

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 557**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013 PCT/US2013/024054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13133917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13757546 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2823304**

54 Título: **Ensayo de tipo sándwich para fármacos inmunodepresores**

30 Prioridad:

07.03.2012 US 201213413925

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

22.06.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

WEI, TIE, QUAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 673 557 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de tipo sándwich para fármacos inmunodepresores

Antecedentes

5 La invención se refiere a compuestos, métodos y kits para la determinación del tacrólimus en muestras, tales como muestras de pacientes, que se sabe o se sospecha que contienen tacrólimus.

10 El cuerpo depende de un complejo sistema de respuesta inmunitaria para distinguir lo propio de lo no propio. En ocasiones, el sistema inmunitario del cuerpo debe controlarse para aumentar una respuesta deficiente o reducir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando órganos tales como el riñón, el corazón, corazón-pulmón, la médula ósea y el hígado se trasplantan en humanos, a menudo el cuerpo rechazará el tejido trasplantado mediante un proceso denominado rechazo de aloinjertos.

15 En el tratamiento del rechazo de aloinjertos, el sistema inmunitario se deprime con frecuencia de una manera controlada con terapia farmacológica. Los fármacos inmunodepresores son fármacos terapéuticos que se administran cuidadosamente a los receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjertos de tejido no propio. Los fármacos inmunodepresores se pueden clasificar de la siguiente manera: glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre las inmunofilinas y otros fármacos tales como interferones, proteínas opiáceas de unión a INF, micofenolato, FTY720 y similares. Una clase particular de fármacos inmunodepresores comprende los fármacos que actúan sobre las inmunofilinas. Las inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión específica, de alta afinidad, que tienen importancia fisiológica. En la actualidad se conocen dos familias distintas de inmunofilinas: las ciclofilinas y las macrofilinas, las últimas de las cuales se unen específicamente, por ejemplo, al tacrólimus o al sirólimus.

20 Los dos fármacos inmunodepresores más comúnmente administrados para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados son la ciclosporina (CSA) y FK-506 (FK o tacrólimus). Otro fármaco que se usa en los Estados Unidos y en otros países como inmunodepresor es el sirólimus, también conocido como rapamicina. Los derivados del sirólimus también son útiles como inmunodepresores. Tales derivados incluyen, por ejemplo, al Everólimus y similares.

30 Los efectos secundarios asociados con algunos fármacos inmunodepresores pueden controlarse en parte controlando cuidadosamente el nivel de fármaco presente en un paciente. La monitorización terapéutica de las concentraciones de fármacos inmunodepresores y fármacos relacionados en la sangre es necesaria para optimizar pautas posológicas, para garantizar una inmunodepresión máxima con una toxicidad mínima. Aunque los fármacos inmunodepresores son agentes inmunodepresores altamente eficaces, su uso debe gestionarse con cuidado debido a que el rango de dosis eficaces es a menudo estrecho y la dosificación excesiva puede dar como resultado efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosificación demasiado baja de un inmunodepresor puede conducir al rechazo de tejidos. Debido a que la distribución y el metabolismo de un fármaco inmunodepresor pueden variar enormemente entre los pacientes y debido al amplio intervalo y gravedad de las reacciones adversas, la monitorización precisa del nivel de fármaco es esencial. El documento WO 00/22000 se refiere a la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a regiones específicas de la ciclosporina (CSA) y/o de metabolitos/derivados de CSA. La reactividad de estos anticuerpos policlonales y monoclonales los hace particularmente útiles para inmunoensayos para la monitorización de fármacos terapéuticos (MFT). Estos kits de inmunoensayo o de MFT pueden incluir anticuerpos policlonales o monoclonales frente a sitios específicos de la CSA y/o metabolitos de la CSA. Se preparan inmunógenos conjugados de ciclosporina o metabolito de CSA para la inmunización de animales hospedadores para producir anticuerpos dirigidos contra regiones específicas de la molécula de CSA o metabolito de CSA. Mediante la determinación de la región de unión específica de un anticuerpo particular, se desarrollan inmunoensayos que tienen la capacidad de distinguir entre la molécula precursora, los metabolitos activos, los metabolitos inactivos y otros compuestos inmunodepresores similares desde el punto de vista estructural. El documento WO 00/22000 divulga que para el desarrollo de ensayos de tipo sándwich para la MFT son necesarios los anticuerpos de dos especies distintas. El documento US 2009/0087865 A1 se refiere a un anticuerpo monoclonal IgG γ 1 frente al fármaco inmunodepresor tacrólimus que tiene propiedades mejoradas. En particular, este anticuerpo monoclonal, denominado IH6, tiene reactividad cruzada reducida frente a varios metabolitos del tacrólimus. Este anticuerpo es adecuado para la realización de inmunoensayos tales como inmunoensayos homogéneos, para detectar o determinar la presencia de, o la concentración de tacrólimus en muestras, tales como muestras de sangre. El documento WO 2008/082979 se refiere a métodos de preparación de una muestra de prueba para su uso en un ensayo para la detección de un analito unido por un ligando intracelular. Los métodos implican normalmente poner en contacto la muestra de prueba con un reactivo de ensayo que comprende: un reactivo de lisis; y una proteasa que tiene actividad proteolítica para el ligando intracelular; para formar una mezcla compatible para su uso en un inmunoensayo sin etapas de extracción posteriores. Otros aspectos de la invención incluyen inmunoensayos relacionados y kits de prueba. El documento WO 2008/082982 se refiere a inmunoensayos para fármacos inmunodepresores, en los cuales el ensayo se lleva a cabo en condiciones de alta sal para lograr una sensibilidad mejorada.

Ambos documentos WO2008/082979 y WO 2008/082982 invitan al desarrollo de un ensayo de tipo sándwich, sin ninguna divulgación en cuanto a cómo hacerlo.

5 Existe, por lo tanto, una necesidad continua de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir los niveles de fármacos inmunodepresores o derivados de los mismos en pacientes. Los métodos deberían tener la capacidad de automatizarse por completo y deberían detectar selectivamente el fármaco precursor, mientras se minimizan las imprecisiones resultantes de la reactividad cruzada de sus metabolitos o de los constituyentes en una muestra que se sospecha que contiene el fármaco inmunodepresor.

Sumario

10 Algunos ejemplos en conformidad con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a métodos de determinación de tacrólimus en una muestra que se sospecha que contiene tacrólimus de acuerdo con la reivindicación 1.

15 Los métodos comprenden proporcionar en combinación en un medio la muestra, un primer anticuerpo monoclonal frente a tacrólimus asociado con partículas magnéticas y un segundo anticuerpo monoclonal para tacrólimus, que está asociado con una enzima. El segundo anticuerpo monoclonal se une a una porción de tacrólimus distinta de la porción a la que se une el primer anticuerpo monoclonal frente a tacrólimus. El medio se incuba en condiciones para la unión del primer anticuerpo y el segundo anticuerpo a tacrólimus en la muestra, y se examina la presencia en el medio de un inmunocomplejo que comprende tacrólimus, el primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal. La presencia y/o cantidad del inmunocomplejo indica la presencia y/o cantidad de tacrólimus en la muestra.

20 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una fórmula química con numeración para el tacrólimus.

La Fig. 2 es la fórmula química de la Fig. 1 representando las porciones de la molécula a la que se unen los anticuerpos monoclonales en conformidad con los principios descritos en el presente documento.

25 La Fig. 3 es un gráfico que representa las curvas de respuesta a la dosis de señal de un inmunoensayo de tipo sándwich de tacrólimus, en conformidad con los principios descritos en el presente documento.

La Fig. 4 es un gráfico que representa las curvas de respuesta a la dosis de señal de un inmunoensayo ELISA de tipo sándwich de tacrólimus, en conformidad con los principios descritos en el presente documento.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

30 El presente inventor ha descubierto que pueden prepararse anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a porciones distintas de las moléculas del fármaco inmunodepresor. Este descubrimiento es sorprendente porque los fármacos inmunosupresores son haptenos, que son moléculas relativamente pequeñas (peso molecular inferior a aproximadamente 2500, o inferior a aproximadamente 2000, o inferior a aproximadamente 1500, o inferior a aproximadamente 1000) y no se considera que tengan más de un sitio al que se puede unir un anticuerpo. En
35 conformidad con los principios descritos en el presente documento, se pueden preparar al menos dos anticuerpos diferentes, que se unen a porciones distintas de una molécula de fármaco inmunodepresor al mismo tiempo. La frase "anticuerpo frente al fármaco inmunodepresor" significa un anticuerpo que se une específicamente al fármaco inmunodepresor y no se une en ningún grado significativo a otras sustancias que distorsionarían el análisis del fármaco inmunodepresor. Unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas distintas,
40 de la otra, en comparación con un reconocimiento sustancialmente inferior de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente dependiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede ser el resultado de varios factores, que incluyen las interacciones hidrófobas entre moléculas.

45 Los haptenos son compuestos que tienen la capacidad de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúan ellos mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. Por consiguiente, un hapteno está enlazado a un transportador inmunogénico, el cual se emplea para obtener anticuerpos.

50 La preparación de los anticuerpos monoclonales que se unen al mismo tiempo a dos sitios distintos en un fármaco inmunodepresor permite el uso de tales anticuerpos en ensayos de tipo sándwich en los cuales el fármaco inmunodepresor se une de forma simultánea por los dos anticuerpos distintos para formar un inmunocomplejo. La

capacidad de realizar ensayos de tipo sándwich con fármacos inmunodepresores mejora la sensibilidad de un ensayo para el fármaco inmunodepresor. Además, en el caso de los ensayos de tipo sándwich que implican un anticuerpo monoclonal unido a un soporte, el ensayo puede realizarse en presencia de impurezas y de sustancias que interfieren de una muestra, debido a que el soporte puede separarse de la muestra y lavarse después de haber permitido que el fármaco inmunodepresor se una al anticuerpo monoclonal del soporte pero antes de la introducción del segundo anticuerpo monoclonal.

El término "fármacos inmunodepresores" se refiere al tacrólimus (FR-900506, FK506, PROGRAF).

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

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como preparar líneas celulares híbridas continuas y recoger la proteína secretada (técnicas de hibridación de células somáticas). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980) y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981).

En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión del anticuerpo puede escindirse del ADN cromosómico e insertarse en un vector de clonación, el cual puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tengan los sitios de unión del anticuerpo correspondientes. Este enfoque implica clonar y expresar secuencias de nucleótidos, o versiones mutagenizadas de las mismas, que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales.

En un enfoque para la producción de anticuerpos monoclonales, una primera etapa incluye la inmunización de un animal productor de anticuerpos, tal como un ratón, una rata, una cabra, una oveja o una vaca con el antígeno, por ejemplo, con un inmunógeno. La inmunización se puede realizar con o sin un adyuvante tal como el adyuvante de Freund completo, u otros adyuvantes tales como monofosforil lípido A y el adyuvante de dicorinomicolato de trehalosa sintético. Una siguiente etapa incluye aislar células de bazo del animal productor de anticuerpos y fusionar las células del bazo productoras de anticuerpos con un compañero de fusión apropiado, normalmente una célula de mieloma, tal como mediante el uso de polietilenglicol u otras técnicas. Normalmente, las células de mieloma utilizadas son las que crecen normalmente en medio de hipoxantina-timidina (HT) pero no pueden crecer en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), utilizado para la selección de las células fusionadas. Una siguiente etapa incluye la selección de las células fusionadas, normalmente por selección en medio HAT. Una siguiente etapa incluye la selección de los híbridos clonados para la producción de anticuerpos apropiados, utilizando inmunoensayos tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros inmunoensayos apropiados para la selección.

El término "transportador inmunogénico" significa un grupo o fracción que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero o se emplea de otro modo como un inmunógeno, induce una respuesta inmunitaria y suscita la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los transportadores inmunogénicos en ocasiones también se denominan transportadores antigénicos. En algunos ejemplos en conformidad con los principios descritos en el presente documento, para preparar anticuerpos se sintetizan y se utilizan inmunógenos que comprenden transportadores inmunogénicos, que incluyen transportadores inmunogénicos de poli(aminoácidos) y no poli(aminoácidos), enlazados a un compuesto inmunodepresor en una posición particular.

El intervalo de pesos moleculares (en Daltons) para los poli(aminoácidos) que son transportadores inmunogénicos es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.000, o de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 600.000, o de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 250.000 de peso molecular, por ejemplo. Los transportadores inmunogénicos de poli(aminoácidos) incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas del cristalino ocular y lipoproteínas. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), ovoalbúmina de huevo y gammaglobulina bovina (GGB), por ejemplo. Los vehículos inmunogénicos no poli(aminoácidos) incluyen polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Se divulga una amplia diversidad de transportadores inmunogénicos en Davalian, *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 5.089.390, columna 4, línea 57, a la columna 5, línea 5.

Como menciona anteriormente, el transportador inmunogénico puede ser un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular de monosacáridos que se puede preparar de forma natural o sintética, y habitualmente implica condensaciones repetidas de monosacáridos. Los ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa,

gomas de hidratos de carbono, tales como goma arábica, agar, y así sucesivamente. El polisacárido puede contener también restos de poli(aminoácidos) y/o restos de lípidos.

5 Como menciona anteriormente, en algunos ejemplos en conformidad con los principios descritos en el presente documento, el transportador inmunogénico puede enlazarse al compuesto inmunodepresor en una posición predeterminada en el compuesto inmunodepresor mediante de un grupo de unión. En algunos ejemplos, el grupo enlazador puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos, o de 4 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de desde 2 hasta aproximadamente 30 átomos, o de 3 a aproximadamente 20 átomos, seleccionados cada uno independientemente del grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. Parte o todo el grupo enlazador puede ser una porción de la molécula que está unida al compuesto inmunodepresor, tal como, pero sin limitación, un resto de aminoácido en un poli(aminoácido), por ejemplo. En algunos ejemplos, el grupo enlazador comprende una funcionalidad de oxima.

15 El número de heteroátomos en el grupo enlazador puede estar en el intervalo de desde 0 a aproximadamente 20, o de 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. El grupo enlazador puede ser alifático o aromático. Cuando los heteroátomos están presentes, el oxígeno normalmente está presente como oxo u oxi, enlazado a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno normalmente está presente como nitro, nitroso o amino, normalmente enlazado a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras que el fósforo está enlazado a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, normalmente como mono- o diéster de fosfonato y fosfato. Las funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo enlazador y la molécula a conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres, amidas y tioésteres de fosfato. Una realización específica de un grupo enlazador que comprende heteroátomos es una funcionalidad de oxima como se menciona anteriormente.

25 En su mayor parte, cuando un grupo enlazador tiene una funcionalidad enlazadora (funcionalidad para la reacción con una fracción), tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de azufre y nitrógeno, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante, tal como halo o tosilalquilo, un oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona) o una olefina activa, tal como vinil sulfona de éster α -, β -insaturado, estas funcionalidades se enlazan a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando están enlazados una amina y un ácido carboxílico, o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas o fosforamidas. Cuando que están enlazados un mercaptano y una olefina activada, se forman tioéteres. Cuando están enlazados un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando están enlazados un aldehído y una amina en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando están enlazados una cetona o un aldehído y una hidroxilamina (incluyendo los derivados de los mismos en donde un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo), se forma una funcionalidad de oxima (=N-O-). Cuando están enlazados un ácido carboxílico o un ácido de fosfato y un alcohol, se forman ésteres. Se conocen bien en la técnica diversos grupos enlazadores; véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Tacrólimus

40 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales que se unen a porciones distintas de la molécula de tacrólimus (Fig. 1). Las porciones distintas a las que se unen los anticuerpos monoclonales se pueden determinar, por ejemplo, mediante estudios de reactividad cruzada usando metabolitos de tacrólimus. En referencia a la Figura 2, un anticuerpo monoclonal que puede prepararse se une a una porción de tacrólimus (región 14) que consiste esencialmente en el anillo C29-C34, que incluye los sustituyentes metoxi e hidroxilo, y C15, que incluye el sustituyente metoxi. Se puede preparar otro anticuerpo monoclonal que se une a una porción de tacrólimus que consiste esencialmente en el metoxi del anillo C10-C14 y C19-C27 del anillo C1-C26, que incluye el grupo oxígeno de C22 y que también incluye el grupo hidroxilo de C24 y el oxígeno del éster de C26 (región 12). El examen de la estructura de tacrólimus por análisis tridimensional revela la conformación de las regiones 12 y 14.

Se puede preparar un anticuerpo monoclonal dirigido a la región 14 a partir de un inmunógeno en el cual el tacrólimus está enlazado en una posición en la región C19-C27 de la molécula de tacrólimus, directamente mediante un enlace o a través de la mediación de un grupo enlazador, a un transportador inmunogénico.

50 En un ejemplo específico, a modo de ilustración y no de limitación, en conformidad con los principios descritos en el presente documento, el tacrólimus en la posición C22 de la molécula de tacrólimus está enlazado, directamente mediante un enlace o a través de la mediación de un grupo enlazador, a un transportador inmunogénico. En un ejemplo particular, a modo de ilustración y no de limitación, el grupo cetona de la posición C22 se hace reaccionar con una amina para producir una oxima. La amina puede ser, pero sin limitación, por ejemplo carboximetoxilamina.

55 En un enfoque, la reacción del tacrólimus con carboximetoxilamina produce una carboximetil oxima. En este ejemplo particular, el tacrólimus puede hacerse reaccionar con carboximetilamina en un medio alcohólico tal como, por ejemplo, metanol, etanol o propanol, en presencia de una sal tamponadora tal como, por ejemplo, acetato de sodio,

para proporcionar la carboximetil oxima. Esta oxima puede enlazarse a un transportador inmunogénico tal como, por ejemplo, una proteína de alto peso molecular, que puede ser, pero sin limitación, seroalbúmina bovina, tiroglobulina, ovoalbúmina, fibrinógeno o hemocianina de lapa californiana, por ejemplo. En un ejemplo, la proteína es hemocianina de lapa californiana.

- 5 En un ejemplo, un método de preparación del conjugado de tacrólimus con una proteína de alto peso molecular es el siguiente: (1) preparación de la carboximetil oxima de tacrólimus como se describe anteriormente; (2) activación de la carboximetil oxima para producir un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo; y (3) hacer reaccionar el éster de N-hidroxisuccinimida con la proteína de alto peso molecular para producir el conjugado. La activación de la carboximetil oxima para producir el éster de N-hidroxisuccinimida se realiza, por ejemplo, usando un agente de acoplamiento tal como una carbodiimida soluble en agua tal como, por ejemplo, clorhidrato de 3-(3-dimetilaminopropil 1-etil-3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

- 15 En otro ejemplo, un conjugado de tacrólimus derivatizado en un átomo de carbono dentro de la región C19 - C27 de tacrólimus es un derivado de bromoacetilo. La preparación de derivados de bromoacetilo de tacrólimus comprende (1) hacer reaccionar el tacrólimus con carboximetoxilamina para producir un derivado carboximetil oxima de tacrólimus, (2) activar la carboximetil oxima para producir un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo, y (3) hacer reaccionar el éster de N-hidroxisuccinimida con la sal de ácido trifluoroacético de bromoacetil etilendiamina para producir un derivado de bromoacetilo. El derivado de carboximetil oxima usado en este método se prepara como se describe anteriormente. Dichos derivados de bromoacetilo se pueden usar para producir conjugados de proteína de tacrólimus haciendo reaccionar la fracción bromoacetilo con un grupo sulfhidrilo de una proteína.

- 20 El anticuerpo monoclonal para la región 14 puede identificarse mediante un método de exploración de la siguiente manera: La región de unión de un clon de anticuerpo se identificó basándose en sus propiedades de unión a distintos derivados de tacrólimus, tales como metabolitos e inmunógenos. La región 14 se identificó como la región de unión para el clon 14H04 basándose en lo siguiente: (a) el inmunógeno empleado tenía una proteína transportadora inmunogénica enlazada a través del grupo cetilo del C22 del tacrólimus, (b) la oxima del C22 del tacrólimus presenta una fuerte unión al anticuerpo monoclonal 14H04, lo que indica que la unión del anticuerpo no se produce cerca de la región C22 (la modificación de la región no interrumpió la unión del anticuerpo), (c) el compuesto de carbamato del C32 del tacrólimus no se unió al anticuerpo monoclonal 14H04 y los metabolitos que implican la desmetilación del grupo metoxi del C31 redujeron drásticamente la unión del anticuerpo, lo que indica que 14H04 se une al anillo C29-34, y (d) que no haya reactividad cruzada con 15-O-demetil tacrólimus indica que 14H04 se une a la región adyacente al C15 (modificando el grupo 15-O-metilo se eliminó la capacidad de unión del anticuerpo).

- 35 Se puede preparar un anticuerpo monoclonal dirigido a la región 12 a partir de un inmunógeno en el cual el tacrólimus está enlazado en una posición en la región C29-C34 de la molécula de tacrólimus, directamente mediante un enlace o a través de la mediación de un grupo enlazador, a un transportador inmunogénico. Los grupos enlazadores y los procedimientos para el enlace son como se describe anteriormente, para el enlace a través de una posición en la región C19 - C27 del tacrólimus. En un ejemplo, se enlaza una fracción al tacrólimus a través de la posición C32 de la molécula de tacrólimus empleando el grupo hidroxilo.

- 40 El anticuerpo monoclonal para la región 12 puede identificarse mediante el siguiente método de exploración. La región 12 se identificó como la región de unión para el clon 1E2 basándose en lo siguiente: (a) el inmunógeno empleado se enlazó a través del C32 y la modificación del C32 (por ejemplo, compuestos de carbamato del C32 del tacrólimus) no cambia la unión del anticuerpo monoclonal 1E2, (c) 1E2 tiene el 100 % de unión a derivados de éster del C32 del tacrólimus, y (d) la modificación del grupo metoxi del C31 (31-O-desmetilo) no disminuye la unión del anticuerpo monoclonal 1E2. Todo lo anterior indica que el anticuerpo monoclonal 1E2 no se une al anillo C29-C34 del tacrólimus. La modificación del grupo hidroxilo enlazado al C24 debilitó la unión del anticuerpo monoclonal 1E2 al tacrólimus. El compuesto de oxima del C22 del tacrólimus no se une a 1E2, lo que indica que el anticuerpo monoclonal 1E2 se une a la región C22-C24 del tacrólimus. La modificación del grupo metoxi del C13, como en el caso de M1 (13-O-desmetilo) y MVI (13, 31 didesmetilo), eliminó la unión del anticuerpo monoclonal 1E2 frente a tacrólimus, lo que indica que el anticuerpo monoclonal 1E2 se une a la región C13 del tacrólimus.

- 50 En vista de lo anterior, los anticuerpos monoclonales 1E2 y 14H04 tienen dominios de unión en la molécula de tacrólimus distintos, lo que permite un ensayo de tipo sándwich para el fármaco tacrólimus.

- 55 Las mediciones de derivados de tacrólimus por el formato de ensayo ACMIA se llevaron a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los metabolitos se obtuvieron de Isotechnika Pharma Inc (Alberta, Canadá) y del Laboratorio del Dr. Christians de la Universidad de Colorado en Denver, Colorado. Los compuestos derivados de tacrólimus tales como inmunógenos se obtuvieron de Siemens AG (Glasgow, DE). La reactividad cruzada de los metabolitos y los inmunógenos se midió utilizando la metodología ACMIA descrita en Patente de Estados Unidos N.º 7.186.518. En resumen, ambos clones se conjugaron con β -galactosidasa usando un enlazador de SMCC (trans-4-(N-maleimidilmetil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) heterobifuncional convencional, de acuerdo con técnicas conocidas. Se prepararon partículas de cromo (fase sólida del inmunoensayo) conjugando análogos de

- tacrólímus con inmunoglobulina bovina y después con partículas de dióxido de cromo recubiertas con dextrano polialdehído. El análogo de tacrólímus usado para el anticuerpo monoclonal 14H04 era un compuesto de oxima del C22 del tacrólímus. El análogo utilizado para el anticuerpo monoclonal 1E2 era un derivado de fluoresceína del C32 del tacrólímus inmovilizado en partículas de dióxido de cromo recubiertas con anticuerpo anti-fluoresceína. La reactividad cruzada se detectó analizando las muestras que contenían metabolitos enriquecidos y otros derivados de tacrólímus tales como los inmunógenos. Las señales del ensayo obtenidas de las muestras que contenían los metabolitos enriquecidos se compararon con las señales obtenidas de las muestras que contenían patrones de tacrólímus. La reactividad cruzada se determinó dividiendo la concentración aparente de tacrólímus por la concentración de metabolito añadido y expresando el resultado como un porcentaje.
- 10 Debe señalarse que un ensayo de tipo sándwich en conformidad con los principios descritos en el presente documento debe presentar una menor reactividad cruzada con los metabolitos de tacrólímus, en comparación con un ensayo competitivo utilizando uno u otro de los reactivos de anticuerpos monoclonales anteriores. En un ensayo de tipo sándwich, un metabolito necesita unirse a ambos anticuerpos para presentar reactividad cruzada. Si un metabolito se une solamente a un anticuerpo y no a otro (o tiene una unión débil al otro), no se genera señal de ensayo y, por lo tanto, no se demuestra reactividad cruzada. Si un metabolito presenta el 100 % de unión a un anticuerpo pero tiene una unión más débil (por ejemplo, del 30 %) al otro, la reactividad cruzada medida por el ensayo es la unión más débil (es decir, del 30 %). Además, si un metabolito presenta baja unión (por ejemplo, del 40 %) a un anticuerpo y tiene una unión aún menor (por ejemplo, del 20 %) al otro anticuerpo, la reactividad cruzada en un ensayo de tipo sándwich debería ser menor que la unión menor (en el ejemplo anterior, $40\% \times 20\% = 8\%$).
- 20 En los estudios de reactividad cruzada, los dos anticuerpos, 1E2 y 14H04, presentan perfiles distintos de reactividad cruzada con metabolitos M1 13-O-desmetil-tacrólímus, MII, 31-O-desmetil Tacrólímus, MIII 15-O-desmetil-tacrólímus, MIV 12-OH-tacrólímus, M-VI 13,31-O-didesmetil-tacrólímus y M-VII 15,31-O-didesmetil-tacrólímus. La reactividad cruzada medida en un ensayo de tipo sándwich debe ser igual o menor que la del anticuerpo que presenta menor unión a un metabolito.

25 Descripción general de los ensayos para un medicamento inmunodepresor

- Como menciona anteriormente, los ejemplos en conformidad con los principios descritos en el presente documento permiten un ensayo de tipo sándwich para la determinación de un fármaco inmunodepresor en una muestra que se sospecha que contiene el fármaco inmunodepresor. En el ensayo de tipo sándwich se emplean dos anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une al mismo tiempo a regiones distintas de la molécula del fármaco inmunodepresor para formar un inmunocomplejo. La detección del inmunocomplejo permite la determinación del fármaco inmunodepresor en la muestra.

- La muestra a analizar es habitualmente una muestra biológica. La frase "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, líquido corporal, tejido corporal, compuestos orgánicos y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, un semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, un aspirado corporal, una extirpación corporal o un extracto corporal. El cuerpo es habitualmente el de un mamífero y, en algunas realizaciones, el cuerpo es un cuerpo humano. Las excreciones corporales son las sustancias que se excretan de un cuerpo (aunque también se pueden obtener por resección o extracción) tal como, por ejemplo, orina, heces, deposiciones, mucosidad vaginal, semen, lágrimas, aire espirado, sudor, líquido vesicular y exudados inflamatorios. Las extracciones corporales son los materiales que se reseccionan de una parte del cuerpo tal como, por ejemplo, muestras de piel, pelo y tejido, incluyendo biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Los aspirados corporales son los materiales que se aspiran de una parte del cuerpo tal como, por ejemplo, mucosidad, saliva y esputo. Los extractos corporales son los materiales que se extraen de una parte del cuerpo tal como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial y líquido peritoneal. En algunos ejemplos la sangre es sangre entera, plasma o suero.

- Antes del ensayo, o en algunos casos durante el ensayo, la muestra puede someterse a uno o más pretratamientos para lisar células y/o para liberar al fármaco inmunodepresor de sustancias de unión endógenas. Las células lisadas pueden lograrse mediante el uso de un agente hemolítico, que es un compuesto o mezcla de compuestos que altera la integridad de las membranas de los glóbulos rojos, liberando de este modo los contenidos intracelulares de las células. Los agentes hemolíticos incluyen, pero sin limitación, detergentes no iónicos, detergentes aniónicos, detergentes anfotéricos, soluciones acuosas de baja fuerza iónica (soluciones hipotónicas), agentes bacterianos y anticuerpos que provocan lisis dependiente del complemento, por ejemplo.

- Los detergentes no iónicos que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen detergentes sintéticos y detergentes naturales. Los ejemplos de detergentes sintéticos incluyen TRITON™ X-100, TRITON™ N-101, TRITON™ X-114, TRITON™ X-405, TRITON™ SP-135, TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano), TWEEN® 80 (monooleato de polioxietileno(20)sorbitano), DOWFAX®, ZONYL®, palmitato de pentaeritritilo, ADOGEN® 464, tensioactivo ALKANOL® 6112, 1,2-butoxilato-bloque-etoxilato del alcohol alílico con HLB 6, BRIJ®, etilendiamin tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato) tetrol, IGEPAL®, MERPOL®, poli(etilenglicol), 2-[etil[(heptadecafluorooctil)sulfonil] amino] etil éter, polietilén-bloque-poli(etilenglicol), tetraoleato de polioxietilén

sorbitán, hexaoleato de polioxietilén sorbitol, TERGITOL® NP-9, GAFAC® (RHODAFAC®, un éster de alquil polioxietilenglicol fosfato tal como, por ejemplo, alfa-dodecil-omega-hidroxipoli(oxi-1,2-etandiil) fosfato) y EP110® y similares. Los detergentes de origen natural que se pueden emplear como el agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, un ácido graso neutralizado con sodio o fosfato, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidil serina neutralizada, fosfatidato, fosfatidil etanolamina neutralizada, fosfatidil colina, fosfatidil inositol,, fosfatidilcolina, sal biliar, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También se pueden emplear combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes de origen natural, y combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes de origen natural.

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

El agente de liberación es un compuesto o mezcla de compuestos que desplaza el fármaco inmunodepresor de las fracciones de unión endógenas. El agente de liberación puede, y en muchos casos lo hace, desplazar metabolitos del fármaco inmunodepresor de las fracciones de unión endógenas. En muchos ejemplos, el agente de liberación tiene una alta afinidad de unión a las proteínas de unión endógenas, de manera que desplaza fácilmente el fármaco inmunodepresor, y sus metabolitos cuando se desee, de las proteínas de unión endógenas. Además, el agente de liberación no se une en ningún grado significativo a un anticuerpo monoclonal para el fármaco que se utiliza en un ensayo. Por la frase "no se une en ningún grado significativo" se entiende que el grado de unión debe ser lo suficientemente bajo como para que se pueda llevar a cabo un ensayo preciso para el fármaco. El agente de liberación, por lo tanto, puede ser cualquier fracción, ya sea un solo compuesto o una mezcla de compuestos, que logre el resultado deseado de desplazamiento sin unión significativa a un anticuerpo del ensayo.

En algunos ejemplos, el agente de liberación es un análogo, incluyendo análogos estructurales, de fármaco inmunodepresor. Un análogo del fármaco inmunodepresor es un fármaco modificado que puede desplazar el fármaco inmunodepresor análogo de una proteína de unión, pero no compite en ningún grado sustancial con un anticuerpo monoclonal para el fármaco inmunodepresor. La modificación proporciona medios para unir un análogo de fármaco inmunodepresor a otra molécula. En un ejemplo, el análogo del fármaco inmunodepresor puede ser, por ejemplo, el fármaco inmunodepresor conjugado con otra molécula a través de un grupo enlazador. El agente de liberación puede ser un éster del fármaco inmunodepresor, que tenga una alta afinidad de unión por proteínas de unión endógenas, con respecto al fármaco inmunodepresor a detectar, y que no tiene una afinidad de unión significativa por un anticuerpo para el fármaco inmunodepresor. Por ejemplo, se puede emplear como el agente de liberación un éster de tacrólimus siempre que cumpla los requisitos anteriores. Un análogo estructural es una fracción que tiene las mismas o similares características estructurales o espaciales que el fármaco inmunodepresor, de forma que el análogo estructural logre el mismo resultado, o uno similar, que el análogo del fármaco inmunodepresor. El análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que esté relacionado con el fármaco inmunodepresor. Por ejemplo, se puede emplear como el agente de liberación un éster de sirólimus. El éster puede ser, por ejemplo, un carbamato, un carbonato, un éster de un ácido carboxílico en C₁ a C₆, y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 7.186.518. Otros ejemplos de agentes de liberación incluyen, [Thr₂, Leu₅, D-Hiv₈, Leu₁₀]-ciclosporina A for ciclosporina A, FK506 para sirólimus, sirólimus para FK506, y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.187.547.

La concentración del agente de liberación en el medio es suficiente para conseguir el resultado deseado de desplazamiento del fármaco inmunodepresor y, en algunos casos, de los metabolitos del fármaco inmunodepresor, de fracciones de unión endógenas, para hacer accesibles al fármaco y los metabolitos para la unión a un anticuerpo para el fármaco, como se discute anteriormente. La cantidad o concentración del agente de liberación empleado depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco inmunodepresor, la naturaleza de los metabolitos del fármaco, 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 el 0,000001 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 0,4 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,3 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,2 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,3 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,2 %, y así sucesivamente (el porcentaje es peso/volumen).

El ensayo es un inmunoensayo, que puede realizarse sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los ensayos homogéneos o heterogéneos se llevan a cabo en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que, en general, proporciona una sensibilidad de ensayo

5 óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH del medio habitualmente estará 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 habitualmente será un compromiso entre la unión óptima de los anticuerpos monoclonales y el fármaco inmunodepresor, y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como los elementos del sistema de producción de señal, por ejemplo.

10 Pueden usarse diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para la presente invención, pero en un ensayo individual pueden ser preferente un tampón u otro. En los métodos anteriores pueden emplearse diversos materiales complementarios. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos, tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones, tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, en particular tensioactivos no iónicos; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; por ejemplo.

15 Pueden aplicarse uno o más períodos de incubación al medio, a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de los diversos reactivos mencionados anteriormente. Habitualmente, el medio se incubaba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Habitualmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente una temperatura constante, preferentemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. Las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones varían de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 50 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C.

20 La concentración del analito de fármaco de inmunodepresión que puede ensayarse varía, en general, de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, o de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. Las consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicualitativo o cuantitativo (con respecto a la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

25 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán, en general, por el intervalo de concentración de interés del analito de fármaco inmunosupresor. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos se determina habitualmente de forma empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo. Es decir, una variación en la concentración del analito que sea de importancia debe proporcionar una diferencia de señal medible de forma precisa. Las consideraciones, tales como la naturaleza de un sistema de producción de señal y la naturaleza del analito inmunosupresor, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

30 Aunque el orden de adición puede variarse ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden más sencillo de adición es añadir todos los materiales de forma simultánea y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal, como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, los reactivos pueden combinarse de forma secuencial. Opcionalmente, puede estar implicada una etapa de incubación después de cada adición, como se ha tratado anteriormente.

35 En los ensayos discutidos anteriormente, se emplean uno o más marcadores, en donde habitualmente el marcador es parte de un sistema de producción de señal ("sps"). La naturaleza del marcador depende del formato de ensayo particular. Un sps incluye habitualmente uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador detectable, que genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de marcador enlazado y/o no enlazado, es decir, la cantidad de marcador enlazado o no enlazado al fármaco inmunodepresor que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad del fármaco inmunodepresor a detectar. El marcador es cualquier molécula que produce o puede inducirse para producir una señal y puede ser, por ejemplo, un agente fluorescente, un radiomarcador, una enzima, un agente quimioluminiscente o un fotosensibilizador. De este modo, la señal se detecta y/o mide detectando la actividad de la enzima, la luminiscencia, la absorbancia lumínica o la radioactividad, según sea el caso.

40 Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y la peroxidasa de rábano picante; una ribozima; un sustrato para una replicasa tal como replicasa QB; promotores; colorantes; agentes fluorescentes, tal como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina,

o-ftalaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizantes; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcadores tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como las partículas de látex, partículas de carbono, partículas de metal incluyendo partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de cromo y similares; sol metálico; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Las enzimas y coenzimas adecuadas se divulgan en Litman, *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 4.275.149, columnas 19-28, y Boguslaski, *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 4.318.980, columna 10-14; los agentes fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se divulgan en Litman, *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 4.275.149, en las columnas 30 y 31.

El marcador puede producir directamente una señal y, por lo tanto, no se necesitan componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo agentes fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, cuando la absorción lumínica transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa a continuación mediante emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen de forma directa una señal incluyen isótopos radioactivos y colorantes.

Como alternativa, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluiría entonces todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Tales otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica necesaria para la unión de las sustancias que generan señal. Se puede encontrar un análisis detallado de sistemas productores de señal en Ullman, *et al.*, patente de Estados Unidos N.º 5.185.243, columnas 11-13.

El marcador u otros elementos del sps, o uno o más de los anticuerpos monoclonales, se pueden unir a un soporte. Un anticuerpo monoclonal puede unirse a un soporte sólido de cualquier modo conocido en la técnica, solo con la condición de que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de unirse a una región del fármaco inmunodepresor. En algunos ejemplos, el marcador u otro elemento del sps, o el anticuerpo monoclonal, pueden estar recubiertos o unidos covalentemente de forma directa a la fase sólida o pueden tener capas de una o más moléculas transportadoras tales como poli(aminoácidos), que incluyen proteínas tales como albúminas séricas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (hidratos de carbono) tales como, por ejemplo, dextrano o derivados de dextrano. Los grupos enlazadores también pueden usarse para acoplar covalentemente el soporte sólido y la fracción a acoplar. El grupo enlazador puede ser uno como se describe anteriormente para el enlace del inmunógeno a una molécula de fármaco inmunodepresor. También se pueden emplear otros métodos de unión a un soporte. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un enlazador para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, donde una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina o un hapteno, pueda unirse a la fracción a acoplar o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente, y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245:3059 (1970).

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

El soporte puede ser partícula. Las partículas deben tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad que se aproxima al agua, en general, de aproximadamente 0,7 g/ml a aproximadamente 1,5 g/ml y puede estar compuesta de un 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* y *E. coli*, virus, por ejemplo. 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 algunos ejemplos, las partículas son partículas de cromo o partículas de látex.

Las partículas de polímero pueden estar formadas de polímeros de adición o condensación. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables, para permitir la conjugación a un anticuerpo monoclonal para un fármaco inmunodepresor, ya sea directa o indirectamente a través de un grupo enlazador. El grupo enlazador puede ser uno como se describe anteriormente para el enlace del inmunógeno a una molécula de fármaco inmunodepresor. Las partículas también pueden obtenerse de materiales de origen natural, materiales de origen natural que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de particular interés están los polisacáridos, en particular polisacáridos reticulados, tal como agarosa, que está disponible como Sepharose, dextrano, disponible como Sephadex y Sephacryl, celulosa, almidón y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, alcohol polivinílico, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, en particular ésteres y amidas que tienen funcionalidades de hidroxilo libre, y similares.

El marcador y/u otro elemento del sps pueden estar unidos a uno o ambos de los anticuerpos monoclonales distintos. El enlace del marcador al elemento del sps puede lograrse mediante reacciones químicas que dan como resultado el reemplazo de un átomo de hidrógeno del marcador con un enlace al anticuerpo monoclonal o puede incluir un grupo enlazador entre el marcador y el anticuerpo monoclonal. El grupo enlazador puede ser uno como se describe anteriormente para el enlace del inmunógeno a una molécula de fármaco inmunodepresor. Otros elementos del sps también pueden estar unidos covalentemente a los anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, dos elementos del sps como un agente fluorescente y un extintor, pueden estar unidos, respectivamente, a los anticuerpos monoclonales donde el agente fluorescente está unido a uno de los anticuerpos monoclonales y un extintor está unido al otro de los anticuerpos monoclonales. Cuando los dos anticuerpos monoclonales distintos se unen al fármaco inmunodepresor, la formación de un complejo de tipo sándwich lleva al agente fluorescente y al extintor de fluorescencia a una estrecha proximidad, permitiendo así que el extintor interactúe con el agente fluorescente para producir una señal. Se conocen bien en la técnica los métodos de conjugación. Véase, por ejemplo, Rubenstein, *et al.*, la Patente de Estados Unidos N.º 3.817.837.

Enzimas de particular interés como proteínas marcadoras son las enzimas redox, en particular deshidrogenasas, tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa, etc. y las enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante a un colorante. Las combinaciones particulares incluyen, pero sin limitación, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas a una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como una peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa. Se conocen en la técnica combinaciones enzimáticas adicionales. Cuando se usa una sola enzima como marcador, se usan otras enzimas tal como hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas, preferentemente hidrolasas tales como la fosfatasa alcalina y la beta-galactosidasa. Como alternativa, se pueden usar luciferasas tales como la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana.

Las coenzimas ilustrativas que se usan incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H], etc., habitualmente coenzimas que implican reacciones de ciclación. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.318.980.

La activación de un sistema de producción de señal depende de la naturaleza de los elementos del sistema de producción de señal. Para los elementos de un sistema de producción de señal que se activan con luz, el elemento se irradia con luz. Para elementos de sistemas de producción de señal que están 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 materia a la vista de las divulgaciones en el presente documento. Para algunos sistemas de producción de señal no es necesario ningún agente para la activación, tal como los sistemas que implican un marcador que es un marcador radiactivo, una enzima, y así sucesivamente. Para los sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

El examen de la presencia y la cantidad de señal también incluye la detección de la señal, que es, en general, simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorímetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y la cantidad de señal detectadas se refiere a la presencia y la cantidad del compuesto sirólímus presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones pueden variar de aproximadamente 10 ° a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 ° a aproximadamente 45 °C, o de aproximadamente 20 ° a aproximadamente 25 °C. En un enfoque, las curvas patrón se forman usando concentraciones conocidas de los analitos a explorar. Como se ha analizado anteriormente, también pueden usarse calibradores y otros controles.

La frase "medición de la cantidad de un fármaco inmunosupresor" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del fármaco inmunodepresor. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como otros métodos para la determinación del fármaco inmunodepresor, se consideran métodos de medición de la cantidad del fármaco inmunodepresor. Por ejemplo, un método que simplemente detecta la presencia

o ausencia del fármaco inmunodepresor en una muestra que se sospecha que contiene el fármaco inmunodepresor, se considera incluido dentro del alcance de la presente divulgación. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para la medición, se contemplan dentro del alcance de la presente divulgación.

5 En un ejemplo en conformidad con los principios descritos en el presente documento, uno de los anticuerpos monoclonales específicos para una región de un fármaco inmunodepresor está unido a un soporte y el otro de los anticuerpos monoclonales, que es específico para una región del fármaco inmunodepresor que está espacialmente separada de la región del fármaco inmunodepresor a la que el otro de los anticuerpos monoclonales se une, está unido a un elemento del sps tal como, por ejemplo, un marcador. La muestra que se sospecha que contiene el fármaco inmunodepresor se combina en un medio adecuado con los dos anticuerpos monoclonales conjugados, y el medio se incuba. Después, el medio se examina para una o ambas de la presencia y cantidad de un inmunocomplejo formado por los dos anticuerpos monoclonales distintos y el fármaco inmunodepresor de la muestra. El soporte puede separarse o no del medio antes del examen. La presencia y/o la cantidad del inmunocomplejo se determinan determinando la presencia y/o la cantidad del marcador en el medio o en el soporte.

15 En un ejemplo particular, se emplea un ensayo de captura. En este formato de ensayo, un anticuerpo monoclonal está unido covalentemente a una partícula magnética tal como, por ejemplo, una partícula de cromo (dióxido de cromo). La muestra se incuba con estas partículas para permitir que el fármaco inmunodepresor de la muestra se una al anticuerpo monoclonal en la partícula magnética. Posteriormente, se incuba con las partículas magnéticas un segundo anticuerpo monoclonal conjugado a una enzima tal como, por ejemplo, β -galactosidasa. Después de la aplicación de un imán y el lavado de las partículas magnéticas, se mide la cantidad de enzima que está unida a las partículas magnéticas, y está directamente relacionada con la presencia y/o cantidad del fármaco inmunodepresor en la muestra. En este enfoque, el sustrato de la enzima indicadora se añade al recipiente de reacción final, y se mide la actividad enzimática espectrofotométricamente como un cambio de la absorbancia a lo largo del tiempo.

25 En un enfoque alternativo, el reactivo de las partículas magnéticas se añade en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la necesaria para unir todo el fármaco inmunodepresor que pueda estar presente en la muestra. Después, se aplica un imán para separar las partículas magnéticas del medio, y las partículas magnéticas se lavan y resuspenden en medio de ensayo. Se añade la enzima conjugada con el segundo anticuerpo monoclonal y se incuba el medio, seguido de la determinación de la señal como se describe anteriormente.

30 En otro ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con las mismas, tal como por incorporación en las mismas o unión a las mismas. Uno de los anticuerpos monoclonales para el fármaco inmunodepresor se une a las partículas, tal como a través de la mediación de un polisacárido que recubre las partículas. El otro anticuerpo monoclonal que se une al fármaco inmunodepresor es parte de un conjugado de biotina. La estreptavidina se conjuga con un segundo grupo de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado a ellas. Las partículas quimioluminiscentes se mezclan con una muestra que se sospecha que contiene el fármaco inmunodepresor y con las partículas fotosensibilizadoras. El medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan al fármaco inmunodepresor, en virtud de la unión de los anticuerpos monoclonales al fármaco inmunodepresor. Después, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que tiene la capacidad, en su estado excitado, de activar el oxígeno hasta un estado de singlete. Debido a que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora en estrecha proximidad del fotosensibilizador en virtud de la presencia del fármaco inmunodepresor, este se activa por el oxígeno de singlete y emite luminiscencia. A continuación, el medio se examina en cuanto a la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada la presencia de la misma a la presencia y/o cantidad del fármaco inmunodepresor en la muestra.

Kits para llevar a cabo los ensayos

45 Los reactivos para llevar a cabo un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar de forma conveniente un ensayo para la determinación de un fármaco inmunodepresor. En un ejemplo, un kit comprende reactivos de combinación empaquetados para analizar el analito, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, uno o más anticuerpos monoclonales en conformidad con los principios descritos en el presente documento, los cuales pueden estar conjugados a un marcador o un soporte. Los reactivos pueden estar, cada uno, en recipientes distintos, o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir adicionalmente otros reactivos empaquetados por separado para llevar a cabo un ensayo, tales como elementos de unión adicionales y reactivos complementarios.

55 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante el presente método y, además, para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias adecuadas, pueden proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo. El kit puede incluir adicionalmente una descripción escrita de un

método en conformidad con las presentes realizaciones, como se describe anteriormente.

La frase "al menos", como se usa en el presente documento, significa que el número de artículos especificados puede ser igual a o mayor que el número indicado. La frase "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa que el número indicado puede diferir en más o menos el 10 %; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5. La designación "primer" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre ninguno de los elementos de un grupo al que pertenece el lenguaje anterior, tal como, por ejemplo, "primer y segundo anticuerpos monoclonales" o "primer anticuerpo monoclonal" y "segundo anticuerpo monoclonal".

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y están destinadas a describir y no a limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes desvelados en el presente documento son en volumen, a menos que se indique otra cosa.

Ejemplos

Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO), a menos que se indique otra cosa. El tacrólimus se obtuvo de Astellas Pharma US, Inc., Deerfield, IL.

El ensayo se llevó a cabo usando el analizador DIMENSION® RxL, disponible de Siemens AG, Newark DE. El instrumento se empleó utilizando un sistema de detección enzimático con formato de inmunoensayo de tipo sándwich. En la realización del método de tipo sándwich utilizado en el presente documento y analizado con más detalle a continuación, la unión entre un anticuerpo (Ac) marcado conjugado con una enzima (conjugado) y el fármaco tacrólimus (TACRO) en muestras de pacientes, y la posterior unión del inmunocomplejo resultante con un anticuerpo de captura sobre partículas de cromó, determinó la cantidad de tacrólimus en las muestras de pacientes. El conjugado de anticuerpo etiqueta-enzima no unido se eliminó automáticamente mediante 3-4 ciclos de mezcla/lavado y separación magnética. Se midió la actividad enzimática del conjugado restante en las partículas de cromó y, fue directamente proporcional a la cantidad de tacrólimus en la muestra del paciente.

Ejemplo 1

Determinación de tacrólimus usando un ensayo de tipo sándwich ACMIA automatizado

Preparación de conjugados de tacrólimus-hemocianina de lapa californiana. A una solución de tacrólimus monooxima (32,3 mg, 36,8 μ mol) en 1,05 ml de dimetilformamida anhidra se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (11 mg, 57,4 μ M, 1,5 equiv.) y N-hidroxisuccinimida (7,3 mg, 63,4 μ M, 1,7 equiv.). La unión fue en la posición C22 de la molécula de tacrólimus. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora en argón. Después, la mezcla se añadió gota a gota a través de una jeringa a una solución de hemocianina de lapa californiana (74 mg, 54 % de pureza) en 5,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (0,1 M, pH 8,0) y 0,25 ml de dimetilformamida. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la suspensión resultante se dializó (1 x 4 l, 4 °C, 2 horas) frente a PBS (solución salina tamponada con fosfato) (10 mM, pH 7,0).

Después se extrajo la mezcla resultante 3 veces con cloruro de metileno para eliminar cualquier cantidad traza de tacrólimus monooxima sin reaccionar. El análisis cuantitativo de la mezcla se llevó a cabo usando solución de ensayo de proteínas de ácido bicinónico (BCA) para proporcionar 50 mg de inmunógeno en 8 ml de PBS (10 mM, pH 7,0).

La determinación del número de haptenos usando el método TNBS (A.F.S.A. Habeeb, Anal. Biochem. 14:328 (1966)) proporcionó un número de haptenos de 1300. El inmunógeno se congeló inmediatamente usando un baño de hielo seco-acetona y se mantuvo a -20 °C para almacenamiento.

Se preparó como sigue una mezcla de inmunógeno conteniendo tres isómeros posicionales de tacrólimus (KLH unido en la posición C32, KLH unido en la posición C24 y KLH unido en las posiciones C32 y C24): se secó al vacío Tacrólimus (301,3 mg) en un matraz de fondo redondeado durante 1,5 horas. Al matraz se le añadió una barra agitadora, succínico anhidro (568,2 mg), 4-(dimetilamino)piridina (46,3 mg), diclorometano (2 ml, anhidro) y piridina (2,093 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (24 °C) en atmósfera de nitrógeno durante 24,5 horas. Fueron productos de esta reacción tres isómeros posicionales: tacrólimus-32-succinato, tacrólimus-24-succinato y tacrólimus-24,32-di-succinato. Una vez detenida la reacción, se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria y el producto se secó adicionalmente mediante una bomba de vacío durante dos horas.

A un vial se añadió la mezcla de tacrólimus-succinato anterior (2,5 mg, 2,8 μ moles), N-hidroxisuccinimida (1,0 mg, 8,7 μ moles) y acetonitrilo anhidro (250 μ l). La mezcla se tapó y se agitó a temperatura ambiente. A la mezcla de agitación se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (3,0 mg, 15 μ moles). El vial se tapó y la mezcla se agitó a

temperatura ambiente.

Después de 2 horas, la mezcla se evaporó a sequedad. El material resultante se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (250 µl). Esta fue la solución de trabajo de FK506-succinato activado.

5 En un vial de 20 ml se añadió una solución de KLH (8 mg) en 8 ml de tampón de fosfato 10 mM, pH 8, y DMF (1,5 ml). La mezcla se enfrió a aproximadamente 4 °C y se añadieron gota a gota con agitación 200 µl de la solución de trabajo anterior a la solución enfriada. La mezcla se agitó durante 16-24 horas a 4 °C y después se diluyó a 30 ml con agua, se desaló con dos filtros CENTRICON® 30 y se reconstituyó con agua reciente 3 veces más. El material final se diluyó a 10 ml con agua. La concentración de proteína se determinó mediante el método de ensayo de proteínas BCA.

10 Preparación de anticuerpos monoclonales frente a tacrólimus. Los anticuerpos monoclonales que se unen a porciones distintas de la molécula de tacrólimus se prepararon como sigue. El inmunógeno fue conjugado de hemocianina de lapa californiana-tacrólimus preparado como se describe anteriormente. Este inmunógeno se usó para inmunizar ratones Balb/c. La primera inmunización fue de 25 µg en un volumen de 200 µl con monofosforil lípido A y adyuvante de dicorinomicolato de trehalosa sintético (Emulsión RIBI MPL+TDM, RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton MT) por vía intraperitoneal. Cinco semanas más tarde se proporcionó una inmunización de refuerzo con 25 µg del inmunógeno en 200 µl de monofosforil lípido A y adyuvante de dicorinomicolato de trehalosa sintético por vía intraperitoneal. Posteriormente, después de otras 8 semanas, se proporcionó un refuerzo prefusión de los 25 µg de inmunógeno en 200 µl de solución salina equilibrada de Hank por vía intravenosa e intraperitoneal.

20 Tres días más tarde, se realizó la fusión por métodos convencionales usando un mieloma murino no secretor denominado P3x63-AG8.653. La clonación se llevó a cabo mediante métodos convencionales.

Los clones se exploraron mediante el siguiente procedimiento de inmunoensayo de ELISA inverso, de acuerdo con el siguiente protocolo. Las placas se recubrieron con IgG anti-ratón policlonal de cabra (IgG+IgA+IgM) (Zymed Laboratories, South San Francisco CA) a 5 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato a 100 µl por pocillo. El recubrimiento de la placa se realizó durante 2 horas o más a temperatura ambiente o durante la noche a aproximadamente 4 °C; las placas se pueden almacenar envueltas en una película a aproximadamente 4 °C durante varios días. Después, las placas se escurrieron con golpecitos y se bloquearon con 300 µl por pocillo de diluyente de tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina al 0,5 %, TWEEN® 20 al 0,05 % en PBS). El bloqueo de las placas se realizó mediante incubación durante 15 minutos o más a temperatura ambiente con agitación de la placa. Después, las placas se secaron escurriéndolas con golpecitos. Después, el anticuerpo monoclonal a explorar se añadió a cada pocillo como sigue: se añadieron por pocillo 50 µl de diluyente de tampón de bloqueo junto con 50 µl de sobrenadante de cultivo por pocillo, transferidos desde el pocillo correspondiente en la placa de cultivo de la fusión. La incubación fue durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La placa se lavó usando un lavador de placas TITERTECK PLUS® con un apilador S20, siendo el tampón de lavado PBS con TWEEN® 20 al 0,05 %. Se añadió a 100 µl por pocillo un conjugado enzimático de tacrólimus acoplado covalentemente a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa diluido en diluyente tampón de bloqueo a 1:4000. La incubación se realizó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después, la placa se lavó y se añadió una solución cromogénica a un volumen de 100 µl por pocillo. La solución cromogénica contenía violeta de p-yodonitrotetrazolio 0,593 mM, NAD 0,02 M, glucosa-6-fosfato 0,033 M, Tris 0,055 M, azida sódica al 0.02 % y una dilución 1:4000 de diaforasa (lipoil deshidrogenasa). La BSA estaba presente al 1 % (vol/vol) de una solución de BSA al 5 % p/vol. Se usó BSA para ayudar a prevenir la precipitación rápida de violeta de p-yodonitrotetrazolio reducido.

De la exploración se seleccionó un hibridoma que producía un anticuerpo monoclonal adecuado. Esto se denominó anticuerpo 14H04.

45 El anticuerpo monoclonal para el tacrólimus denominado 1E2 se preparó de manera similar, usando una mezcla de inmunógeno que tenía KLH enlazado en las posiciones C32, C24 y C32, y C24, de la molécula de tacrólimus, como se describe anteriormente.

50 Preparación de la solución de pretratamiento hemolítico. Esta solución de pretratamiento contenía 5 µg/ml de sirólimus (SIRO), PIPES™ 1,5 sal de sodio 6,8 mg/ml, EDTA disódico 0,3 mg/ml, saponina 1,0 mg/ml, PROCLIN® 300 al 0,2 %, sulfato de neomicina 0,024 mg/ml y NaN3 0,99 mg/ml, pH 6,5. La concentración de SIRO en la mezcla de reacción final fue de 1,1 µg/ml. La Tabla 1 muestra la composición del reactivo de hemólisis para su uso en la hemolización de una porción de una muestra de sangre entera para el ensayo de Tacrólimus (CI = como se indica). Col es colesterol y Trig es triglicérido.

Tabla 1

Nombre	Cant. (por ml)	Función
Sirólimus	5 µg	disocia FK506 de la proteína de unión
Azida sódica	0,99 mg	mitigación del efecto de matriz
PIPES™ 1,5 sal sódica	6,8 mg	tampón
EDTA disódico dihidrato	0,3 mg	prevención de la formación de coágulos
Saponina	1 mg	lisis de células sanguíneas
PLURONIC® 25R2	0,9 mg	interferencia de col/Trig
PROCLIN® 300	0,4 mg	conservante
sulfato de neomicina	0,024 mg	conservante

5 Preparación del conjugado F(ab')₂ anti-tacrólimus-β-galactosidasa usando el clon 14H04. El anticuerpo monoclonal anti-tacrólimus 14H04 (preparado como se describe anteriormente) se fragmentó a F(ab')₂ usando digestión con lisil-endopeptidasa (Wako, Richmond, VA) y después se conjugó con β-galactosidasa usando un enlazador de SMCC (trans-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) heterobifuncional convencional, de acuerdo con técnicas conocidas. La solución de conjugado de anticuerpo contenía conjugado de anticuerpo anti-tacrólimus-β-galactosidasa aproximadamente a 2,0 g/ml, proteasa sin seroalbúmina bovina 30 mg/ml, MgCl₂ 0,126 mg/ml, etilenglicol 0,03 ml/ml, HEPES 24,5 mg/ml, HEPES Na 38,5 mg/ml, NaCl 50 mg/ml y muteína de beta-gal (beta-galactosidasa inactivada), pH 7,8.

10 Preparación de partículas magnético de cromo. Se prepararon partículas de cromo (fase sólida del inmunoensayo) conjugando anticuerpo monoclonal anti-tacrólimus 1E2 (preparado como se describe anteriormente) con partículas de dióxido de cromo recubiertas con glutaraldehído. El reactivo de cromo contiene partículas de cromo y trehalosa dihidrato 60,4 mg/ml, y polietilenglicol (PEG) 8000 7,2 mg/ml. En el estudio se usaron tres concentraciones de partículas de cromo, en concreto 5, 2,5 y 1,67 mg/ml.

15 Ensayo de tacrólimus de tipo sándwich. El principio y la operación del ensayo de tipo sándwich para el tacrólimus es como sigue: se combinó una muestra de sangre entera (50 µl) que contenía tacrólimus con un reactivo de pretratamiento hemolítico preparado como se describe anteriormente, en un recipiente de reacción en el analizador DIMENSION® RxL. La muestra de sangre entera se tomó de un vaso convencional mezclando en primer lugar la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de pretratamiento garantizaba la hemólisis de la sangre entera y el desplazamiento de las moléculas de tacrólimus unidas a proteína de sus sitios de unión.

25 El conjugado de F(ab')₂ anti-tacrólimus-β-galactosidasa preparado usando el clon del anticuerpo 14H04 (50 µl) se añadió a los recipientes de reacción y la mezcla se mantuvo durante un período (35 segundos) y a una temperatura de 43 °C para permitir que el tacrólimus, si estaba presente, reaccione con el conjugado de enzima-anticuerpo. Se añadieron las partículas de cromo con anticuerpo monoclonal 1E2 inmovilizado (50 µl) a los recipientes de reacción y se les permitió unirse al complejo F(ab')₂ de 14H04 frente a tacrólimus-β-galactosidasa para formar el sándwich cromo-Ac 1E2::tacrólimus::Ac 14H04. Esta mezcla de reacción se incubó durante 14 minutos a una temperatura de 43 °C, antes de que comiencen los ciclos automatizados de separación magnética, mezcla y lavado en el instrumento Dimension. Se emplearon un total de 4 ciclos de separación/lavado para eliminar el conjugado de F(ab')₂ anti-tacrólimus-β-galactosidasa y los residuos de la muestra. Los lavados automatizados de cromo se llevaron a cabo en el aparato utilizando la solución de Chemistry Wash a pH 8,0 en tampón HEPES, que se proporcionaron al módulo de inmunoensayo heterogéneo DIMENSION®. Después, las partículas de cromo lavadas se resuspendieron en la solución Chemistry Wash por mezcla por ultrasonido y una porción (54 µl) de las partículas de cromo suspendidas se transfirieron a una cubeta fotométrica para mezclar con una solución de sustrato de β-galactosidasa (rojo de clorofenol-β-D-galactopiranosido o CPRG). El tacrólimus unido al conjugado de F(ab')₂ de 14H04 anti-tacrólimus-β-galactosidasa en la superficie de la partícula de cromo se detectó midiendo la velocidad enzimática del conjugado en presencia de CPRG. La velocidad para cada recipiente de reacción se midió bicromáticamente a 577 y 700 nm. Las curvas de respuesta a la dosis de la señal del inmunoensayo de tipo sándwich para tacrólimus se representan en Fig. 3.

40 Ejemplo 2

Determinación de tacrólimus usando el ensayo de ELISA de tipo sándwich automatizado

45 Preparación del conjugado de anticuerpo anti-tacrólimus-β-galactosidasa usando el clon 1E2. Se derivatizó un anticuerpo monoclonal anti-tacrólimus de ratón, clon 1E2 (preparado como se describe anteriormente) con el enlazador heterobifuncional SMCC (succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (EMD Biosciences, Inc., La Jolla CA) en un medio compuesto de fosfato de sodio 10 mM, pH 6,7 con cloruro de sodio 300 mM añadido. Después de permitir que la reacción de derivatización progresara durante 60 minutos a 25 °C, el anticuerpo activado con maleimida resultante se volvió a purificar mediante cambio de tampón en el medio anterior, para eliminar el

enlazador sin reaccionar y la N-hidroxisuccinimida libre, seguido de un ajuste de la concentración a 1,0 mg/ml.

Después se disolvió enzima β -Galactosidasa producida de forma recombinante a partir de *E. coli* (Roche Diagnostics, Indianapolis IN) a una concentración de 1,0 mg/ml, en el mismo medio de fosfato/cloruro sódico, en el que se mezcló el anticuerpo activado con maleimida a relación molar de anticuerpo:enzima de 1:1. La mezcla se agitó suavemente a 25 °C mientras la generación de especies de conjugado a lo largo del tiempo se controlaba mediante cromatografía usando una columna de ZORBAX® GF-450 de 9,4 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara CA). La reacción de conjugación se inactivó cuando se generaron pequeñas cantidades de conjugado de bajo peso molecular. Esta inactivación se realizó mediante la adición a la mezcla de reacción de cantidades suficientes de N-etilmaleimida (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL) e hidrazina. La mezcla de reacción inactivada se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros, concentrada a aproximadamente 15 mg de proteína total/ml. Después, la mezcla se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño semipreparativa usando una columna de HPLC BIOSEP™-SEC-S-4000 de 21,2 x 300 mm (Phenomenex, Torrance CA), usando el mismo medio de reacción de conjugación de fosfato/cloruro de sodio que la fase móvil. Se combinaron las fracciones que contenían el material conjugado del peso molecular deseado. Después, el conjunto de los productos conjugados se diluyó para su uso.

15 Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich para tacrólimus. Se emplean las siguientes etapas: Etapa 1: Se recubrieron 50 μ l de 14H04 purificado (preparado como se describe anteriormente) (10 μ g/ml en PBS) en placas de ELISA durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron usando agua MilliQ que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %. Etapa 2: Se añadieron a cada pocillo 200 μ l de solución PCT Blocker (caseína al 0,5 % (proteína de leche) en tampón de fosfato que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %) y se incubaron los medios a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las placas se lavaron usando agua MilliQ que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %. Etapa 3: Se añadieron a los respectivos pocillos 50 μ l de la concentración deseada de fármaco (FK506) diluido en PBS y los medios se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las placas se lavaron usando agua MilliQ que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %. Las concentraciones del fármaco tacrólimus (TACR) analizadas fueron 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,50, 5,0 y 10,0 ng/ml, respectivamente. Etapa 4: Se añadió el conjugado anticuerpo monoclonal 1 E2- β -galactosidasa (preparado de una manera similar a la descrita anteriormente) (diluido 1:300 en solución PCT Blocker) y los medios se incubaron a temp. ambiente durante 30 minutos. Las placas se lavaron usando agua MilliQ que contenía TWEEN® 20 al 0,05 %. Etapa 5: Se añadió a cada pocillo solución de sustrato de β -galactosidasa (rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido o CPRG) (100 μ l/pocillo). Etapa 6: Los pocillos se leyeron en un lector de placas a 577 nm por minuto durante 20 minutos. Los resultados se resumen en la Fig. 4, donde la señal de ELISA está en unidades de miliabsorbancia (UmA).

35 Estudios de control para descartar la unión no específica. Los estudios de control para descartar la unión no específica se llevaron a cabo en las condiciones experimentales descritas anteriormente. En un estudio, se recubrió el anticuerpo monoclonal 14H04 en una placa de ELISA, que luego se lavó. Se añadieron tacrólimus y conjugado de anti-tacrólimus 14H04 F(ab')₂- β -galactosidasa, y las mezclas resultantes se incubaron y lavaron como anteriormente. En un segundo estudio, se recubrió el anticuerpo monoclonal 1E2 en una placa de ELISA, que luego se lavó. Se añadieron tacrólimus y conjugado de anti-tacrólimus 1E2- β -galactosidasa, y las mezclas resultantes se incubaron y lavaron como anteriormente. En un tercer estudio, no se recubrió anticuerpo monoclonal de captura en la placa de ELISA, pero se añadieron el fármaco tacrólimus y cualquiera de los conjugados de anticuerpos monoclonales anteriores, con el lavado e incubación posteriores, como se describió anteriormente. Para todos estos estudios de control, después de añadir la solución de sustrato de la β -galactosidasa no se detectó señal de ELISA con las lecturas en el lector de placas a 577 nm en el período de lectura de 20 minutos. Estos resultados indican que no se formó sándwich en las condiciones establecidas.

45 Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y de ejemplos con fines de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la materia, a la luz de las enseñanzas de la presente invención, que pueden hacerse determinados cambios y modificaciones de la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, la descripción anterior, con fines explicativos, usó nomenclatura específica para proporcionar una comprensión más exhaustiva de la invención. Sin embargo, resultará obvio para el experto en la materia que no se requieren los detalles específicos para practicar la invención. De este modo, las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se presentan con fines ilustrativos y descriptivos; no tienen por objeto ser exhaustivas o limitar la invención a las formas precisas desveladas. Son posibles muchas modificaciones y variaciones a la vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se escogieron y describieron para explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y, de este modo, permitir utilizar la invención a otros expertos en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar tacrólimus en una muestra que se sospecha que contiene tacrólimus, comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

5 (i) la muestra,

(ii) un primer anticuerpo monoclonal para tacrólimus obtenido en ratones productores de anticuerpos y asociado a partículas magnéticas, y

10 (iii) un segundo anticuerpo monoclonal para tacrólimus obtenido en ratones productores de anticuerpos, y en donde el segundo anticuerpo monoclonal se une a una porción de tacrólimus distinta de la porción a la que se une el primer anticuerpo monoclonal a tacrólimus y en donde el segundo anticuerpo monoclonal está asociado a una enzima,

(b) incubar el medio en condiciones para la unión a tacrólimus del primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo, y

15 (c) examinar el medio en cuanto a la presencia de un inmunocomplejo que comprende tacrólimus, el primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal, indicando la presencia y/o cantidad del inmunocomplejo la presencia y/o cantidad de tacrólimus en la muestra.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo monoclonal se une a una porción de tacrólimus que consiste esencialmente en el anillo C29-C34, que incluye los sustituyentes metoxi e hidroxilo, y C15, que incluye el sustituyente metoxi, y en donde el segundo anticuerpo monoclonal se une a una porción del tacrólimus que consiste esencialmente en el metoxi del anillo C10-C14 y C19-C27 del anillo de C1-C26, que incluye el hidroxilo de C25 y el cetoxígeno de C22.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo monoclonal es 14H04 y el segundo anticuerpo monoclonal es 1E2.

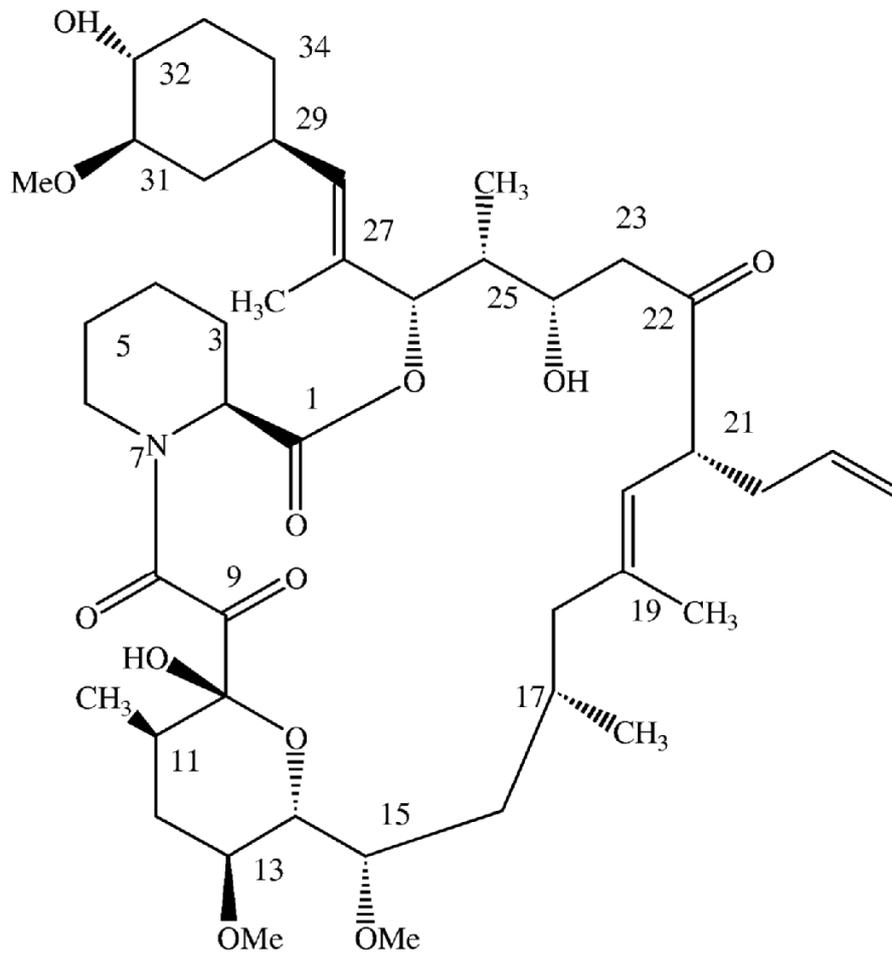


FIG. 1

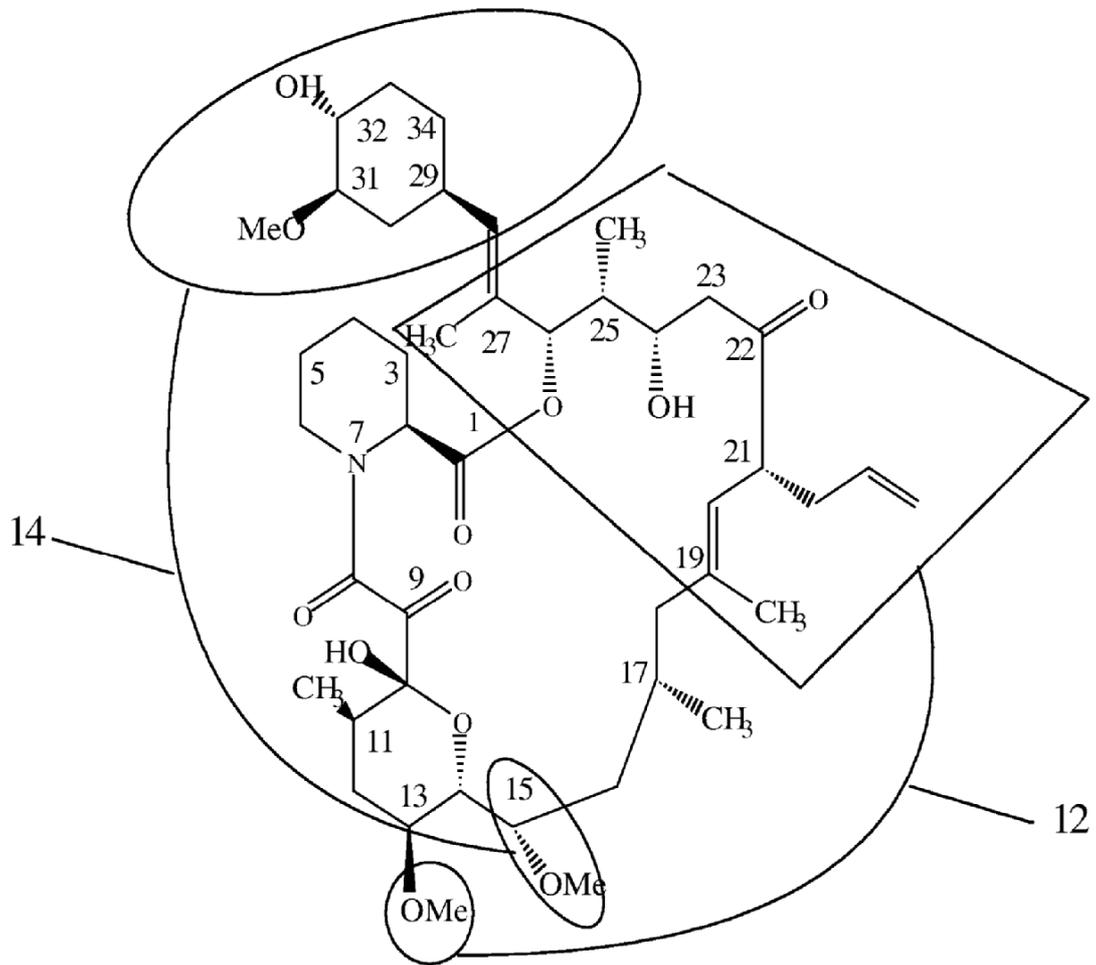


FIG. 2

**Curvas de respuesta a la dosis de señal de fármaco
Inmunoensayo de tipo sándwich de tacrólimus**

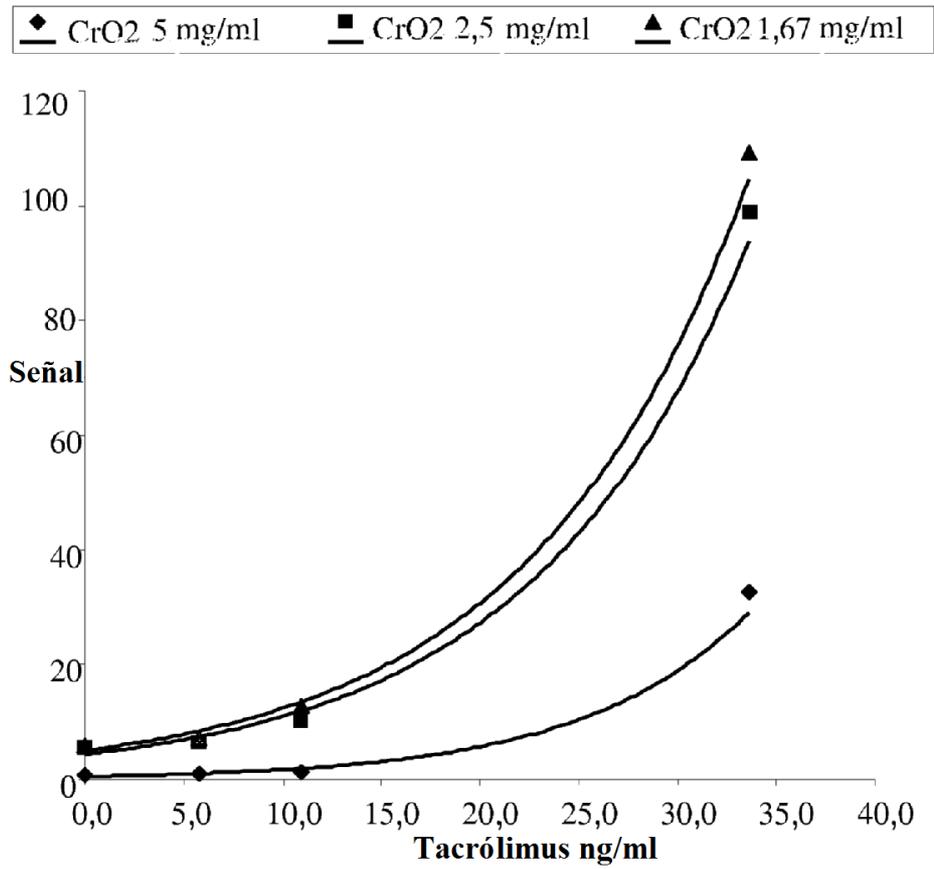


FIG. 3

**Curva de respuesta a la dosis de tacrólimus
en el ensayo de ELISA de tipo sándwich**

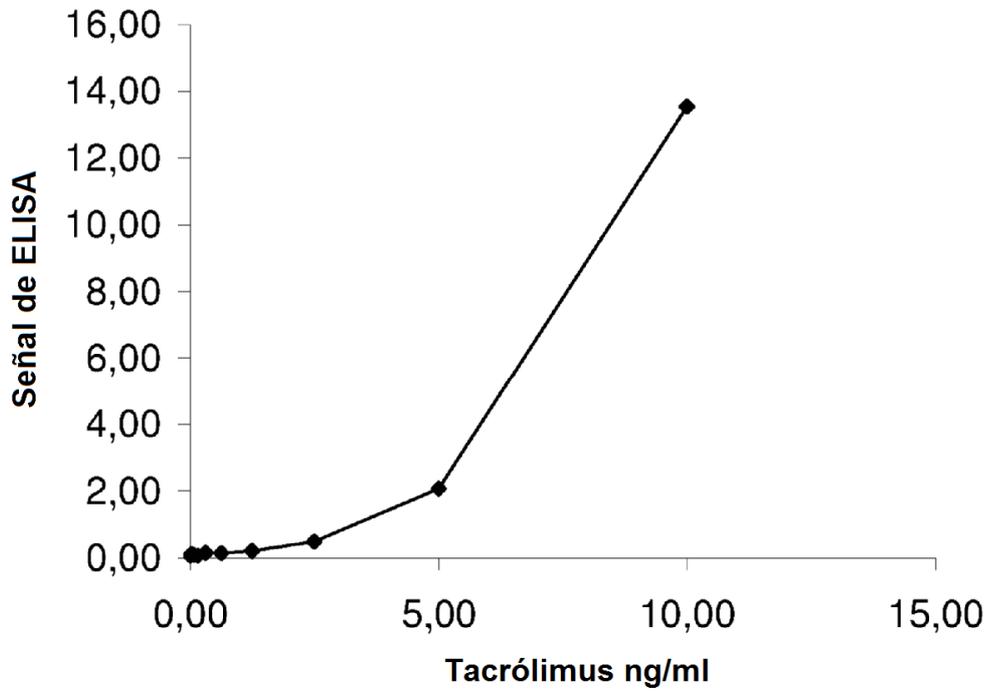


FIG. 4