueden

combinar secuencialmente. Opcionalmente, puede estar involucrado un paso de incubación posterior a cada adición como se discutió anteriormente.

Etapa de medición

5 Los métodos de las presentes realizaciones en los que se usa un inmunoensayo comprenden examinar cada medio de ensayo respectivo para la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito (anticuerpo antianalito). La medición se lleva a cabo respectivamente para cada medio de ensayo después de la incubación del medio de ensayo de acuerdo con el ensayo particular empleado. En el caso de la porción de muestra 1, la medición refleja la unión de sustancias distintas del analito al anticuerpo antianalito para formar un complejo que comprende el anticuerpo antianalito. En el caso de la porción de muestra 2, la medición refleja la unión del analito y sustancias distintas del analito al anticuerpo antianalito para formar un complejo que comprende el anticuerpo antianalito. La sustracción del resultado 1 de medición del resultado de medición 2 da la cantidad del analito en la muestra.

15 La expresión "medir la cantidad de un analito" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para determinar el analito, se consideran métodos para medir la cantidad del analito. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito, se considera incluido dentro del alcance de las presentes realizaciones. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medir, se contemplan dentro del alcance de las presentes realizaciones.

20 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La cantidad de la señal está relacionada con la cantidad de analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema de producción de señal. Como se discutió aquí, existen numerosos métodos mediante los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente mediante examen visual, e incluyen, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radiactividad, reactivos químicos, etc.

25 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 señales que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Para los miembros de sistemas de producción de señal que se encuentran en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se sugerirán otros métodos de activación para los expertos en la técnica a la vista de las divulgaciones en este documento. Para algunos sistemas de producción de señal, no es necesario ningún agente para la activación, como los sistemas que implican una etiqueta que es una etiqueta radioactiva, una enzima, etc. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesario agregar un sustrato y/o un cofactor.

35 El examen de la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es solo un paso en el que se lee la señal. La señal se lee normalmente con un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro, un actinómetro o un instrumento fotográfico, por ejemplo. La cantidad de señal detectada está relacionada con la cantidad de analito presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10° a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 25°C, por ejemplo. En un enfoque, las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los analitos por cribar. Como se discutió aquí, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Realización específica de un inmunoensayo para la determinación de un fármaco eritrocitófilo

45 En una realización, a modo de ilustración y no de limitación, el analito es un fármaco eritrocitófilo. El término "fármaco eritrocitófilo", 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 por un eritrocito. El fármaco eritrocitófilo es habitualmente hidrófobo y muestra una característica de absorción por una unidad estructural lipófila tal como, por ejemplo, una lipoproteína, por ejemplo, un eritrocito, o una proteína de unión específica del fármaco, o de solubilidad reducida en un medio polar. La absorción del fármaco por un eritrocito es al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%, por ejemplo. Por consiguiente, un fármaco eritrocitófilo es secuestrado por uno o más agentes secuestrantes de origen natural, a saber, unidades estructurales lipófilas endógenas en la muestra que contiene el fármaco eritrocitófilo en la medida en que el fármaco es absorbido, por ejemplo, por un eritrocito.

55 Los fármacos inmunosupresores son un ejemplo de fármacos eritrocitófilos y también se consideran fármacos hidrófobos. Los medicamentos inmunosupresores son fármacos terapéuticos que se administran a los receptores de

trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjertos de tejido no propio. Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar de la siguiente manera: glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre inmunofilinas y otros fármacos como interferones, proteínas de unión a INF de opiáceos, micofenolato, FTY720 y similares. Una clase particular de fármacos inmunosupresores comprende aquellos medicamentos que actúan sobre las inmunofilinas. Las inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión específica de alta afinidad que tienen importancia fisiológica. Actualmente se conocen dos familias distintas de inmunofilinas: ciclofilinas y macrofilinas, las últimas de las cuales se unen específicamente, por ejemplo, tacrolimus o sirolimus. Los fármacos inmunosupresores que actúan sobre la inmunofilina incluyen, por ejemplo, ciclosporina (que incluye ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F, ciclosporina G, ciclosporina H, ciclosporina I), tacrolimus (FK506, PROGRAF®), sirolimus (rapamicina, RAPAMUNE®), everolimus (RAD, CERTICAN®) y así sucesivamente.

La expresión "al menos" tal como se usa en el presente documento significa que el número de artículos especificados puede ser igual o mayor que el número enumerado. La expresión "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa que el número enumerado puede diferir en más o menos 10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un rango de 4.5 a 5.5.

En la realización anterior, la muestra por analizar es una que se sospecha que contiene uno o más analitos de fármacos eritrocitófilos. La muestra típicamente comprende uno o más agentes secuestrantes de origen natural que se unen al fármaco eritrocitófilo. Como se mencionó anteriormente, los agentes secuestrantes de origen natural para el fármaco eritrocitófilo pueden ser proteínas de unión que se unen a un fármaco hidrofóbico tal como una lipoproteína, por ejemplo, una proteína que comprende una cavidad hidrofóbica en la superficie u otras características espaciales que unen el fármaco hidrofóbico tal como, por ejemplo, colesterol y triglicéridos. En esta realización de ejemplo, la muestra es sangre entera, la cual es sangre no fraccionada o sangre que comprende tanto glóbulos rojos como plasma. De acuerdo con las realizaciones presentes, en este ejemplo partes iguales, parte 1 y parte 2, se someten al método de ensayo elegido.

En la realización de un ensayo para determinar el resultado de medición 1 de acuerdo con una realización de los presentes métodos, la porción de muestra 1 no se trata previamente para eliminar los agentes secuestrantes que se producen en la naturaleza. Además, cuando el fármaco eritrocitófilo está secuestrado solo parcialmente pero no secuestrado sustancialmente por uno o más agentes secuestrantes de origen natural en la muestra, se puede añadir un agente secuestrante externo para realizar un ensayo para obtener el resultado de medición 1 en una cantidad suficiente para secuestrar sustancialmente el medicamento eritrocitófilo. En una realización, el agente secuestrante externo es un anticuerpo para el fármaco eritrocitófilo que se une al fármaco pero no se une a sustancias interferentes en la muestra y no interfiere con ninguno de los reactivos para realizar el ensayo, incluido el anticuerpo para el analito. El ensayo se realiza en la porción de muestra 1 de la muestra de sangre entera para determinar el resultado de medición 1.

Para la porción de muestra 2, donde la muestra de sangre entera comprende agentes secuestrantes naturales o materiales de unión endógenos para el fármaco eritrocitófilo tales como, por ejemplo, lipoproteínas u otros agentes secuestrantes de origen natural, la porción de muestra 2 se trata con uno o más agentes liberadores para liberar el analito de tales sustancias endógenas. Para el fármaco eritrocitófilo en este ejemplo, los agentes de liberación incluyen al menos un agente hemolítico como se discutió anteriormente para liberar el fármaco eritrocitófilo de los glóbulos rojos. La naturaleza y cantidad o concentración del agente hemolítico empleado se discutió anteriormente.

En algunas realizaciones, los agentes de liberación para la porción de muestra 2 incluyen un análogo, que incluye análogos estructurales, del fármaco eritrocitófilo. Un análogo de fármaco eritrocitófilo es un fármaco modificado que puede desplazar el fármaco eritrocitófilo análogo de una proteína de unión, pero no compite en un grado sustancial con un anticuerpo para el fármaco eritrocitófilo. Por ejemplo, en una determinación para tacrolimus, se puede emplear un éster de tacrolimus (por ejemplo, FK506) como agente de liberación siempre que cumpla los requisitos anteriores. En el caso de un fármaco eritrocitófilo, el análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el fármaco eritrocitófilo. Por ejemplo, en una determinación para sirolimus, se puede emplear un éster de tacrolimus como agente de liberación. El éster puede ser, por ejemplo, un carbamato, un carbonato, un éster de un ácido carboxílico de C₁ a C₆ y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,186,518. Otros ejemplos de agentes de liberación incluyen [Thr₂, Leu₅, D-Hiv₈, Leu₁₀]-ciclosporina A para ciclosporina A, FK506 para sirolimus, sirolimus para FK506 y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,187,547. La concentración del agente de liberación en el medio es suficiente para lograr el resultado deseado de desplazar sustancialmente todo el fármaco eritrocitófilo y, en muchos casos, metabolitos del fármaco eritrocitófilo, de unidad estructurales de unión endógenas para hacer accesibles el fármaco y los metabolitos para unirse a un anticuerpo para el fármaco como se discutió anteriormente. Por el término "sustancialmente todo" se entiende que al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%, o al menos 99.5%, o al menos 99.9%, o el 100% del fármaco en la muestra está disponible para unirse a un receptor del medicamento.

En algunas realizaciones, la porción de muestra 2, un agente hemolítico y un agente de liberación adicional (si se emplea) se combinan en un medio que, como se mencionó anteriormente, es usualmente un medio acuoso. Todo lo

anterior se puede combinar simultáneamente en el medio o uno o más de los reactivos anteriores se pueden agregar secuencialmente en concentraciones como se discutió anteriormente. El medio también puede comprender uno o más conservantes como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomina y similares.

- 5 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. Como se discutió anteriormente, se pueden usar diversos reguladores para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante el período de incubación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos sanguíneos. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de reguladores y conservantes, el medio puede comprender estabilizantes 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 función deseados.
- 10
- 15 El medio se incuba en condiciones para hemolizar células en la muestra y para liberar el fármaco eritrocitófilo y sus metabolitos de unidad estructurales de unión endógenas. El período de incubación puede ser de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 minutos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 minutos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 3 minutos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 minutos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 segundos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 20 segundos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 segundos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 60 minutos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 6 minutos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 3 minutos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 minutos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 segundos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 20 segundos, o aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 10 segundos, por ejemplo.

- 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 aproximadamente 15°C a aproximadamente 35°C, o aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, por ejemplo.
- 30

- Después del tratamiento anterior, la porción de muestra 2 se somete al mismo ensayo que para la porción de muestra 1 para determinar el resultado de medición 2. Se puede emplear cualquier ensayo adecuado para determinar la concentración de analito en la porción de muestra 1 y la porción de muestra 2. Los ensayos pueden realizarse en las porciones de muestra como una continuación inmediata del pretratamiento de las porciones o el ensayo puede llevarse a cabo en un punto posterior. Los ensayos se llevan a cabo combinando las porciones de muestra respectivas con reactivos para determinar la cantidad de fármaco eritrocitófilo en la muestra en un medio de ensayo. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo que se realizará. En general, el ensayo es un método para la determinación o medición de la cantidad de un analito eritrocitófilo. Diversos métodos de ensayo se describen en este documento a modo de ilustración y no de limitación. En muchas realizaciones, los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el fármaco eritrocitófilo.
- 35
- 40

- Como se discutió anteriormente, un anticuerpo seleccionado para uso en un inmunoensayo para un fármaco eritrocitófilo, por ejemplo, debería unir específica y preferentemente el fármaco eritrocitófilo y sus metabolitos farmacéuticamente activos sobre otros ligandos tales como otros metabolitos o fármacos relacionados. Por ejemplo, un anticuerpo para tacrolimus debe unir específicamente y preferencialmente tacrolimus sobre, por ejemplo, rapamicina. En general, un anticuerpo debería ser capaz de distinguir entre un fármaco eritrocitófilo en relación con un segundo fármaco eritrocitófilo. Al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, del primer fármaco eritrocitófilo se unirán al anticuerpo si el anticuerpo se combina con una muestra que contiene el fármaco eritrocitófilo. A la vez que la unión también depende de la concentración relativa del fármaco eritrocitófilo, la unión será mayor para el primer fármaco eritrocitófilo si la constante de unión para el primer fármaco eritrocitófilo es mayor que la constante de unión para el segundo fármaco eritrocitófilo, al menos aproximadamente 10 veces más alto o al menos aproximadamente 50 veces más alto y hasta 1000 veces o más. Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que se realizará. Dichos ensayos usualmente implican reacciones entre asociados de unión tales como un analito de fármaco eritrocitófilo y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y un asociado de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo.
- 45
- 50
- 55

Después de los ensayos en las porciones de muestra 1 y 2, se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el anticuerpo para el fármaco eritrocitocílico. La sustracción de la cantidad del complejo

obtenido usando la porción de muestra 1 a partir de la cantidad obtenida usando la porción de muestra 2 proporciona la cantidad del fármaco eritrocitófilo en la muestra.

5 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. Dependiendo de qué porción de muestra se está examinando, la cantidad de la señal se relaciona con la cantidad de componentes en la muestra que no sea el fármaco eritrocitófilo que se une al anticuerpo para el fármaco eritrocitófilo o la cantidad de dichos componentes más el fármaco eritrocitófilo en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se discutió anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente por examen visual, e incluyen, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radiactividad, reactivos químicos, etc.

10 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 señales que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Para los miembros de sistemas de producción de señal que se encuentran en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se sugerirán otros métodos de activación para los expertos en la técnica a la vista de las divulgaciones en este documento. Para algunos sistemas de producción de señal, no es necesario ningún agente para la activación, como los sistemas que implican una etiqueta que es una etiqueta radioactiva, una enzima, y así sucesivamente. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesario agregar un sustrato y/o un cofactor.

15 El examen de la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en el que se lee la señal. La señal se lee normalmente con un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro, un actinómetro, un instrumento fotográfico y similares. La cantidad de señal detectada está relacionada con la cantidad del compuesto farmacológico hidrófobo presente en una muestra si el ensayo está haciendo una determinación precisa. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10° a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 25°C, por ejemplo. En una metodología, las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los analitos por cribar. Como se discutió aquí, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Realizaciones específicas de ensayos para ciertos analitos eritrocitófilos

20 Las realizaciones específicas de ensayos que pueden emplearse para ensayar las porciones de muestra respectivas se discuten a continuación a modo de ilustración y no de limitación.

25 En un ensayo homogéneo, después de que todos los reactivos se hayan combinado, la señal se determina y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT® para un analito, una muestra que se sospecha que contiene el analito se combina en un medio acuoso ya sea simultánea o secuencialmente con un conjugado enzimático del analito, esto es, un análogo del analito y un anticuerpo capaz de reconocer el analito. En general, se agrega un sustrato para la enzima, que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Las enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero se pueden emplear otras enzimas. El analito (y/u otras sustancias en la muestra que podrían unirse al anticuerpo) y las fracciones del conjugado enzimático compiten por los sitios de unión en el anticuerpo. La actividad de la enzima en el medio se mide luego, generalmente por medios espectrofotométricos. Los calibradores también se pueden analizar de una manera similar a la prueba de la muestra que se sospecha que contiene el analito. Los calibradores típicamente contienen concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito por determinar. Preferiblemente, los rangos de concentración presentes en los calibradores abarcan el rango de concentraciones sospechosas de analito en muestras desconocidas.

30 Los ensayos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mutante como la enzima del conjugado enzimático. Esta enzima mutante se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,090,567 y 6,033,890. Además, el ensayo puede realizarse usando anticuerpos para el analito y usando procedimientos como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,328,828 y 5,135,863.

35 Los ensayos heterogéneos usualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se dan a conocer una variedad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos en Davalian, et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un tipo de ensayo competitivo, un soporte, como se describe en el presente documento, que tiene anticuerpos para el analito unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra y los conjugados enzimáticos apropiados del analito. Después de separar el soporte y el medio, la actividad de la enzima del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales para determinar el resultado de la medición.

En ciertas realizaciones, se puede emplear una segunda enzima además de la enzima del conjugado enzimático. Las enzimas del par de enzimas están relacionadas porque un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima.

5 Otra realización de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el anticuerpo para el analito se une covalentemente a una partícula magnética. La muestra se incuba con estas partículas para permitir que los anticuerpos del analito se unan al analito y/o a las sustancias de la muestra que no sean analitos que también se unen al anticuerpo. Posteriormente, una enzima que tiene el analito o un derivado del analito unido covalentemente se incuba con las partículas magnéticas. Después del lavado, se mide la cantidad de enzima que está unida a las partículas magnéticas y está inversamente relacionada con la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito.
10

Las siguientes descripciones de ensayo específicas son a modo de ilustración de, y no como una limitación del, alcance de la presente invención. La selección de tacrolimus o sirolimus como fármaco eritrocitófilo también es a modo de ilustración y no de limitación ya que la presente invención tiene una aplicación general para la detección de fármacos eritrocitófilos en general y de fármacos inmunosupresores en particular.

15 En una realización, la porción de muestra se mezcla con un conjugado de tacrolimus, es decir, por ejemplo, un análogo de tacrolimus que está unido a biotina. Dependiendo de la porción de la muestra que se analiza, la porción de muestra se incuba para permitir la unión de sustancias en la muestra distintas del analito para unirse a un anticuerpo para tacrolimus o para permitir la unión de dichas sustancias y el tacrolimus de la muestra para unirse al anticuerpo para tacrolimus en competencia con el análogo de tacrolimus donde el anticuerpo es capaz de unirse a tacrolimus o al análogo de tacrolimus. Después de enjuagar con un regulador de lavado apropiado, se puede añadir al medio una molécula de detección que consiste en estreptavidina o avidina conjugada a una enzima, molécula fluorescente o quimioluminiscente o unidad estructural radiactiva, que luego se examina para determinar la cantidad de señal. La cantidad de señal está relacionada con la cantidad de sustancias distintas de tacrolimus en la muestra que se unen al anticuerpo para tacrolimus o a la cantidad de dichas sustancias y tacrolimus en la muestra.
20

25 En una realización, el ensayo empleado es un ensayo de luminiscencia inducida como se describió anteriormente. En algunas realizaciones del ensayo de luminiscencia inducida a modo de ilustración y no de limitación, los reactivos incluyen dos reactivos de perlas de látex y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tacrolimus biotinilado. El primer reactivo de perlas está recubierto con tacrolimus o un análogo de tacrolimus y contiene colorante quimioluminiscente. El segundo reactivo de perlas está cubierto con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. Una muestra que se sospecha que contiene tacrolimus se divide en porciones iguales, a saber, la porción de muestra 1 y la porción de muestra 2. La porción de muestra 1 se trata con un anticuerpo para tacrolimus para secuestrar sustancialmente cualquier tacrolimus no secuestrado. La porción de muestra 1 se incuba con anticuerpo biotinilado para tacrolimus, que permite que las sustancias en la muestra distintas de tacrolimus saturen una fracción del anticuerpo biotinilado. En una segunda etapa, se agrega el primer reactivo de microesferas y conduce a la formación de inmunocomplejo de perla/anticuerpo biotinilado con la fracción no saturada del anticuerpo biotinilado. Luego se agrega el segundo reactivo de perlas y se une a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de perlas. Cuando se ilumina con luz a 680 nm, el segundo reactivo de perlas convierte el oxígeno disuelto en la solución de reacción en la forma más energética de oxígeno singlete. En los pares de cuentas, el oxígeno singlete se difunde en el primer reactivo de microesferas, desencadenando así una reacción quimioluminiscente. La señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración de las sustancias distintas de tacrolimus en la muestra que se unen al anticuerpo de tacrolimus. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de tales sustancias en la muestra.
30
35
40

El mismo ensayo también se lleva a cabo en la porción de muestra 2, la cual trata con FK506 para liberar tacrolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, la señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración tanto de tacrolimus como de otras sustancias diferentes de tacrolimus en la muestra que se unen al anticuerpo de tacrolimus. La sustracción de la señal obtenida de la porción de muestra 1 de la señal obtenida de la porción de muestra 2 da la cantidad de señal atribuida a la cantidad de tacrolimus en la muestra.
45

Un ejemplo específico de otro formato de ensayo es ACMIA (Inmunoensayo de afinidad mediado por dióxido de cromo). Para el formato de ensayo ACMIA, las partículas de cromo, que están recubiertas con sirolimus o un análogo de sirolimus, se emplean como un primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para sirolimus. Este anticuerpo, entrecruzado a una enzima informadora (por ejemplo, beta-galactosidasa), se agrega a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la requerida para unir todo el analito que podría estar presente en una muestra. Una muestra sospechosa de contener sirolimus se divide en partes iguales, a saber, la porción de muestra 1 y la porción de muestra 2. La porción de muestra 1 se trata con un anticuerpo para sirolimus, que se une a sirolimus pero no a otros reactivos empleados en el ensayo ni a sustancias interferentes en la muestra, para secuestrar sustancialmente sirolimus. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con la porción de muestra 1 para permitir que el analito de sirolimus se una al anticuerpo. A continuación, se agrega el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Luego, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y el exceso de enzima de anticuerpo de la suspensión, y el sobrenadante se transfiere a un
50
55

recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima informadora se agrega al recipiente de reacción final, y la actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de sustancias en la muestra, distintas de sirolimus, que se unen al anticuerpo para sirolimus.

5 El mismo ensayo también se lleva a cabo en la porción de muestra 2, que se trata con un éster de tacrolimus para liberar sirolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, se mide la actividad enzimática resultante y está relacionada con la cantidad tanto de sirolimus como de otras sustancias diferentes de sirolimus en la muestra que se unen al anticuerpo de sirolimus. La sustracción de la actividad enzimática obtenida de la porción de muestra 1 de la actividad de la enzima obtenida a partir de la porción de muestra 2 da la cantidad de actividad enzimática atribuida a la cantidad de sirolimus en la muestra.

15 En un formato de ensayo sándwich, se emplea un primer reactivo que comprende partículas de cromo recubiertas con anticuerpos anti-tacrolimus y un segundo reactivo que comprende un segundo anticuerpo (o proteína de unión) para el primer anticuerpo conjugado con una enzima informadora. Una muestra que se sospecha que contiene tacrolimus se divide en porciones iguales, a saber, la porción de muestra 1 y la porción de muestra 2. La porción de muestra 1 se trata con anticuerpo para tacrolimus para secuestrar sustancialmente cualquier tacrolimus no secuestrado. En este formato, la porción de muestra 1 se incuba con las partículas de cromo de modo que todo el tacrolimus, si está presente en la muestra, se une a las partículas de cromo. Las partículas de cromo se lavan, usando un imán para separar el analito unido del sobrenadante. Luego, el segundo reactivo, es decir, anticuerpo (o proteína de unión) conjugado con una enzima informadora, se incuba con las partículas de cromo para formar un "sándwich". Después del lavado, se mide la cantidad de enzima que está unida al cromo y está relacionada con la cantidad de sustancias en la porción de muestra 1, además de tacrolimus, que se unen al anticuerpo para tacrolimus. El mismo ensayo también se lleva a cabo en la porción de muestra 2, que se trata con éster de FK506 para liberar tacrolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, se mide la cantidad de enzima que está unida al cromo y está relacionada con la cantidad tanto de tacrolimus como de otras sustancias diferentes de tacrolimus en la muestra que se unen al anticuerpo de tacrolimus. La sustracción de la cantidad de enzima unida al cromo obtenido de la porción de muestra 1 de la cantidad de enzima unida al cromo obtenida de la porción de muestra 2 da la cantidad de enzima unida al cromo atribuida a la cantidad de tacrolimus en la muestra.

30 Otro formato de ensayo es EMIT[®] (Enzyme-Mediated Immunoassay Technology). Una muestra sospechosa de contener sirolimus se divide en porciones iguales, a saber, la porción de muestra 1 y la porción de muestra 2. La porción de muestra 1 se trata con una cantidad en exceso de proteínas de unión al analito o anticuerpos antianalito que no reconocen el análogo del fármaco conjugado con G-6-PDH para secuestrar sustancialmente sirolimus. En este formato de ensayo, se forma un conjugado enzimático tal como, por ejemplo, un conjugado de G-6-PDH y un análogo de sirolimus. Un anticuerpo para sirolimus se incuba con el conjugado enzimático y la porción de muestra 1. El anticuerpo para sirolimus se une a sustancias distintas de sirolimus en la muestra en lugar de unirse al conjugado enzimático, lo que reduce la inhibición de la actividad enzimática que de otro modo podría ocurrir en ausencia de tales sustancias en la muestra. La cantidad de reducción de la inhibición de la actividad enzimática está relacionada con la cantidad de tales sustancias distintas de sirolimus en la muestra. El mismo ensayo también se lleva a cabo en la porción de muestra 2, que se trata con éster de FK506 para liberar sirolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, se mide la cantidad de reducción de la actividad enzimática y se relaciona con la cantidad tanto de sirolimus como de otras sustancias diferentes de sirolimus en la muestra se unen al anticuerpo de sirolimus. La sustracción de la actividad enzimática obtenida de la porción de muestra 1 de la actividad de la enzima obtenida a partir de la porción de muestra 2 proporciona la cantidad de reducción de actividad enzimática atribuida a la cantidad de sirolimus en la muestra.

Kits para realizar ensayos en las porciones de muestra

45 Los reactivos requeridos en el método para reducir los resultados falsos de acuerdo con la invención se pueden combinar en un kit. Para llevar a cabo un ensayo particular, los reactivos pueden estar presentes en un kit útil para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de un analito. En una realización, un kit comprende en combinación reactivos de combinación para secuestrar un analito, reactivos para liberar un analito de sustancias de unión endógenas, un anticuerpo para un analito 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 varios reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo tal como miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato de enzima auxiliar, y otros.

55 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben producirse durante el presente procedimiento y además optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, habitualmente liofilizado, que incluye excipientes, que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para

realizar un método o ensayo. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con las presentes realizaciones como se describió anteriormente.

5 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y están destinados a describir y no a limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes divulgados en este documento son en volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Todos los productos químicos se pueden comprar de Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO) a menos que se indique lo contrario. El tacrolimus se puede obtener de Astellas Pharma US, Inc., Deerfield IL.

10 Las pruebas se llevan a cabo usando el analizador DIMENSION® RxL, disponible de Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. El instrumento se emplea utilizando la tecnología de inmunoensayo ACMIA. El método de ensayo ACMIA se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 y 5,434,051. En la realización del método ACMIA utilizado en este documento y discutido con más detalle a continuación, se utiliza la competencia entre tacrolimus análogo sobre 15 partículas de cromo y tacrolimus en muestras de pacientes para anticuerpo para tacrolimus conjugado a una enzima (el "conjugado") para determinar la cantidad de tacrolimus en muestras de pacientes. El conjugado que se une al análogo de tacrolimus en partículas de cromo se elimina por separación magnética. Se mide la actividad enzimática del conjugado remanente en el sobrenadante y es directamente proporcional a la cantidad de tacrolimus en la muestra del paciente. En el formato de ensayo ACMIA empleado, la actividad enzimática observada cuando se prueba una muestra que no contiene tacrolimus es indicativa de la cantidad de actividad enzimática que no está unida al anticuerpo 20 activo (es decir, no puede unirse a tacrolimus en partículas de cromo). La actividad enzimática observada cuando no hay partículas de cromo presentes es indicativa de la cantidad total de actividad enzimática en el conjugado. Estos valores se pueden usar para estimar el porcentaje de actividad enzimática unida al anticuerpo activo.

Ejemplo 1.

Inmunoensayo automatizado para formato de ensayo de dos medidas de Tacrolimus para eliminar resultados falsos

25 En el método, el resultado de medición 1 se determina por medio de un ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente secuestrado y el resultado de medición 2 se determina por medio del ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente no secuestrado. El resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra.

30 Preparación de solución de pretratamiento hemolítico para el resultado de medición 1. Esta solución de pretratamiento está preparada para contener 17.0 mg/mL de sal de sodio PIPES™ 1.5 (SesquiNa PIPES), 0.75 mg/mL de EDTA disódico, 2.5 mg/mL de saponina, 0.5% de proclina 300, 0.06 mg/mL de sulfato de neomicina, pH 6.8. La solución también contiene 1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal de ratón (clon 1E2). Este anticuerpo tiene una unión fuerte para el fármaco original FK506 pero una unión débil para el análogo FK506 (oxima FK506-C22) que se usa para recubrir la fase sólida de dióxido de cromo. La función de este anticuerpo es secuestrar el fármaco libre residual en 35 ausencia del FKE desplazador del fármaco. La Tabla 1 muestra la composición del reactivo de hemólisis para usar en hemolizar una porción de una muestra de sangre total para el ensayo de Tacrolimus (AI = como se indica).

Tabla 1

Reactivo de pretratamiento hemolítico para la medición de ensayo 1		
Nombre	Qty (por mL)	Función
Anticuerpo monoclonal anti-FK506 (clon 1E2)	1ug/mL	Hace que las moléculas residuales de FK506 sean inaccesibles al anticuerpo de ensayo por enlace
SesquiNa PIPES	17 mg/mL	Regulador
EDTA disódico	0.75 mg/mL	Prevención de la formación de coágulos

Reactivo de pretratamiento hemolítico para la medición de ensayo 1		
Nombre	Qty (por mL)	Función
Saponina	2.5 mg/mL	lisis de células sanguíneas
Proclin 300	5.0 ml/L	conservante
Sulfato de neomicina	0.06 gm/L	conservante

- 5 Preparación de la solución de pretratamiento hemolítico para el resultado de medición 2. Esta solución de pretratamiento está preparada para contener 15 µg/mL de un compuesto de carbamato FK-506 (o éster de tacrolimus), sal de sodio PIPEST™ 1.5 de 6.8 mg/mL, EDTA disódico de 0.3 mg/mL, 1.0 mg/mL de saponina, 0.2% de Proclin 300, 0.024 mg/mL de sulfato de neomicina y 0.99 mg/mL de NaN₃, pH 6.5. La concentración de FKE en la mezcla de reacción final es de 1.2 µg/mL. La Tabla 2 muestra la composición del reactivo de hemólisis para usar en hemolizar una porción de una muestra de sangre total para el ensayo de Tacrolimus (AI = como se indica).

Tabla 2

Nombre	Qty (por mL)	Función
FK506 Éster	5 ug/mL	disocia el tacrolimus de la proteína de unión
SesquiNa PIPES	17 mg/mL	regulador (pH 6.8)
EDTA disódico	0.75 mg/mL	Prevención de la formación de coágulos
Saponina	2.5 mg/mL	lisis de células sanguíneas
Proclin 300	5.0 ml/L	conservante
Sulfato de neomicina	0.06 gm/L	conservante

- 10 Preparación del conjugado anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa. El anticuerpo monoclonal anti-tacrolimus (clon 1H6 de Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Glasgow, Delaware) se conjuga con β-galactosidasa utilizando un conector SMCC (succinimidil trans-4-(N-maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato) heterobifuncional estándar según las técnicas conocidas. La solución de conjugado de anticuerpo contiene aproximadamente 7.5 µg/mL de anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa conjugada, 30 mg/mL de albúmina de suero bovino libre de proteasa, 0.126 mg/mL de MgCl₂, 0.03 mL/mL de etilenglicol, 35.14 mg/mL PIPES 1.5 sal de sodio, NaCl 50 mg/mL y muteína beta-gal (beta-galactosidasa inactivada), pH 6.5.

- 20 Preparación de partículas de cromo magnético. Las partículas de tacrolimus en cromo (inmunoensayo en fase sólida) se preparan conjugando tacrolimus-C22 a fluoresceína, que se usa para predecorar el anticuerpo antilfluoresceína inmovilizado en partículas de dióxido de cromo a través de glutaraldehído. El reactivo de partículas de cromo contiene aproximadamente 2.5 mg/mL de suspensión de partículas de tacrolimus en cromo, 60.8 mg/mL de trehalosa dihidratada y 7.2 mg/mL de CARBOWAX®.

Ensayo 1 para el resultado de medición 1. 20 µL de una muestra de sangre entera que se sospecha que contiene tacrolimus se mezcla con la solución de pretratamiento hemolítico en un recipiente en el analizador DIMENSION® RxL.

La sangre entera se tomará de una copa estándar mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de pretratamiento asegura la hemólisis de la sangre entera. El desplazamiento de las moléculas de tacrolimus unidas a proteínas de sus sitios de unión no ocurre porque el desplazador, FKE, no está presente en este ensayo. Como resultado, la señal generada a partir de este ensayo contiene <10% de la señal del analito (en la mayoría de los casos <5%) más 100% de la señal de la matriz del ensayo, que incluye señales generadas a partir de sustancias de interferencia.

El conjugado de anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa (50 μL de la solución anterior) se agrega al lado de cada uno de los recipientes de reacción y la mezcla se mantiene durante un período de tiempo (10 a 15 minutos) y a una temperatura de 43°C para permitir que el tacrolimus, si está presente, reaccione con el reactivo del anticuerpo. Se agregan partículas de cromo con tacrolimus inmovilizado-CMO-DA10-Dexal (50 μL) a cada uno de los recipientes de reacción y se les permite unirse al conjugado no unido. El conjugado de anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa unido a tacrolimus no se une a las partículas de cromo, sino que permanece en el sobrenadante cuando se aplica un campo magnético a las mezclas de reacción anteriores para separar la solución de las partículas de cromo. El conjugado unido a tacrolimus se detecta transfiriendo el sobrenadante de cada uno de los recipientes de reacción a una cubeta fotométrica y midiendo la velocidad enzimática del conjugado en presencia de rojo-β-D-galactopiranosido de clorofenol (CPRG). La velocidad para cada recipiente de reacción se mide bicromáticamente a 577 y 700 nm.

Ensayo 2 para el resultado de medición 2. El principio y el funcionamiento del ensayo ACMIA para tacrolimus para la detección de resultados falsos es el siguiente: 20 μL de una muestra de sangre entera que se sospecha que contiene tacrolimus se mezcla con la solución hemolítica de pretratamiento en un recipiente en el analizador DIMENSION® RxL. La sangre entera se tomará de una taza estándar mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de pretratamiento asegura la hemólisis de la sangre entera y el desplazamiento de las moléculas de tacrolimus unidas a la proteína de sus sitios de unión cuando las moléculas de carbamato de tacrolimus (FKE) estaban presentes. Como resultado, la señal generada a partir de este ensayo contiene <100% de la señal del analito más 100% de la señal de la matriz del ensayo, que incluye señales generadas a partir de posibles sustancias de interferencia.

Se añade anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa conjugado (50 μL) al lado de cada uno de los recipientes de reacción y la mezcla se mantiene durante un período de tiempo (10 a 15 minutos) y a una temperatura de 43°C para permitir que el tacrolimus, si está presente, reaccione con el reactivo del anticuerpo. Se añaden partículas de cromo con tacrolimus inmovilizado-CMO-DA10-Dexal (50 μL) a cada uno de los recipientes de reacción y se les permite unirse al conjugado sin unir. El conjugado de anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa unido a tacrolimus no se une a las partículas de cromo, sino que permanece en el sobrenadante cuando se aplica un campo magnético a las mezclas de reacción anteriores para separar la solución de las partículas de cromo. El conjugado unido a tacrolimus se detecta transfiriendo el sobrenadante de cada uno de los recipientes de reacción a una cubeta fotométrica y midiendo la velocidad enzimática del conjugado en presencia de rojo-β-D-galactopiranosido de clorofenol (CPRG). La velocidad para cada recipiente de reacción se mide bicromáticamente a 577 y 700 nm.

El resultado 1 de medición se determina mediante el ensayo 1 mencionado anteriormente realizado en la muestra en la que el tacrolimus en la muestra está sustancialmente secuestrado. El resultado de medición 2 se determina mediante el ensayo 2 mencionado anteriormente realizado en la muestra donde el tacrolimus en la muestra está sustancialmente no secuestrado. El resultado de medición 1 se sustrae del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra.

Dos muestras de pacientes receptores de trasplantes que demostraron valores de tacrolimus falsamente elevados mediante el método ACMIA de pretratamiento no manual convencional se analizaron usando los dos métodos de ensayo descritos anteriormente. Estas dos muestras de pacientes contenían poco fármaco de tacrolimus como se probó mediante un método de pretratamiento manual (por ejemplo, EMIT). La Tabla 3 muestra la comparación de resultados entre el método ACMIA convencional y el método de medición ACMIA dos. Como puede verse, los resultados falsos positivos se mitigaron mediante la metodología de dos ensayos de medición de acuerdo con las presentes realizaciones.

Tabla 3

Muestra positiva falsa	Método convencional de ACMIA Tacrolimus (ng/mL)	Método ACMIA Tacrolimus de dos medidas (ng/mL)
1	18.0	-0.3
2	12.7	1.2

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito en el que el analito se selecciona del grupo que consiste de tacrolimus, sirolimus, everolimus y ciclosporina, comprendiendo el método:

- 5 (a) medir la señal de ensayo resultante solo de fondo,
(b) medir la señal de ensayo resultante de la presencia de analito en la muestra más el fondo, y
(c) sustraer (a) de (b) para determinar la concentración de analito en la muestra, en el que:

10 la medición de (a) se lleva a cabo determinando un resultado de medición 1 por medio de un ensayo realizado en la muestra donde el analito en la muestra está sustancialmente secuestrado (I) como resultado de componentes naturales en la muestra o (II) como resultado de la adición al medio de un anticuerpo específico para el analito en el que el anticuerpo no se une a otros reactivos usados en el ensayo,

15 la medición de (b) se lleva a cabo determinando un resultado de medición 2 por medio del ensayo realizado en la muestra en el que en (I) se agrega un análogo de analito al medio para desplazar el analito de componentes que se presentan naturalmente en la muestra o en el que (II) el ensayo se realiza en ausencia del anticuerpo específico para el analito en el que el anticuerpo no se une a otros reactivos utilizados en el ensayo, y

en (c) sustraer el resultado de medición 1 del resultado de medición 2 para determinar la concentración de analito en la muestra, donde el ensayo comprende:

20 (i) añadir reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra de la etapa (a) y a un medio que comprende la muestra de la etapa (b) en el que los reactivos comprenden al menos un anticuerpo específico para el analito y

(ii) medir en la etapa (a) una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo específico para el analito para determinar el resultado de medición 1 y medir en la etapa (b) una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo específico para el analito para determinar el resultado de medición 2.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es una excreción corporal, aspirado corporal, excisión corporal o extracto corporal.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los reactivos en la etapa (i) comprenden además un análogo del analito en el que el análogo comprende una etiqueta.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa (i) se añade un segundo anticuerpo al medio en el que el segundo anticuerpo se une a un complejo que comprende el anticuerpo específico para el analito.

30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que al menos uno de los anticuerpos específicos para el analito o el segundo anticuerpo comprende una etiqueta.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los reactivos comprende una etiqueta.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los reactivos comprende una partícula.

35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los reactivos comprende un marcador enzimático y uno de los reactivos comprende una partícula magnética.

9. Un método para reducir los resultados falsos en una medición de ensayo para determinar una concentración de tacrolimus en una muestra que se sospecha que contiene tacrolimus, comprendiendo el método:

(a) determinar un resultado de medición 1 mediante un ensayo realizado en la muestra en el que el tacrolimus en la muestra está sustancialmente secuestrado,

40 (b) determinar un resultado de medición 2 mediante el ensayo realizado en la muestra en el que el tacrolimus en la muestra no está sustancialmente secuestrado,

en el que el ensayo comprende:

- (i) añadir reactivos para determinar la concentración de tacrolimus en la muestra a un medio que comprende la muestra de la etapa (a) y a un medio que comprende la muestra de la etapa (b) donde los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para tacrolimus, y
- 5 (ii) medir en la etapa (a) una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo específico para tacrolimus para determinar el resultado de medición 1 y medir en la etapa (b) una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo específico para tacrolimus para determinar el resultado de medición 2
- (c) sustraer el resultado de medición 1 del resultado de medición 2 para determinar la concentración de tacrolimus en la muestra.
- 10 10. El método de la reivindicación 9, en el que la muestra es una excreción corporal, aspirado corporal, excisión corporal o extracto corporal.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el método de ensayo es un método de ensayo homogéneo.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los reactivos en la etapa (i) comprenden además un análogo de tacrolimus en el que el análogo comprende una etiqueta.
- 15 13. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en la etapa (i) se agrega un segundo anticuerpo al medio en el que el segundo anticuerpo se une a un complejo que comprende el anticuerpo para tacrolimus.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que al menos uno de los anticuerpos para tacrolimus o el segundo anticuerpo comprende un marcador.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que uno de los reactivos comprende una etiqueta.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que uno de los reactivos comprende una partícula.
- 20 17. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que uno de los reactivos comprende un marcador enzimático y uno de los reactivos comprende una partícula magnética.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que antes o durante la etapa (b) se agrega un agente de liberación al medio para liberar tacrolimus unido de los componentes de la muestra.