

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 025**

51 Int. Cl.:

C07D 237/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013 PCT/US2013/072716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14088987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 13860740 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2928872**

54 Título: **Compuestos y métodos para la determinación de fármacos inmunosupresores de unión a FKBP**

30 Prioridad:

04.12.2012 US 201213693229

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

18.09.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YI FENG y
WEI, TIE Q.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 682 025 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

Compuestos y métodos para la determinación de fármacos inmunosupresores de unión a FKBP

Antecedentes

5 La invención se refiere a compuestos, métodos y kits para la determinación de fármacos inmunosupresores que se unen a FKBP, tales como compuestos de sirolimus y compuestos de tacrolimus, en muestras, tales como muestras de pacientes, que se sabe o se sospecha que contienen tales fármacos inmunosupresores de unión a FKBP.

10 El cuerpo se basa en un sistema de respuesta inmune complejo para distinguir lo propio de lo no propio. A veces, el sistema inmunitario del cuerpo debe controlarse 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. Los medicamentos inmunosupresores se administran 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. Dichos derivados incluyen, por ejemplo, everolimus.

20 Los efectos secundarios asociados con algunos medicamentos inmunosupresores se pueden controlar en parte controlando cuidadosamente el nivel del fármaco presente en un paciente. Debido a que la distribución y el metabolismo de los fármacos inmunosupresores puede variar mucho entre los pacientes y debido al amplio rango y gravedad de las reacciones adversas, se recomienda una monitorización precisa del nivel del fármaco (monitorización terapéutica del medicamento o TDM) en todos los pacientes que reciben fármacos inmunosupresores, especialmente pacientes pediátricos. y aquellos pacientes con insuficiencia hepática. La TDM también se recomienda cuando se coadministran potentes inductores o inhibidores de la enzima CYP3A4. Además, si el sirolimus o su derivado se administra concomitantemente con ciclosporina, se recomienda la TDM porque la farmacocinética se altera durante la administración concomitante de medicamentos. Por ejemplo, si el sirolimus se administra concomitantemente con ciclosporina en lugar de administrarse con cuatro horas de diferencia, los niveles valle de sirolimus aumentan. Por esta razón, además de limitar ciertos efectos secundarios, la TDM debería permitir mejores resultados clínicos en casos seleccionados.

30 El sirolimus y el tacrolimus son los fármacos inmunosupresores más importantes para el trasplante de órganos en humanos. La monitorización terapéutica de las concentraciones de sirolimus, tacrolimus y otros fármacos inmunosupresores relacionados en sangre es necesaria para optimizar los regímenes de dosificación para asegurar una inmunosupresión máxima con una toxicidad mínima. Aunque el sirolimus y el tacrolimus son agentes inmunosupresores altamente efectivos, su uso debe manejarse con cuidado debido a que el rango de dosis efectivo es estrecho y la dosificación excesiva puede provocar efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosis muy baja de sirolimus o tacrolimus puede provocar el rechazo del tejido.

35 Muchos análisis de sangre entera para fármacos inmunosupresores tales como, por ejemplo, compuestos de sirolimus y compuestos de tacrolimus, requieren un paso usando reactivos para extraer (liberar o desplazar) el fármaco de los constituyentes de la sangre. Las estructuras químicas de sirolimus y tacrolimus se muestran en la figura 1. Estas moléculas, que tienen una porción de sus respectivas estructuras químicas en común, se unen a sustancias de unión específicas endógenas tales como, por ejemplo, proteínas de unión específicas endógenas, por ejemplo, proteínas de unión FK (FKBP). Las moléculas del fármaco sirolimus o tacrolimus y las moléculas del metabolito del fármaco, si es necesario, deben disociarse de las sustancias de unión endógenas, particularmente para realizar ensayos para estas sustancias. Es importante tener un reactivo de liberación para competir con los fármacos inmunosupresores de unión a FKBP por la unión a las sustancias de unión endógenas y liberar de ese modo las moléculas de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP libres para la detección en un ensayo. La liberación de moléculas de fármaco inmunosupresor de unión libre de FKBP da como resultado una mejor sensibilidad del ensayo. Sirolimus y el éster FK-506 (FKE) se han usado como reactivos de liberación para un ensayo de tacrolimus para liberar compuestos de tacrolimus de proteínas de unión endógenas. Sin embargo, el éster de FK-506 ha mostrado reactividad cruzada con anticuerpos usados en ensayos de tacrolimus. Además, el uso de sirolimus como reactivo de liberación es problemático debido a problemas de arrastre cuando los inmunoensayos de sirolimus y tacrolimus se llevan a cabo en el mismo instrumento uno tras otro.

El documento WO 2009/020468 A2 describe métodos de diagnóstico para medir los niveles de fármacos inmunosupresores o derivados de los mismos en los que se mejora la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo en una muestra. La muestra se combina en un medio con un agente de biodisponibilidad para el fármaco y se incuba. El agente de biodisponibilidad comprende un detergente iónico que comprende una cadena de al menos 10 átomos de carbono o un detergente no iónico que comprende una cadena de al menos 15 unidades repetidas de óxido de etileno. Preferiblemente, se agrega al medio al menos un anticuerpo para el fármaco hidrófobo.

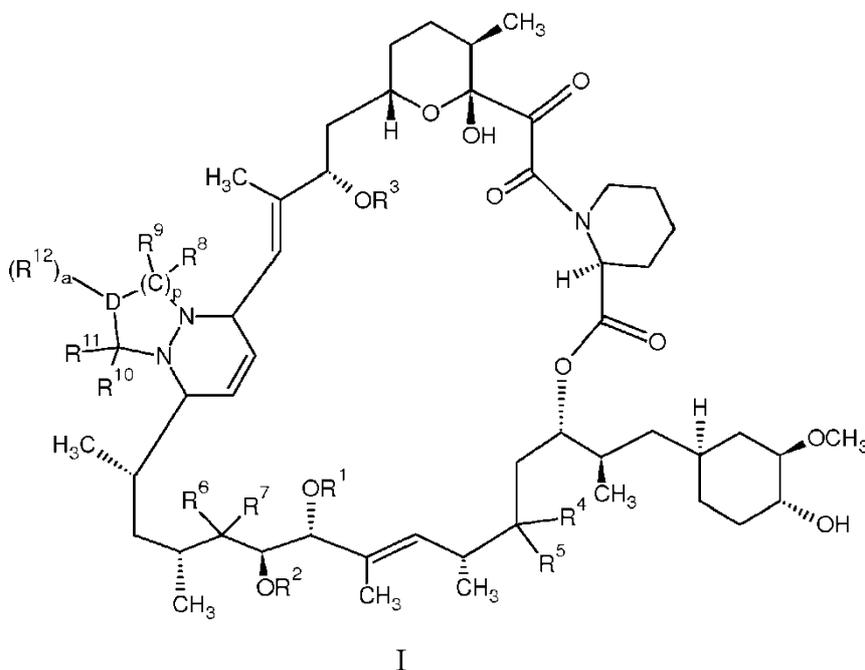
En el método para la detección de fármacos hidrófobos como se describe en el documento WO 2009/079374 A1, una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco se combina en un medio con un agente para liberar el fármaco y sus metabolitos de unidades estructurales de unión endógenas y con una agente de solubilidad selectiva, y se incuba. El agente de solubilidad selectivo mejora la biodisponibilidad del fármaco hidrófobo con respecto a la de los metabolitos en el medio. Es un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, como etilenglicol, glicerol, 1-metoxi-2-propanol, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona o dimetilformamida.

Existe, por lo tanto, una necesidad continua de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos, precisos y sensibles para medir los niveles de fármacos inmunosupresores de unión a FKBP en pacientes. Los métodos deben emplear un agente de liberación para los fármacos inmunosupresores de unión a FKBP que tenga una mínima reactividad cruzada con un miembro de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que se emplea en un ensayo para el fármaco.

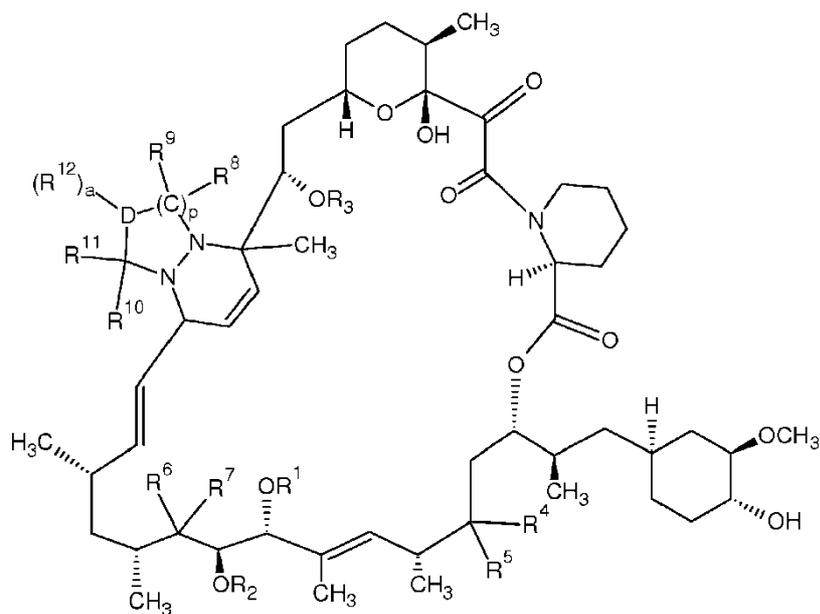
Resumen

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se refieren al uso de composiciones para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. El fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus o un derivado del mismo, en donde los derivados de rapamicina y de tacrolimus son derivados preparados por esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida. Los derivados de rapamicina y de tacrolimus también incluyen compuestos que resultan de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces.

La composición comprende en un medio regulado un compuesto de la fórmula I:



o un compuesto de la fórmula II:



II

o una mezcla de los mismos,

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

- 5 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

- 10 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

- 15 p es 1, 2 o 3;

a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O.

- 20 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, las composiciones anteriores para liberar un fármaco inmunosupresor rapamicina tacrolimus, o un derivado de los mismos de unión a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas comprenden un compuesto de fórmula III:

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

5 R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

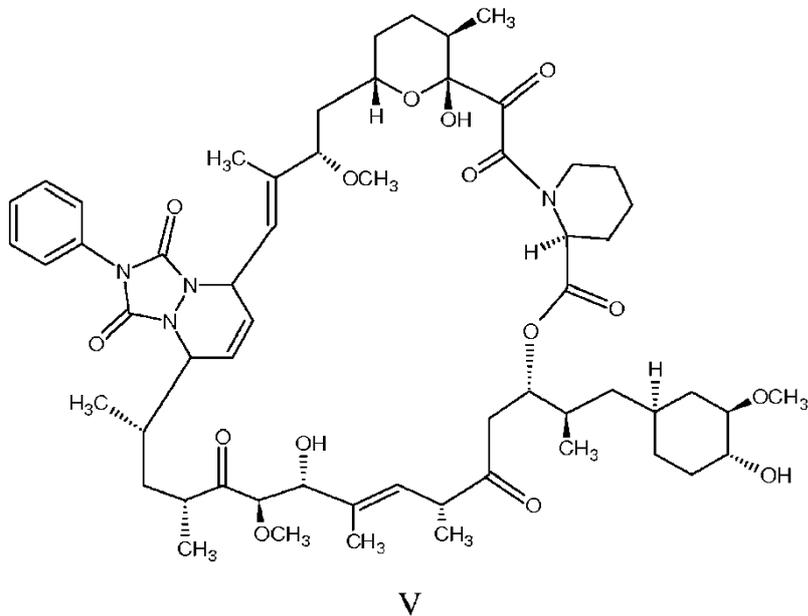
en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

p es 1, 2 o 3;

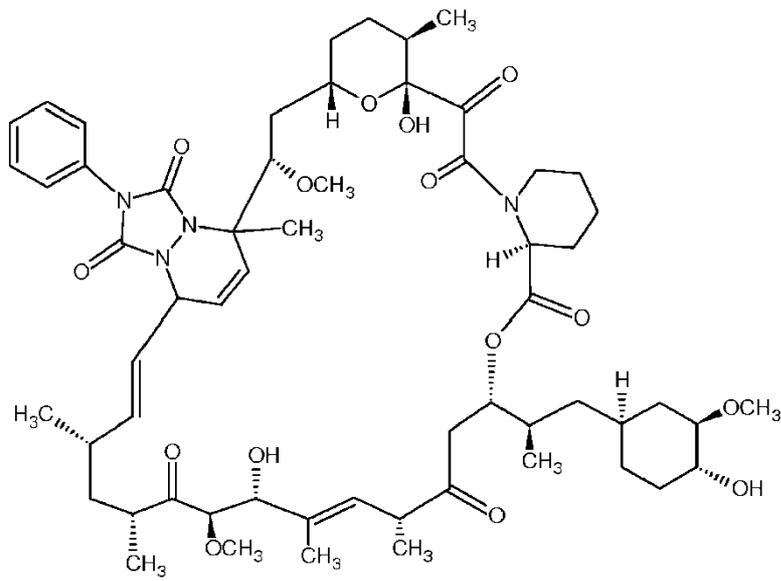
a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O.

10 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, las composiciones anteriores para liberar un fármaco inmunosupresor rapamicina, tacrolimus, o un derivado de los mismos que se une a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas comprenden un compuesto de la fórmula V:



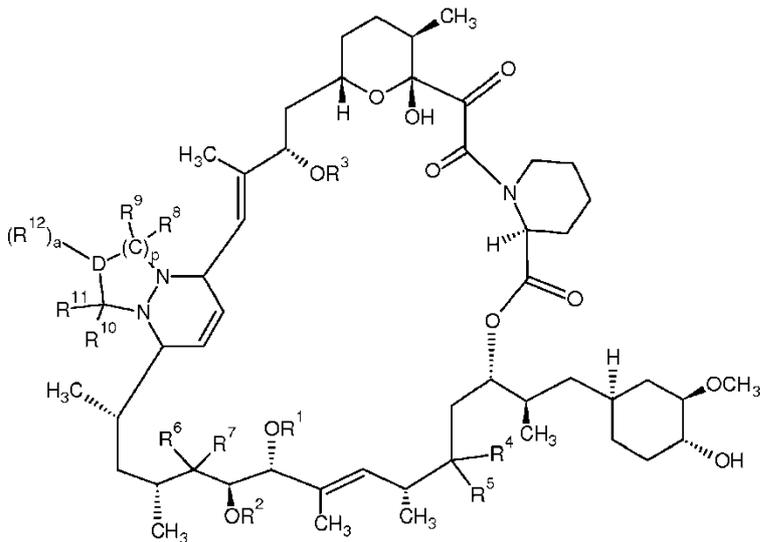
o un compuesto de la fórmula VI:



VI

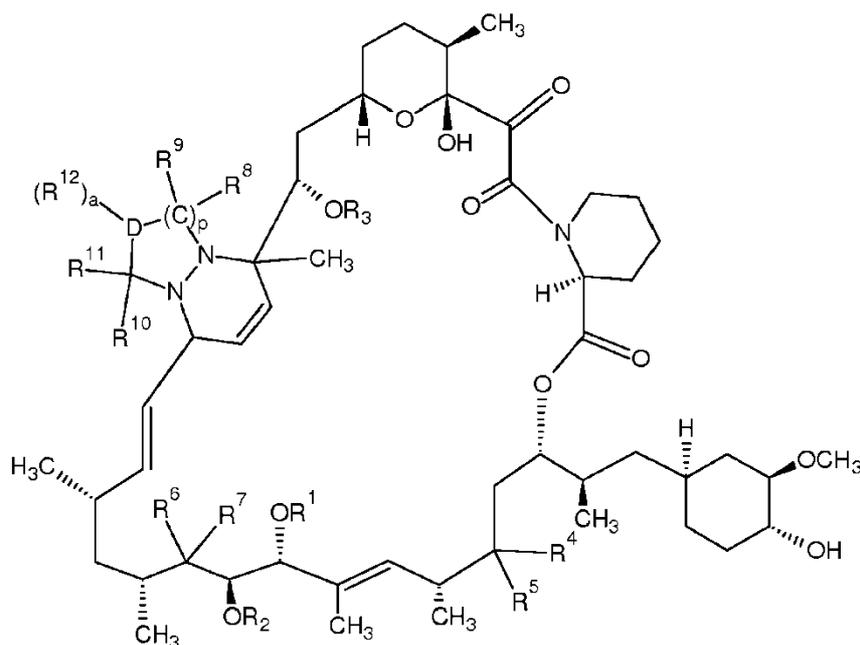
o una mezcla de los mismos

- Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos para liberar un fármaco inmunosupresor rapamicina, tacrolimus o un derivado de los mismos de unión a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas en una muestra sospechosa de contener el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP.
- 5 Los derivados de rapamicina y de tacrolimus son derivados preparados por esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida. Los derivados de rapamicina y de tacrolimus también incluyen compuestos que resultan de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces. Se proporciona una combinación que comprende la muestra y, en una cantidad suficiente para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas,
- 10 un compuesto de la fórmula I:



I

o un compuesto de la fórmula II:



II

o una mezcla de los mismos,

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

5 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

10 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

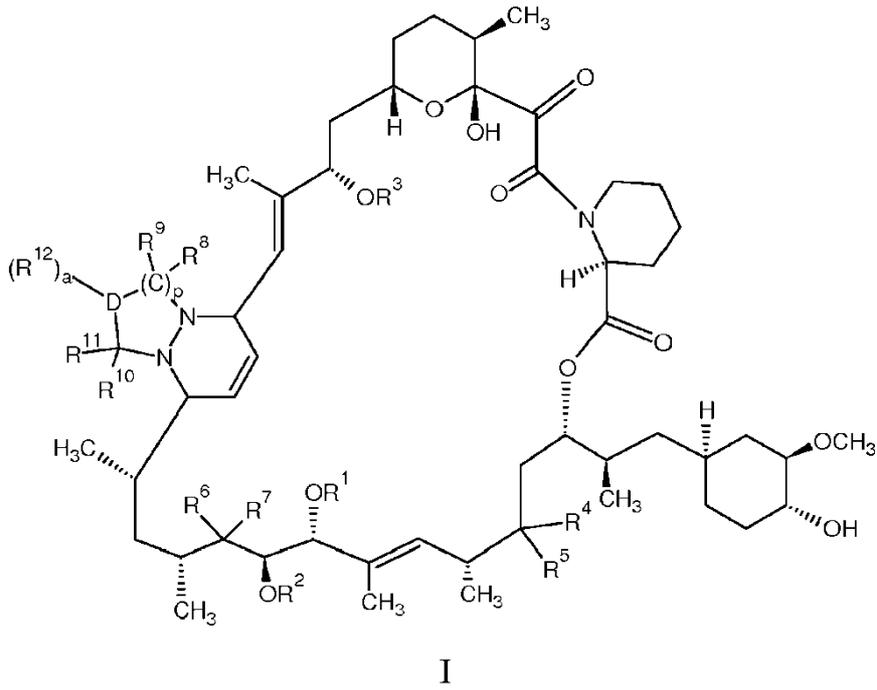
en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

15 p es 1, 2 o 3;

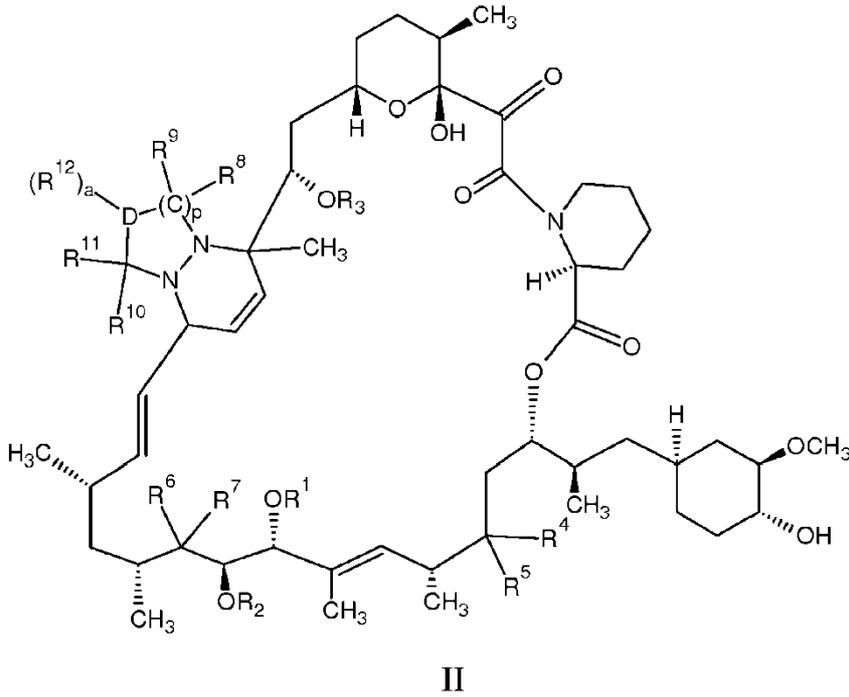
a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O. La combinación se incuba en condiciones suficientes para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de las sustancias de unión endógenas.

20 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se dirigen a métodos para determinar uno o ambos de la presencia y la cantidad de un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en una muestra sospechosa de contener fármaco inmunosupresor que se une a FKBP, en la que el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus, o un derivado del mismo. Los derivados de rapamicina y de tacrolimus son derivados preparados por esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida. Los derivados de rapamicina y de tacrolimus también incluyen compuestos que resultan de
25 la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces. En el método, se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra y un agente de liberación para liberar fármacos inmunosupresores de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas. El agente de liberación es un compuesto de la fórmula I:



o de la fórmula II:



o una mezcla de los mismos;

5 en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

10 R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

5 R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

p es 1, 2 o 3;

a es 0 o 1; y

10 D es N, O o CH, con la condición de que a sea 0 cuando D es O. El medio se incubaba en condiciones para liberar fármacos inmunosupresores que se unen a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas. Los reactivos para determinar la presencia y/o la cantidad de los fármacos inmunosupresores de unión a FKBP en la muestra se añaden al medio. Los reactivos comprenden al menos un miembro de unión específico para un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. El medio se examina para detectar la presencia de un complejo que comprende un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP y el miembro de unión específico para sirolimus o tacrolimus. La presencia y/o
15 cantidad del complejo es indicativa de la presencia y/o cantidad de fármacos inmunosupresores que se unen a FKBP en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación de la fórmula química de sirolimus.

La Fig. 2 es una representación de la fórmula química de tacrolimus.

20 La Fig. 3 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos empleados en las composiciones y métodos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos empleados en las composiciones y métodos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

25 La Fig. 5 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos empleados en las composiciones y métodos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Fig. 6 representa compuestos que no están de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, pero que se proporcionan con fines de comparación.

La Fig. 7 representa un compuesto que no está de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, pero que se proporciona con fines de comparación.

30 Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión General

35 Se describen composiciones para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, en donde el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus o un derivado del mismo. Las composiciones incluyen derivados de sirolimus que están modificados con un radical orgánico voluminoso en la porción trieno de la molécula de sirolimus. Las composiciones pueden emplearse junto con ensayos para un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco.

40 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se refieren a compuestos de fórmula I y fórmula II, a compuestos de fórmula III y fórmula IV y a compuestos de fórmula V y fórmula VI. Los compuestos se pueden emplear para liberar un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas que pueden estar presentes en una muestra. El fármaco inmunosupresor de unión a FKBP liberado puede detectarse entonces en un ensayo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. Los compuestos de fórmula I, fórmula II, fórmula III, fórmula IV, fórmula V y fórmula VI como agentes de liberación exhiben una mínima reactividad cruzada con un miembro de unión específica para un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que se emplea en
45 dicho ensayo. Por lo tanto, tal ensayo proporciona una determinación más precisa de la presencia y/o cantidad de un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en una muestra sin la necesidad de separación del agente de liberación de un medio que comprende la muestra antes de realizar un ensayo. En algunos ejemplos, la función de liberación y un

ensayo pueden realizarse en el mismo medio sin separación del fármaco desplazado de un medio que comprende el agente de liberación.

Algunos ejemplos de compuestos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento tienen la capacidad de desplazar más de un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas. En algunos ejemplos, se puede emplear un compuesto de fórmula I, fórmula II, fórmula III, fórmula IV, fórmula V o fórmula VI, o una mezcla de dos o más de tales compuestos, para desplazar un compuesto de sirolimus de sustancias de unión endógenas o desplazar un compuesto de tacrolimus de sustancias de unión endógenas, por ejemplo. Es decir, en algunos ejemplos, el mismo compuesto de los compuestos mencionados anteriormente se puede emplear como un agente de liberación en ensayos separados para dos o más fármacos inmunosupresores de unión a FKBP diferentes, o para tres o más fármacos inmunosupresores de unión a FKBP diferentes, por ejemplo. En un ejemplo particular, el mismo compuesto de los compuestos mencionados anteriormente se puede emplear como un agente de liberación en ensayos separados para compuestos de sirolimus y compuestos de tacrolimus.

En todas las circunstancias anteriores en donde el mismo agente de liberación de acuerdo con los principios descritos en este documento se emplea en ensayos para más de un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, el agente de liberación muestra una unión o reactividad cruzada mínima con los diferentes miembros de unión específica empleados en los ensayos para los diferentes fármacos inmunosupresores. La expresión "unión mínima" o "reactividad cruzada mínima" significa que la unión del agente de liberación al miembro de unión específica empleado en un ensayo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es suficientemente baja, de modo que tal unión o reactividad cruzada tiene un efecto insignificante sobre la precisión del ensayo. La unión del agente de liberación al miembro de unión específico no da como resultado un aumento o disminución significativo en la señal obtenida en un ensayo para el fármaco. En algunos ejemplos, la unión del agente de liberación a un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es menor que aproximadamente 5%, o menor que aproximadamente 4%, o menor que aproximadamente 3%, o menor que aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1%, o menos de aproximadamente 0.5%.

La expresión "sustancias de unión endógenas" se refiere a sustancias que se originan y están presentes en una muestra por analizar donde las sustancias se unen a un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. Las sustancias de unión endógenas incluyen sustancias de unión específicas endógenas, por ejemplo, proteínas de unión específica tales como, por ejemplo, FKBP. El término "FKBP" se refiere a proteínas de unión a FK o proteínas de unión a FK-506 que incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, FKBP12, inmunofilinas y glicoproteínas ácidas α 1, por ejemplo. Las FKBP son proteínas endógenas que se unen tanto a compuestos de sirolimus como a compuestos de tacrolimus, por ejemplo.

La expresión "fármaco inmunosupresor que se une a FKBP" se refiere a fármacos inmunosupresores que se unen específicamente a FKBP que incluyen FKBP12, otras FKBP, inmunofilinas y glicoproteínas ácidas α 1, por ejemplo. Los fármacos inmunosupresores que se unen a FKBP incluyen compuestos de sirolimus y compuestos de tacrolimus.

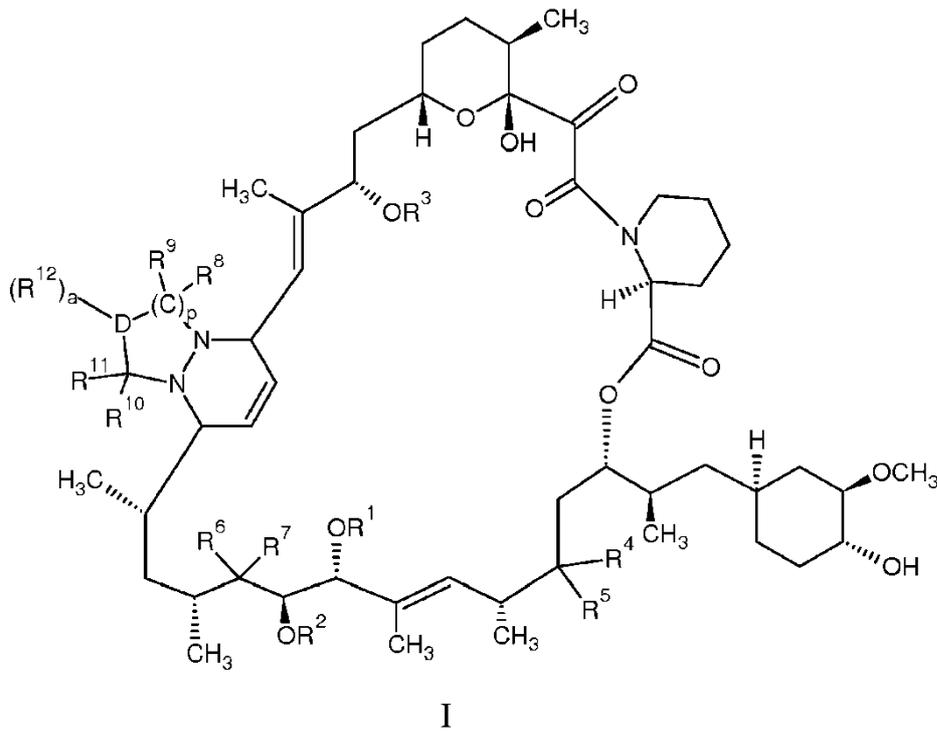
El término "compuesto(s) de sirolimus" como se usa en el presente documento significa rapamicina y sus derivados, otros miembros de la familia de sirolimus y sus derivados, que incluyen, por ejemplo, ésteres, amidas, haloacetamidas e imidas en una o más posiciones de la molécula de sirolimus. Los derivados de sirolimus incluyen, por ejemplo, everolimus. Los derivados de rapamicina incluyen compuestos que contienen un núcleo de rapamicina, metabolitos de rapamicina y compuestos de rapamicina abiertos en el anillo. Los derivados de rapamicina también incluyen derivados preparados a través de la esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida, por ejemplo. Los derivados de rapamicina también incluyen compuestos resultantes de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces.

El término "compuesto(s) de tacrolimus" como se usa en el presente documento se refiere a FK-506 y sus derivados, otros miembros de la familia tacrolimus y sus derivados, que incluyen, por ejemplo, ésteres, amidas, haloacetamidas e imidas en uno o más posiciones de la molécula de tacrolimus. Los derivados de tacrolimus incluyen compuestos que contienen un núcleo de tacrolimus, metabolitos de tacrolimus y compuestos de tacrolimus de anillo abierto. Los derivados de tacrolimus también incluyen derivados preparados a través de la esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida, por ejemplo. Los derivados de tacrolimus también incluyen compuestos resultantes de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o la reducción de uno o más de los dobles enlaces.

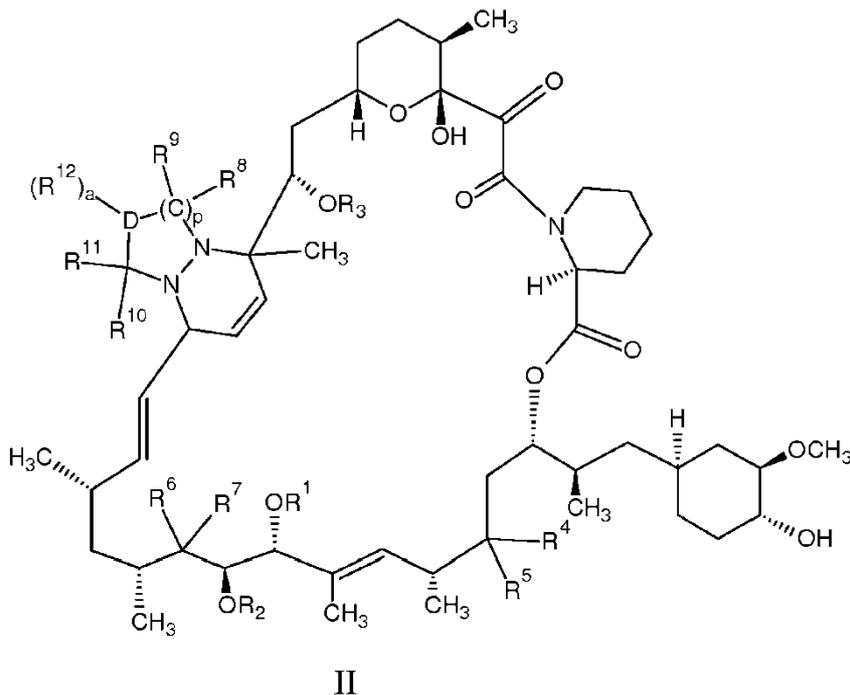
La expresión "reactividad cruzada mínima con un miembro de unión específico para un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP" significa que el agente liberador no interfiere en ningún grado significativo con la exactitud y sensibilidad de un ensayo para el fármaco uniéndose al miembro de unión específica para el fármaco. La unión del

agente de liberación a dicho miembro de unión específica es menor que aproximadamente 1%, o menor que aproximadamente 0.5%, o menor que aproximadamente 0.2%, o menor que aproximadamente 0.1%, por ejemplo.

5 Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a composiciones para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra sospechosa de contener el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, en donde el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus o un derivado de los mismos. La composición comprende en un medio regulado un compuesto de la fórmula I:



o un compuesto de la fórmula II:



10

o una mezcla de los mismos;

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

5 R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

10 R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

p es 1, 2 o 3;

a es 0 o 1; y

15 D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O.

El término "hidrocarbilo" se refiere a un radical orgánico que consiste únicamente en carbono e hidrógeno. Un grupo hidrocarbilo puede ser insaturado o puede contener uno o más dobles enlaces carbono-carbono o uno o más triples enlaces carbono-carbono o una mezcla de los mismos. El término "hidrocarbilo" incluye alquilo, alqueno y alquino.

20 La expresión "radical orgánico voluminoso" se refiere a un radical orgánico que exhibe un gran tamaño molecular para su peso. El radical orgánico voluminoso dificulta la capacidad de un miembro de unión específico para unirse a un área de una molécula que comprende el radical orgánico voluminoso. La expresión "hidrocarbilo voluminoso" se refiere a un grupo hidrocarbilo que exhibe un gran tamaño molecular para su peso tal como, por ejemplo, el exhibido por un grupo alquilo que es ramificado o cíclico.

25 La expresión "radical orgánico no voluminoso" se refiere a un radical orgánico que no exhibe un gran tamaño molecular para su peso. El radical orgánico no voluminoso no impide en grado significativo la capacidad de un anticuerpo para unirse a un área de una molécula que comprenda el radical orgánico no voluminoso. La expresión "hidrocarbilo no voluminoso" se refiere a un grupo hidrocarbilo que no exhibe un gran tamaño molecular para su peso tal como el exhibido por un grupo alquilo de cadena lineal.

30 El término "alquilo" se refiere a un radical orgánico que consiste únicamente en carbono e hidrógeno de enlace sencillo en una configuración lineal, ramificada o cíclica. El número de átomos de carbono en el radical orgánico es de 1 a 50, o de 1 a 40, o de 1 a 30, o de 1 a 25, o de 1 a 20, o de 1 a 15, o de 1 a 10, o de 1 a 5, o 2 a 50, o 2 a 40, o 2 a 30, o 2 a 25, o 2 a 20, o 2 a 15, o 2 a 10, o 2 a 5, o 5 a 50, o 5 a 40, o 5 a 30, o 5 a 25, o 5 a 20, o 5 a 15, o 5 a 10. El término "alquilo inferior" se refiere a alquilo en donde el número de átomos de carbono en el radical orgánico es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, u 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10.

40 Hidrocarbilo voluminoso incluye hidrocarbilo de cadena ramificada e hidrocarbilo cíclico. El hidrocarbilo de cadena ramificada voluminoso tiene una ramificación en o cerca del átomo de carbono que está unido a otra molécula. Ejemplos de alquilo de cadena ramificada voluminosa incluyen, por ejemplo, sec-butilo, tert-butilo, trietilmetilo, dietilmetilo, tripropilmetilo y dipropilmetilo. Alquilo cíclico es alquilo que comprende uno o más anillos. Ejemplos de alquilo cíclico incluyen, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y norbornilo, por ejemplo. Ejemplos de alquilo no voluminoso incluyen, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo, por ejemplo.

45 El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbilo que tiene cadenas hidrocarbonadas del número de átomos de carbono especificado anteriormente de configuración lineal o ramificada y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, que puede producirse en cualquier punto a lo largo de la cadena hidrocarbonada, ejemplos de los cuales incluyen, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, dimetil pentenilo, por ejemplo.

El término "alquinilo" se refiere a un grupo hidrocarbilo que tiene cadenas hidrocarbonadas del número de átomos de carbono especificado anteriormente que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, que incluye, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo y 2-butinilo, por ejemplo.

5 El término "hidrocarbilo inferior" se refiere a un grupo hidrocarbilo que es un radical orgánico del número de átomos de carbono designado anteriormente de una configuración lineal, ramificada o cíclica en donde el radical orgánico incluye un oxígeno de éter para unir un grupo hidrocarbilo a un compuesto original.

El término "alcoxi inferior" se refiere a un radical orgánico del número de átomos de carbono designado anteriormente de una configuración lineal, ramificada o cíclica en donde el radical orgánico incluye un oxígeno de éter para unir un grupo alquilo a un compuesto original.

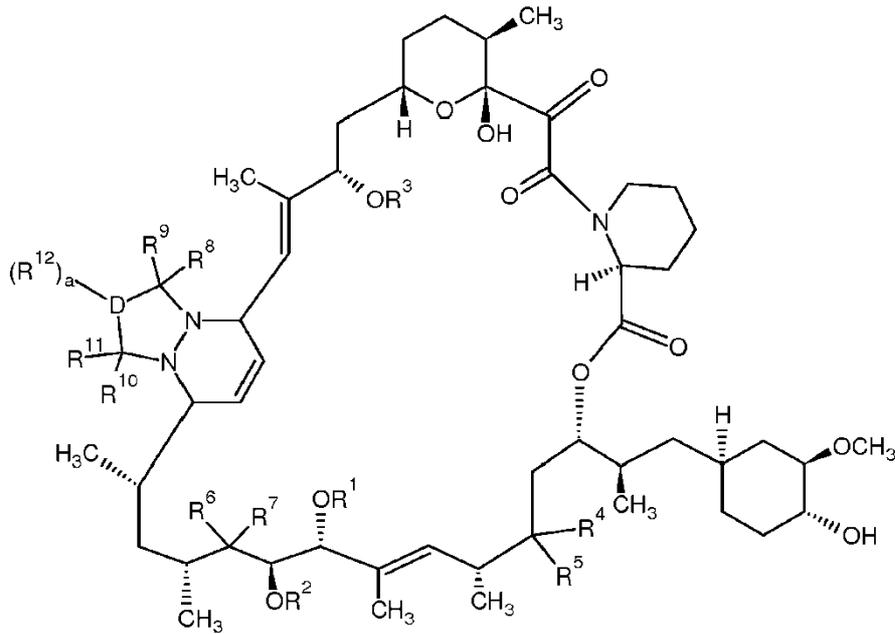
10 Como se usa en este documento, el término "arilo" se refiere a un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un átomo y que contiene uno o más anillos aromáticos tales como, pero, de 1 a 5 anillos aromáticos, o de 1 a 4 anillos aromáticos, o 1 a 3 anillos aromáticos, o 1 a 2 anillos aromáticos, o 2 a 4 anillos aromáticos, o 2 a 3 anillos aromáticos, por ejemplo. Ejemplos de arilo incluyen, fenilo (de benceno), naftilo (de naftaleno) y antracilo (de antraceno), por ejemplo. El radical arilo puede estar sustituido o no sustituido. "Arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que comprenden uno o más sustituyentes tales como, un hidrocarbilo voluminosos, un hidrocarbilo no voluminoso, un grupo funcional (por ejemplo, cloro, bromo, yodo, fluoro, nitro y sulfona), por ejemplo.

15 Como se usa en este documento, "arilhidrocarbilo" se refiere a un radical orgánico que tiene un grupo hidrocarbilo inferior al cual está unido un grupo arilo. Tal como se usa en el presente documento, "aralquilo" se refiere a un radical orgánico que tiene un grupo alquilo inferior al que está unido un grupo arilo tal como, bencilo, fenetilo, 3-fenilpropilo y 1-naftiletilo, por ejemplo.

20 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, R^1 , R^2 y R^3 son cada uno independientemente H o metilo o etilo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, R^4 y R^5 son cada uno independientemente H, metilo, etilo, metoxi, etoxi o se toman juntos para formar un doble enlace a O. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, R^6 y R^7 son cada uno independientemente H, metilo, etilo, metoxi, etoxi o tomados conjuntamente para formar un doble enlace con O. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, R^8 y R^9 son cada uno independientemente H, metilo, etilo, metoxi, etoxi o se toman juntos para formar un doble enlace a O. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente H, metilo, etilo, metoxi, etoxi o tomados en conjunto para formar un doble enlace a O. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, R^{12} es H, tert-butilo, fenilo o bencilo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, a es 1 y D es N.

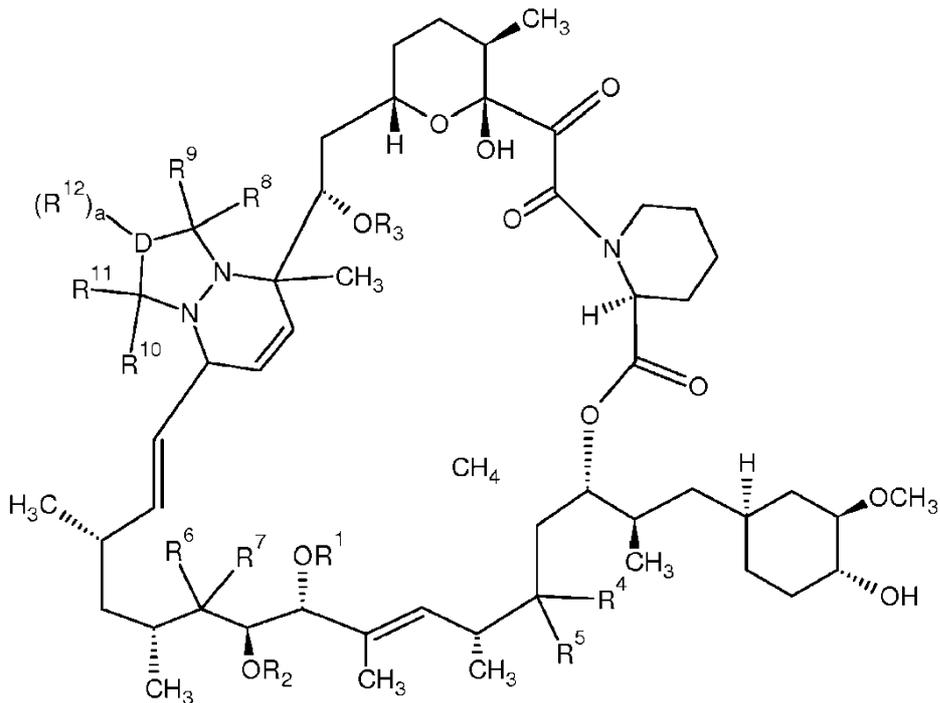
30 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a composiciones para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra sospechosa de contener el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en donde la composición comprende en un medio regulado un compuesto de la fórmula III:

35



III

o un compuesto de la fórmula IV:



IV

o una mezcla de compuestos de fórmula III y fórmula IV,

5 en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

- 5 R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

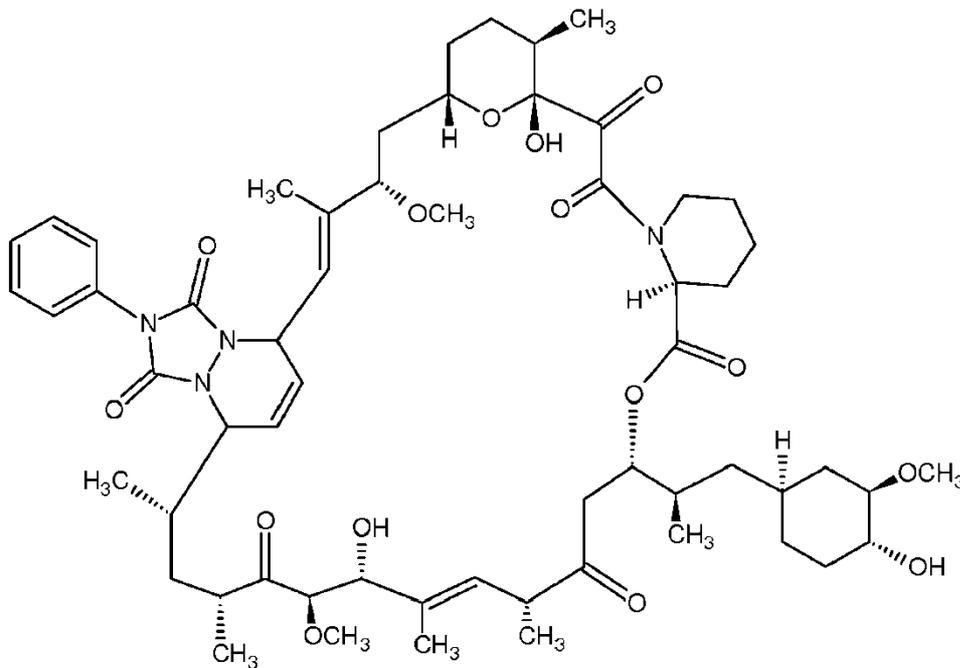
en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

p es 1, 2 o 3;

- 10 a es 0 o 1; y

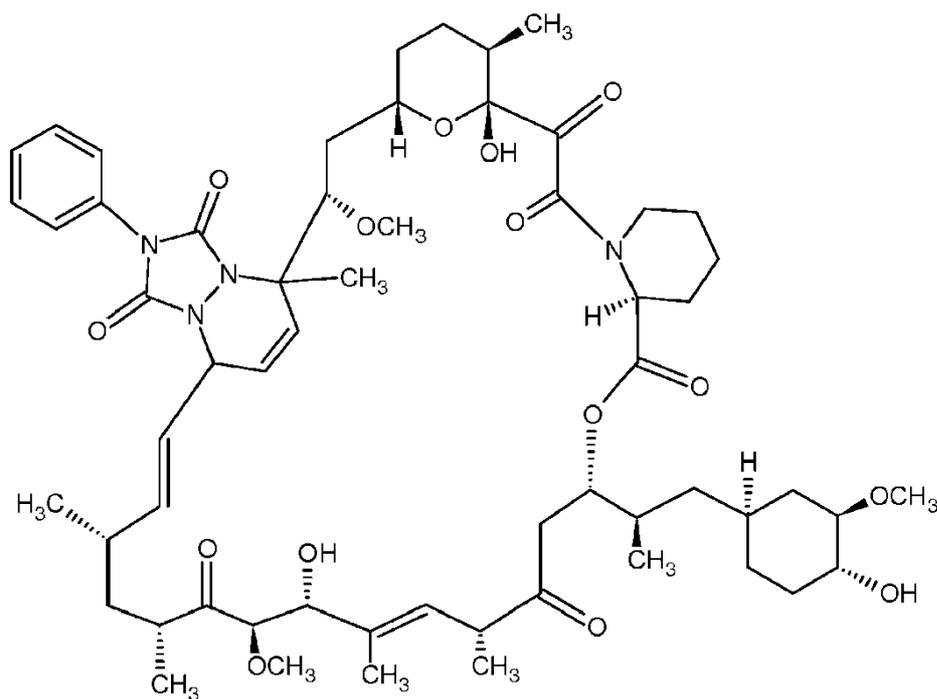
D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, una composición comprende en un medio regulado un compuesto de la fórmula V:



V.

- 15 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una composición comprende un compuesto de la fórmula VI:



VI.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una composición para uso como agente de liberación para un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP incluye una mezcla de compuestos de fórmula V y fórmula VI.

5 Preparación de compuestos

Se describen ejemplos de métodos para preparar compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento, a modo de ilustración y no de limitación, con referencia a la Fig. 3. Se pueden emplear otras metodologías para formar los compuestos consistentes con los principios descritos en este documento. Con referencia a la Fig. 3, el compuesto de sirolimus VII se combina con el reactivo cíclico VIII en condiciones para llevar a cabo una reacción de adición de Diels-Alder. Las condiciones incluyen usar un medio orgánico no polar anhidro tal como cloruro de metileno, tolueno, hexano, nitrobenzono y tetracloruro de carbono, por ejemplo; o un medio orgánico polar tal como etanol, acetonitrilo y tosilatos de fosfonio, y mezclas acuosas de los mismos, por ejemplo. La reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, o aproximadamente temperatura ambiente (aproximadamente 22°C a aproximadamente 24°C) durante un período de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos o aproximadamente 30 minutos y luego a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, o aproximadamente 50°C a aproximadamente 80°C, o aproximadamente la temperatura de reflujo del disolvente orgánico no polar durante un período de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 75 minutos, o aproximadamente 60 minutos. El producto resultante se purifica por una o más técnicas tales como evaporación, recristalización y cromatografía tal como, por ejemplo, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida en fase reversa (RPLC), cromatografía líquida de alta turbulencia (HTLC), cromatografía de gases, por ejemplo. El producto es una mezcla de dos isómeros representados por los compuestos I y II en la Fig. 3, que se pueden emplear conjuntamente o se pueden separar mediante una o más técnicas para separar isómeros posicionales tales como cromatografía (TLC, HPLC, RPLC, HTLC). y cromatografía de gases, por ejemplo.

Otro ejemplo de una preparación de ejemplos de compuestos de acuerdo con los principios descritos aquí se ilustra en la Fig. 4. Con referencia a la Fig. 4, el compuesto de sirolimus VII se combina con el reactivo cíclico VIII en condiciones para llevar a cabo una reacción de adición de Diels-Alder similar a las descritas anteriormente para producir los compuestos III y IV.

30 Se describe un ejemplo particular de un método de preparación de compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento, a modo de ilustración y no de limitación, con referencia a la Fig. 5. Se pueden emplear otras metodologías para formar los compuestos consistentes con los principios. descrito aquí. Con referencia a la Fig. 5, el sirolimus se combina con el reactivo cíclico PTAD en condiciones para llevar a cabo una reacción de adición de Diels-

Alder. Las condiciones incluyen usar un medio orgánico no polar anhidro tal como cloruro de metileno, tolueno, hexano, nitrobenzono y tetracloruro de carbono, por ejemplo; o un medio orgánico polar tal como etanol, acetonitrilo y tosيلات de fosfonio, y mezclas acuosas de los mismos, por ejemplo. La reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, o aproximadamente temperatura ambiente (aproximadamente 22°C a aproximadamente 24°C) durante un período de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos o aproximadamente 30 minutos y luego a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, o aproximadamente 50°C a aproximadamente 80°C, o aproximadamente la temperatura de reflujo del disolvente orgánico no polar durante un período de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 75 minutos, o aproximadamente 60 minutos. El producto resultante se purifica mediante una o más técnicas tales como evaporación, cromatografía tal como, por ejemplo, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de fase reversa (RPLC), cromatografía líquida de alta turbulencia (HTLC) y cromatografía de gases, por ejemplo. El producto es una mezcla de dos isómeros representados por los compuestos V y VI en la Fig. 5, que se pueden emplear juntos o se pueden separar mediante una o más técnicas para separar isómeros posicionales tales como cromatografía (TLC, HPLC, RPLC, HTLC) y cromatografía de gases, por ejemplo.

Uso de los compuestos como agentes de liberación

Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se dirigen a métodos para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra de la que se sospecha que contiene uno o más fármacos inmunosupresores de unión a FKBP. Se proporciona una combinación que comprende la muestra y, como reactivo liberador de pretratamiento, uno de los compuestos mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para liberar fármacos inmunosupresores que se unen a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas.

La muestra para ensayar 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 fluida (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, un aspirado corporal, un escindido corporal o un extracto corporal. El cuerpo puede ser mamífero o no mamífero. En algunos ejemplos, 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 y exudados de inflamaciones. Los escindidos 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.

Para la liberación del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, la muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso y, en algunos ejemplos, el medio es el medio en donde se lleva a cabo un ensayo posteriormente o de forma concomitante. El tamaño de la porción de muestra depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los diversos reactivos para realizar el ensayo y la naturaleza del complejo que comprende el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, por ejemplo. 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 concentración del agente de liberación en el medio es la que es suficiente para lograr el resultado deseado de desplazar sustancialmente todo el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP y, en algunos casos, metabolitos del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, a partir de sustancias de unión endógenas para convertir el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, y metabolitos si se desea, en accesible para unirse a un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP y metabolitos. La expresión "desplazar sustancialmente todo el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP que está unido por sustancias de unión endógenas" significa que el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99%, o al menos 99.5%, o al menos 99.9% o es 100% desplazado de sustancias de unión endógenas y disponible para detección durante un ensayo. La cantidad o concentración de agente liberador empleado depende de

una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del fármaco inmunosupresor que se une a FKBP, la naturaleza de los metabolitos del fármaco inmunosupresor que se une a FKBP, la naturaleza de otros componentes reactivos y las condiciones de reacción, por ejemplo. En algunos ejemplos, 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 del agente de liberación, el medio que comprende la muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para desplazar sustancialmente todo el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, y los metabolitos, si se desea, de sustancias de unión endógenas. La duración y las condiciones de la incubación dependen de una o más de la naturaleza del agente de liberación, la naturaleza del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP y la concentración sospechada del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser 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, 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. Como se mencionó anteriormente, la incubación se puede llevar a cabo en un medio que, por conveniencia, puede ser un medio de ensayo como se describe en el presente documento, pero no es necesario.

Un compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento se puede añadir directamente a un medio que comprende una alícuota de muestra. Por otro lado, un compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento se puede incluir en una solución de reactivo de pretratamiento y la alícuota de muestra se agrega a la solución de reactivo de pretratamiento. En cualquier caso, el medio que comprende la muestra o la solución de reactivo de pretratamiento en sí misma puede comprender uno o más de un agente hemolítico, un regulador, un agente anticoagulante y un conservante, por ejemplo. Los agentes anteriores, si se utilizan, están presentes en una cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseados.

Cuando se prepara una solución de reactivo de pretratamiento por separado, se formula en un medio acuoso que puede ser únicamente agua o que puede contener de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 40%, o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5%, de un disolvente orgánico polar tal como un alcohol o un éter, por ejemplo.

En algunas realizaciones, se emplea un agente hemolítico, que es un agente que altera las membranas celulares en las que puede atraparse el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. Por ejemplo, un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que está atrapado dentro de los glóbulos rojos se puede liberar de los glóbulos rojos mediante el empleo de un agente hemolítico. Un agente hemolítico es un compuesto o mezcla de compuestos que altera la integridad de las membranas de los glóbulos rojos desplazando así los 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 anfotéricos, soluciones acuosas de baja fuerza iónica (soluciones hipotónicas), agentes bacterianos y anticuerpos que causan lisis dependiente del complemento. El agente hemolítico está presente en una cantidad de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 0.5% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.5% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.5%, por ejemplo.

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, ALKANOL® 6112 surfactante, 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-hidroxipoli (oxi-1,2-etanodiol)fosfato) y EP110® y similares. Los detergentes de origen natural que se pueden emplear

5 como agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, ácidos grasos neutralizados de sodio o potasio, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidilserina neutralizada, fosfatidato, fosfatidil etanolamina neutralizada, fosfatidil colina, fosfatidil inositol, fosfatidilcolina, sales biliares, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También pueden emplearse combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes naturales o combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes naturales.

10 Un regulador, si se emplea en el medio o en una solución de reactivo de pretratamiento, puede ser un regulador que se emplea en un ensayo para un analito. Reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, Tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINE, por ejemplo. El pH para el medio de ensayo o para la solución de reactivo de pretratamiento 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, por ejemplo. El pH generalmente será un compromiso entre el requerido para un ensayo y el requerido para lograr la liberación o el desplazamiento de un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP a partir de sustancias de unión endógenas, por ejemplo.

15 El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos sanguíneos. Tales agentes incluyen tetraacetato de etilendiamina (EDTA), tetraacetato de etilenglicol (EGTA), citrato y heparina, por ejemplo. El agente anticoagulante está presente en una cantidad de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.05% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.05% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.5%, u.

20 Otros agentes que pueden emplearse en la solución de reactivo de pretratamiento incluyen reactivos de solubilidad tales como, por ejemplo, una pequeña cantidad de un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, metoxipropanol y dimetilsulfóxido (DMSO); y agentes para llevar a cabo la digestión de proteínas tales como, por ejemplo, proteinasas, tripsina, pepsina y peptidasas; por ejemplo. Como se mencionó anteriormente, cualquiera de los agentes anteriores está presente en una concentración suficiente para lograr ese efecto o función deseados.

Descripción general de los ensayos para un analito

30 Se puede emplear cualquier ensayo adecuado para determinar una o ambas de la presencia y cantidad de un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. Los ensayos pueden realizarse en la muestra como una continuación inmediata del tratamiento de la muestra con un agente de liberación como se discutió anteriormente o el ensayo puede llevarse a cabo en un punto posterior. Los ensayos se realizan combinando en un medio de ensayo la muestra con reactivos para determinar la cantidad del fármaco inmunosupresor que se une a FKBP en la muestra. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo que se va a realizar. La combinación en el medio se somete a condiciones para la unión del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP a un miembro de unión específica para que el fármaco forme un complejo. La cantidad del complejo se mide cuando la cantidad del complejo está relacionada con una o ambas de la presencia y cantidad de fármaco inmunosupresor que se une a FKBP en la muestra.

40 Como se indicó anteriormente, en muchas realizaciones los reactivos comprenden al menos un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. El miembro de unión específica es 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 un espacio espacial particular y organización polar 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 biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A, los pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, por ejemplo, no son pares inmunológicos, pero están incluidos dentro del alcance del término "miembro de unión específica" o "miembro de sbp".

50 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 hidrófobas entre moléculas.

55 Como se menciona anteriormente, los agentes de liberación de acuerdo con los principios descritos en este documento exhiben una mínima reactividad cruzada con un miembro de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, para un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que se emplea en tal ensayo. Además, como se discutió anteriormente, en la circunstancia en que el mismo agente liberador de acuerdo con los principios descritos en este documento se emplea en ensayos para más de un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP, el agente liberador

muestra una unión mínima o reactividad cruzada con los diferentes enlaces específicos miembros empleados en los ensayos para los diferentes fármacos inmunosupresores.

En algunos ejemplos de ensayos según los principios descritos en este documento, el miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, que puede ser una molécula de inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma. Los anticuerpos incluyen diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e IgM, por ejemplo. Los fragmentos de los mismos 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 el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. Los anticuerpos para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP pueden prepararse mediante técnicas que incluyen inmunización de un huésped y colección de sueros (policlonales), preparación de líneas celulares híbridas continuas y recolección de la proteína secretada (monoclonal) o clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales, por ejemplo.

En general, el ensayo es un método para determinar una cantidad de un fármaco inmunosupresor que se une a FKBP 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. Un anticuerpo seleccionado para uso en un inmunoensayo para un analito, por ejemplo, debe unir específica y preferencialmente el analito (y sus metabolitos activos farmacéuticamente, si es necesario o se desea) con otros ligandos tales como otros metabolitos o sustancias relacionadas.

Se puede realizar un ensayo para el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los ensayos heterogéneos usualmente implican una o más etapas de separación. Los ensayos pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden incluir 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 preparados a partir de conjugados inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos en este documento. 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 de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

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 incluye ensayos homogéneos sin separación en los que un reactivo marcado de acuerdo con los principios descritos en este documento modula la señal del marcador tras la unión de un compuesto de acuerdo con los principios descritos aquí a un miembro de unión específico para un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, compitiendo así con el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que puede estar presente en la muestra. Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que se va a realizar.

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. En cualquier caso, se puede emplear un compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento para liberar el analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas.

Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT[®] (Syva Company, San Jose, CA) descrito en Rubenstein, et al., Patente de 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; y 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.

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") descritos 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") e inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas ("PETIA"), por ejemplo.

- 5 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"); e inmunoensayos de marcación con éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como una fase sólida (inmunoensayos ADVIA Centaur); por ejemplo. 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 y ensayos de electrodo amperométrico.

- 15 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 sistema de producción de señal 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, es decir, la cantidad de etiqueta unida o no al analito que es detectado o a un agente que refleja la cantidad de 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, un radiomarcador, una enzima, un quimioluminiscente o un fotosensibilizador. Por lo tanto, la señal se detecta y/o mide detectando la actividad de la enzima, la luminiscencia, la absorbancia de la luz o la radioactividad, dependiendo de la naturaleza de la etiqueta.

- 25 Marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), β -galactosidasa y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores; tintes; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluoescamina; 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 ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co y ^{75}Se ; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO_2) 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.

- 35 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, en 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.

- 40 Alternativamente, 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, depuradores, 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.

- 50 La etiqueta u otros miembros sps se pueden unir a un soporte. Un análogo de analito o analito puede estar unido 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 del analito o del análogo para unirse con un anticuerpo. En algunas realizaciones, el analito o análogo del analito puede estar recubierto o unido covalentemente directamente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas transportadoras tales como poli(aminoácidos) que incluyen proteínas tales como albúminas séricas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (carbohidratos) como, por ejemplo, derivados de dextrano o dextrano. Los grupos de enlace también se pueden usar para acoplar covalentemente el soporte sólido y el analito. Otros métodos de unión del analito también son posibles. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un revestimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina, un anticuerpo, etc., y una molécula pequeña tal como biotina o un hapteno, por ejemplo, se puede unir al analito 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) and Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970).

5 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 formas, tales como partículas, incluyendo cuentas, películas, membranas, tubos, pozos, tiras, varillas, superficies planas (tales como, por ejemplo, placas y papel) y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no suspenderse en el medio en donde se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras
10 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 y poli(vinilo butirato), ya sea usado solo o en conjunto con otros materiales.

15 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,
20 leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus, E. coli o virus. 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 o lipoproteínas, por ejemplo. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

25 Las partículas de polímero pueden formarse a partir 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 analito, directa o indirectamente a través de un grupo de enlace. 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®,
30 celulosa, almidón y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, poli(alcohol vinílico), homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidades hidroxilo libres, por ejemplo.

35 La etiqueta 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 un análogo de 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 extintor, pueden
40 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 inhibidor 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.

45 Las enzimas de particular interés como proteínas marcadoras son las enzimas rédox, particularmente las deshidrogenasas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, por ejemplo, y las enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor del colorante a un colorante. 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, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante,
50 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.

55 Las coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H] y β -galactosidasa, por ejemplo. 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. Normalmente hay al menos aproximadamente 1 analito análogo 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, por ejemplo. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos del analito 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 de polinucleótidos amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como partículas de látex o carbono o partículas de dióxido de cromo (cromo), un sol metálico, un cristalito, un liposoma o una célula, que pueden o no estar marcados adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

En una realización, el ensayo es un inmunoensayo de luminiscencia inducida, 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 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 y no de limitación, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con ellas, tal como por incorporación en el mismo o unión al mismo. 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 anticuerpo para el 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 muestra sospechosa de contener un analito y con las partículas fotosensibilizadoras. El medio de reacción se incubaba para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión del miembro sbp al analito para formar un complejo y permitir que el segundo miembro sbp se una al complejo. 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 del analito, se activa por oxígeno singlete y emite luminiscencia. El medio se examina a continuación para la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada su presencia con la cantidad del 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 el que proporciona 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, y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como los miembros de un sistema de producción de señal, por ejemplo. Se pueden usar varios 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 y BICINE, por ejemplo. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de reguladores y conservantes, el medio puede comprender estabilizantes 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; y potenciadores de unión, por ejemplo. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseados.

- 5 Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio a 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
10 normalmente 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, 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
15 del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 50°C, o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 40°C.

- La concentración de analito que se puede ensayar 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
20 cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (con relación 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 la avidéz 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.

- 30 Aunque 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, una etapa de incubación puede estar involucrada después de cada adición como se discutió anteriormente. La duración del período de incubación es la que es suficiente para lograr la
35 función deseada.

Realizaciones específicas de ensayos para analitos de fármacos inmunosupresores de unión a FKBP

- A continuación se discuten realizaciones específicas de ensayos que pueden emplearse para analizar la muestra, a modo de ilustración y no de limitación. En todos los casos, un compuesto según los principios descritos en el presente documento se añade a la muestra, antes y separadamente de la realización de un ensayo o de manera concomitante
40 con la realización de un ensayo, para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas. El compuesto puede incluirse en un medio que comprende una muestra o la muestra puede añadirse a una solución de reactivo de pretratamiento preparada por separado que comprende el compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento.

- 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 de la que se sospecha que contiene el analito se combina en un medio acuoso ya sea simultánea o secuencialmente con un conjugado enzimático del analito, es decir, 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 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.

- Un "analito análogo" o "análogo del analito" es un analito modificado que compite con el analito por un receptor tal como un anticuerpo para el analito. La modificación puede proporcionar medios para unir un analito análogo a otra molécula, como un soporte, una etiqueta, una molécula pequeña o un asociado de unión para una molécula pequeña,
55

por ejemplo. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que enlace el análogo del analito a un núcleo o etiqueta, pero no es necesario. Es decir, el análogo del analito se puede unir a otra molécula directa o indirectamente por medio de un grupo de enlace. El análogo del analito puede ser, por ejemplo, una molécula relacionada estructuralmente con el analito o el analito conjugado con otra molécula a través de un grupo de unión.

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 No. 5,328,828 y 5,135,863.

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.

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. 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.

En un ejemplo particular, se puede emplear un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida se menciona en la Patente de los Estados Unidos No. 5,340,716 (Ullman). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que tiene asociado un fotosensibilizador en donde un análogo del fármaco inmunosupresor que se une a FKBP se une a la partícula (reactivo de partículas fotosensibilizadoras). El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. El analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP compite con el reactivo de partículas fotosensibilizadoras por la unión al anticuerpo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. Si está presente el analito farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP, es menor el número de moléculas de reactivo de partículas fotosensibilizadoras que se acercan mucho al reactivo quimioluminiscente. Por lo tanto, habrá una disminución en la señal del ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están muy cerca. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP presente en la muestra.

En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducida, el ensayo usa una partícula que tiene asociado un compuesto quimioluminiscente en donde un análogo del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP se une a la partícula (reactivo de partículas quimioluminiscentes). El reactivo fotosensibilizador comprende un anticuerpo para fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. El analito farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP compite con el reactivo de partículas quimioluminiscentes por la unión al anticuerpo para el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP. Si está presente el analito farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP, es menor el número de moléculas de reactivo de partículas quimioluminiscentes que se acercan mucho al reactivo fotosensibilizador. Por lo tanto, habrá una disminución en la señal del ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente del reactivo de partículas quimioluminiscentes 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 a su vez se relaciona con la cantidad de analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP presente en la muestra.

En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que está conjugada con un asociado de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son asociados de unión para la biotina). También se emplea un análogo del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que comprende biotina (reactivo de biotina). Un reactivo quimioluminiscente que comprende un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor que se une a FKBP se emplea como parte del sistema de detección. El medio de reacción se incuba para permitir que la avidina o estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se

unan al reactivo de biotina en virtud de la unión entre avidina y biotina y para permitir también el miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que es parte del reactivo quimioluminiscente para unirse al analito farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP o al analito análogo del reactivo biotina que ahora está unido a las partículas fotosensibilizadoras. 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 una menor cantidad del reactivo quimioluminiscente está ahora muy cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito farmacológico inmunosupresor que se une a FKBP, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. El medio se examina a continuación para detectar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada su presencia con la presencia y/o cantidad del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP.

En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducido, se emplea una partícula fotosensibilizadora que está conjugada con un asociado de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son asociados de unión para la biotina). Un reactivo conjugado comprende un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP conjugado con biotina. Se emplea un análogo del fármaco inmunosupresor que se une a FKBP cuando el análogo está unido a una partícula quimioluminiscente (reactivo quimioluminiscente-análogo) también se emplea. El medio de reacción se incubaba para permitir que la avidina o estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan al reactivo anticuerpo-biotina en virtud de la unión entre avidina y biotina y también permite que el miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP se una a analgésico del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP si está presente en la muestra y al análogo del analito que es parte del reactivo compuesto quimioluminiscente. 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 menos del reactivo quimioluminiscente-análogo está ahora muy cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito farmacológico inmunosupresor que se une a FKBP, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. El medio se examina a continuación para detectar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada su presencia con la presencia y/o cantidad del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP.

Otro ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de un formato de ensayo es ACMIA (Inmunoensayo de afinidad mediado por dióxido de cromo). Para el formato de ensayo ACMIA, se emplean partículas de cromo, que están recubiertas con un análogo del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, como primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. Este anticuerpo, entrecruzado con una enzima informadora (por ejemplo, β -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 farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP que podría estar presente. presente en una muestra. Una muestra que se somete a tratamiento con un agente de liberación de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se trata con un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, anticuerpo que se une al fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en la muestra. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con la muestra para permitir que el analito del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP 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 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 fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en la muestra.

En todos los formatos de ensayo anteriores, se emplea un agente de liberación de acuerdo con los principios descritos en este documento para desplazar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de las sustancias de unión endógenas. Como se discutió anteriormente, el agente de liberación se puede agregar a un medio que comprende la muestra directamente o en forma de una solución de reactivo de pretratamiento. Por otro lado, la muestra puede añadirse a una solución de reactivo de pretratamiento que comprende un compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento.

Etapa de medición

Los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento 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 de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP (anticuerpo anti-analito). 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.

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 de la 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.

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 analiza en este documento, 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 y reactivos químicos.

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.

El examen de la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en donde 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 del analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, por ejemplo. En un enfoque, las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los analitos a cribar; calibradores y otros controles también pueden ser utilizados.

Kits para realizar ensayos en las porciones de muestra

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 analito de fármaco inmunosupresor de unión a FKBP. En una realización, un kit comprende en combinación empaquetada un reactivo de acuerdo con los principios descritos en este documento para liberar el analito farmacológico inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas, un anticuerpo para el analito y otros reactivos para realizar un ensayo, cuya naturaleza depende sobre el 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.

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 deben producirse durante el procedimiento de ensayo 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.

La expresión "al menos" tal como se usa en el presente documento significa que la cantidad de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número enumerado. La expresión "o más" tal como se usa en el presente documento significa que la cantidad de elementos 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.

La siguiente discusión se dirige a ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos en este documento a modo de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Se pueden idear numerosas modificaciones y composiciones, métodos y sistemas alternativos sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

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 descritos en este documento son en volumen a menos que se indique lo contrario.

- 5 Definiciones:
- mg = miligramo
 - g = gramo(s)
 - ng = nanogramo(s)
 - mL = mililitro(s)
- 10 μ L = microlitro(s)
- mmol(s) = millimol(es)
 - μ mol = micromolar
 - $^{\circ}$ C = grados Centígrados
 - min = minuto(s)
- 15 sec = segundo(s)
- hr = hora(s)
 - w/v = peso a volumen
 - v/v = volumen a volumen
 - TLC = cromatografía en capa fina
- 20 HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento
- EtOAc = acetato de etilo
 - MeOH = metanol
 - DMF = dimetilformamida
 - DMSO = dimetilsulfóxido
- 25 MeOP = 1-metoxi-2-propanol
- MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
 - DI = desionizado
 - EDA = etilendiamina
 - LOCI = Inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente
- 30 BSA = albúmina de suero bovino
- BGG = gammaglobulina bovina
 - mIgG = inmunoglobulina monoclonal
 - MS = espectrometría de masas
 - SIRO = sirolimus
- 35 Tacro = tacrolimus
- FKE = FK506 éster

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. Sirolimus se puede obtener de Pfizer Inc., Nueva York, NY. Se puede obtener 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (PTAD) de Sigma-Aldrich Company, el azidodicarboxilato de dietilo (DAC) se puede obtener de Sigma-Aldrich Company.

5 La prueba se llevó a cabo usando el analizador DIMENSION® RxL, disponible de Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. El instrumento se empleó usando la tecnología de inmunoensayo ACMIA. El método de ensayo ACMIA se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,842,475, 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
10 utilizado en este documento y discutido con más detalle a continuación, se utiliza la competencia entre análogo de tacrolimus sobre 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 mediante separación magnética. La actividad enzimática del conjugado que queda en el sobrenadante se mide 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
15 cuando se prueba una muestra que no contiene tacrolimus es indicativa de la cantidad de actividad enzimática que no está unida al anticuerpo 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.

20 **Ejemplo 1**

Preparación de aductos de Diels-Alder de 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (PTAD) y sirolimus. Se hace referencia a la Fig. 5. Se añadió una solución de PTAD (38 mg, 0.217 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (1 ml) a una solución de sirolimus (200 mg, 0.219 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (7 ml) a temperatura ambiente (24°C). El color rojo característico de PTAD desapareció. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se sometió a reflujo bajo
25 nitrógeno a 60°C durante 60 minutos. El análisis de TLC de la mezcla mostró que quedaba una cantidad muy pequeña de sirolimus. (Condiciones de TLC: Hexano/acetato de etilo/MeOH = 30/65/5 (v/v)). Luego, se añadieron 5 mg de PTAD a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó a 24°C durante 30 min. El análisis de TLC de la mezcla demostró nuevamente que se consumió todo el sirolimus. El color rojo claro de PTAD permaneció en la reacción indicando un exceso de PTAD. La mayor parte del CH₂Cl₂ se evaporó mediante evaporación rotatoria. La solución de residuo (0.5 ml) se aplicó a una placa de TLC preparativa (20 x 20 cm, 2000 micrómetros, Analtech, Newark DE). La placa se desarrolló con el mismo sistema disolvente que antes (Hexano/acetato de etilo/MeOH = 30/65/5 (v/v)). El producto que contiene la banda de silicio se recogió y se extrajo con MeOH/CH₂Cl₂ (1/9, v/v; 40 ml x 3) tres veces. Los extractos orgánicos combinados se evaporaron y el residuo se secó a alto vacío durante 16 horas. Esto dio una mezcla de los aductos III y IV de PTAD-sirolimus Diels-Alder puros deseados (220 mg, 92% de rendimiento) como un sólido blanco.
30 La proporción de isómeros de región de HPLC de III/IV fue de 86/14; HPLC-MS (ES): MNa⁺ 1111.5; 1H-RMN (CDCl₃) 7.62 (1H); 7.46 (3H); 7.37 (1H); 5.98 (1H); 5.84 (1H); 5.55 (1H); 3.4 (s, 3H); 3.35 (s, 3H); 3.15 (s, 3H); 0.72 (q, 1H).

Preparación de aductos Diels-Alder de azidodicarboxilato de dietilo (DAC) y sirolimus. El compuesto del título, que no está de acuerdo con los principios descritos en este documento, se preparó y evaluó para fines de comparación. Se añadió DAC (77 mg, 0.07 ml, 0.438 mmol) a una solución de sirolimus (200 mg, 0.219 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (5 ml) a temperatura ambiente (24°C). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min y se calentó a reflujo bajo nitrógeno a 60°C durante 16 h. El análisis por TLC de la mezcla mostró que quedaba una pequeña cantidad de sirolimus (condición de TLC: acetato de etilo). Por lo tanto, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (24°C). Se añadió DAC (77 mg) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se sometió a reflujo bajo nitrógeno a 60°C durante 3 horas. La mayor parte del CH₂Cl₂ se evaporó mediante evaporación rotatoria. La solución de residuo (0.5 ml) se aplicó a una placa de TLC preparativa (20 x 20 cm, 2000 micras, Analtech). La placa se desarrolló con el mismo sistema disolvente (acetato de etilo). El producto que contiene la banda de silicio se recogió y se extrajo con MeOH/CH₂Cl₂ (1/9, v/v; 40 ml x 3) tres veces. Los extractos orgánicos combinados se evaporaron y el residuo se secó a alto vacío durante 16 horas. Esto dio los aductos Diels-Alder de sirolimus puros deseados IX y X (véase la Fig. 6) (182 mg, 76% de rendimiento) como un sólido blanco. La relación IX/X de los isómeros de la región HPLC fue de 85/15; HPLC-MS (ES): MNa⁺ 1110.6.
40
45
50

Preparación de sirolimus hidrogenado. El compuesto del título, que no está de acuerdo con los principios descritos en este documento, se preparó y evaluó para fines de comparación. Se preparó sirolimus hidrogenado de una manera similar a la descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 5,023,262. En resumen, la hidrogenación de sirolimus se realizó con un catalizador metálico bajo presión de hidrógeno para hidrogenar la porción trieno de sirolimus para dar sirolimus XI hidrogenado (véase la Fig. 7).
55

Preparación de la solución de reactivo de pretratamiento. Esta solución de pretratamiento se preparó para contener una cantidad de agente liberador, 6.8 mg/mL de sal de sodio de PIPES 1.5 (regulador), 0.3 mg/mL de EDTA disódico (agente de prevención de coágulos), 1.0 mg/mL de saponina (agente hemolítico), 0.2% de PROCLIN® 300 (conservante), 0.024 mg/mL de sulfato de neomicina (conservante) y 0.99 mg/mL de NaN_3 , pH 6.5. La cantidad de agente de liberación en cada una de las soluciones de reactivos de pretratamiento fue de 10 $\mu\text{g/mL}$. La concentración del agente de liberación en la mezcla de reacción final fue equivalente a 46.7 $\mu\text{g/mL}$ del análogo añadido de la muestra.

Preparación del conjugado anticuerpo anti-sirolimus- β -galactosidasa. El anticuerpo monoclonal anti-sirolimus (clon 155-M1 de Wyeth Pharmaceutical) se conjugó con β -galactosidasa usando un enlazador SMCC (succinimidil trans-4-(N-maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato) heterobifuncional estándar de acuerdo con técnicas conocidas. La solución de conjugado de anticuerpo contenía aproximadamente 7.5 $\mu\text{g/mL}$ de conjugado de anticuerpo anti-sirolimus-galactosidasa, 30 mg/mL de albúmina de suero bovino libre de proteasa, 0.126 mg/mL de MgCl_2 , 0.03 mL/mL de etilenglicol, 35.14 mg/mL de PIPES 1.5 sal sódica, NaCl 50 mg/mL y muteína beta-gal (β -galactosidasa inactivada), pH 6.5.

Preparación del conjugado anticuerpo anti-tacrolimus- β -galactosidasa. El anticuerpo monoclonal anti-tacrolimus (clon 1H6, véase por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 7,078,495) se conjugó con β -galactosidasa usando un conector SMCC (succinimidil trans-4-(N-maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato) heterobifuncional estándar según lo conocido técnicas. La solución de conjugado de anticuerpo contiene aproximadamente 7.5 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-tacrolimus- β -galactosidasa conjugada, 30 mg/mL de albúmina de suero bovino libre de proteasa, 0.126 mg/mL de MgCl_2 , 0.03 mL/mL de etilenglicol, 35.14 mg/mL PIPES 1.5 sal sódica, NaCl 50 mg/mL y muteína beta-gal (β -galactosidasa inactivada), pH 6.5.

Preparación de partículas de cromo magnético. Se prepararon partículas de sirolimus cromo (fase sólida de inmunoensayo) conjugando conjugado de sirolimus-biotina con partículas de cromo revestidas con estreptavidina (preparadas de una manera similar a la descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 7,842,475). El reactivo de partículas de cromo contenía aproximadamente 2.5 mg/mL de suspensión de partículas de sirolimus cromo, 60.8 mg/mL de dihidrato de trehalosa y 7.2 mg/mL de CARBOWAX®.

Se prepararon partículas de tacrolimus cromo (inmunoensayo en fase sólida) conjugando succinato de tacrolimus-C22 (preparado de manera similar a la descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 7,842,475) a fluoresceína, que se usó para predecorar anticuerpo anti-fluoresceína inmovilizado en partículas de dióxido de cromo a través de glutaraldehído. El reactivo de partículas de cromo contenía aproximadamente 2.5 mg/mL de suspensión de partículas de cromo tacrolimus, 60.8 mg/mL de dihidrato de trehalosa y 7.2 mg/mL de CARBOWAX®.

Preparación de muestras Se añaden alícuotas de un conjunto de sangre entera con una cantidad de sirolimus de manera que la concentración resultante de sirolimus en las muestras de sangre entera en los calibradores se establece en la Tabla 1 (0.0, 5.1, 10.1, 20.6 y 31.6 ng/mL). Se añaden alícuotas de un conjunto de sangre entera con una cantidad de tacrolimus de modo que la concentración resultante de sirolimus en las muestras de sangre entera en los calibradores se establece en la Tabla 2 (0.0, 2.6, 5.3, 11.6 y 30.1 ng/mL).

Pretratamiento de muestras. Un conjunto de muestras se trató de la siguiente manera: a cada muestra se añadió una cantidad de la solución de reactivo de pretratamiento de arriba para desplazar sirolimus en la muestra de proteínas de unión específicas endógenas. Las muestras se incubaron a 37°C durante un período de 140 minutos. Posteriormente, cada muestra se sometió al ensayo mencionado anteriormente, que se describe adicionalmente a continuación; y la señal (mAU) se midió y se relacionó con una concentración de analito que representa la cantidad de analito libre (analito que no está unido por sustancias de unión endógenas más analito que se desplazó de sustancias de unión endógenas) en las muestras.

Ensayo. El ensayo ACMIA para sirolimus se llevó a cabo de la siguiente manera: 15 μL de una muestra de sangre entera anterior se mezcló con la solución de reactivo de pretratamiento de arriba (Displacer) (Tabla 1) en un recipiente en el analizador DIMENSION® RxL. La sangre entera se tomó de una copa estándar mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica.

Se añadió conjugado de anticuerpo anti-sirolimus- β -galactosidasa (50 μL) al lado de cada uno de los recipientes de reacción y la mezcla se mantuvo durante un período de tiempo (10 a 15 minutos) y a una temperatura de 43°C para permita que sirolimus, si está presente, reaccione con el reactivo del anticuerpo. Se añadieron partículas de cromo con conjugado de sirolimus-biotina inmovilizado a partículas de cromo revestidas con estreptavidina (50 μL) a cada uno de los recipientes de reacción y se dejaron unir al conjugado sin unir. El conjugado de anticuerpo anti-sirolimus- β -galactosidasa unido a sirolimus 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 sirolimus se detectó 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-

ES 2 682 025 T3

galactopiranosido de clorofenol (CPRG). La velocidad para cada recipiente de reacción se midió bicromáticamente a 577 y 700 nm. Los resultados se resumen en la Tabla 1 bajo las categorías: señal del instrumento observada para los calibradores, concentración del fármaco medida en ng/mL, porcentaje (%) desplazado frente a SIRO y reactividad cruzada calculada del anticuerpo (porcentaje (%) por 100). La reactividad cruzada se basó en lo siguiente:

- 5 1) Se añadieron 70 μL de solución de reactivo de pretratamiento al medio de reacción frente a 15 μL de muestra, volumen total de la mezcla de reacción = 305 μL .
- 2) 10 $\mu\text{g/mL}$ de análogo de SIRO en la solución de reactivo de pretratamiento.
- 3) 10 $\mu\text{g/mL}$ de análogo de SIRO del reactivo de pretratamiento es equivalente a 46.7 $\mu\text{g/mL}$ de análogo de SIRO agregado de la muestra (Cálculo: $70 \mu\text{L} \times 10 \mu\text{g/mL} / 15 \mu\text{L} = 46.7 \mu\text{g/mL}$)
- 10 4. 4) Valor de sirolimus medido a 0 ng/mL de calibrador.
5. 5) Valor de medida/46.7% es de reactividad cruzada.

Tabla 1

Señal de instrumento observada para calibradores						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla V+VI (mAU)	Mezcla IX+X (mAU)	XI (mAU)	FKE (mAU)	Tacro (mAU)	
0.0	223	441	443	200	199	
5.1	281	450	447	273	242	
10.1	317	452	451	320	261	
20.6	359	455	450	375	300	
31.6	395	454	448	404	339	
Concentración de fármaco medida en ng / mL						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla V+VI (ng/mL)	Mezcla IX+X (ng/mL)	XI (ng/mL)	FKE (ng/mL)	Tacro (ng/mL)	
0.0	1.4	69.2	72.7	0.0	-0.1	
5.1	5.8	93.8	82.5	5.1	2.6	
10.1	9.7	100.7	96.4	10.1	4.1	
20.6	16.8	119.9	94.0	20.5	7.7	
31.6	27.5	113.0	85.2	31.6	13.0	

Porcentaje (%) desplazado vs. SIRO						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla V+VI (%)	Mezcla IX+X (%)	XI (%)	FKE (%)	Tacro (%)	
0.0						
5.1	114	1844	1622	100	52	
10.1	96	994	951	100	40	
20.6	82	584	458	100	38	
31.6	87	357	269	100	41	
Reactividad cruzada de anticuerpos calculada (porcentaje (%) por 100) medida a concentración de fármaco en calibrador de concentración de 0 ng/mL						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla V+VI (%x100)	Mezcla IX+X (%x100)	<u>XI</u> (%x100)	<u>FKE</u> (%x100)	<u>Tacro</u> (%x100)	
0	0.29	14.82	15.56	0.00	0.00	

El formato anterior para liberar un analito (usando la concentración del agente de liberación (Displacer) mostrado) y realizar un ensayo para el analito se repitió para las muestras que contienen tacrolimus. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Señal de instrumento observada para calibradores						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla (mAU)	V+VI	Mezcla (mAU)	IX+X	XI (mAU)	SIRO (mAU)
0.0	26		21		23	20
2.6	42		39		36	41
5.3	51		49		42	53
11.6	66		66		55	71
30.1	89		88		79	96
Concentración de fármaco medida en ng/mL						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla (ng/mL)	V+VI	Mezcla (ng/mL)	IX+X	XI (ng/mL)	SIRO (ng/mL)
0.0	0.6		0.0		0.3	0.0

ES 2 682 025 T3

Señal de instrumento observada para calibradores						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla (mAU)	V+VI	Mezcla (mAU)	IX+X	XI (mAU)	SIRO (mAU)
2.6	2.9		2.4		1.8	2.6
5.3	4.7		4.1		2.9	5.3
11.6	9.5		9.2		5.6	11.6
30.1	23.5		22.6		16.0	30.1
Porcentaje (%) desplazado vs. SIRO						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla V+VI (%)		Mezcla IX+X (%)		XI (%)	SIRO (%)
0.0						
2.6	111		90		68	100
5.3	89		78		54	100
11.6	82		79		48	100
30.1	78		75		53	100
Reactividad cruzada de anticuerpos calculada (porcentaje (%) por 100) medida a concentración de fármaco en calibrador de concentración de 0 ng/mL						
Concentración de fármaco en calibradores (ng/mL)	Mezcla (%x100)	V+VI	Mezcla (%x100)	IX+X	<u>XI (%x100)</u>	<u>SIRO (%x100)</u>
0	0.13		0.01		0.06	0.00

5 Los resultados demuestran que los ejemplos de compuestos (mezcla de V y VI) de acuerdo con los principios descritos en el presente documento eran adecuados como agentes liberadores para los analitos de sirolimus y tacrolimus en ensayos separados para sirolimus y tacrolimus. Los compuestos que no están de acuerdo con los principios descritos en el presente documento (mezcla de IX y X, XI, SIRO, Tacro y FKE) pero probados con fines de comparación exhibieron una eficacia de desplazamiento menor que la exhibida por los compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento. Tanto la mezcla de IX y X como el compuesto XI demostraron una mayor reactividad cruzada con el anticuerpo de ensayo de sirolimus y, por lo tanto, no son adecuados para ser utilizados como agentes de liberación en el inmunoensayo de sirolimus.

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición para liberar un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, en donde el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus o un derivado del mismo.

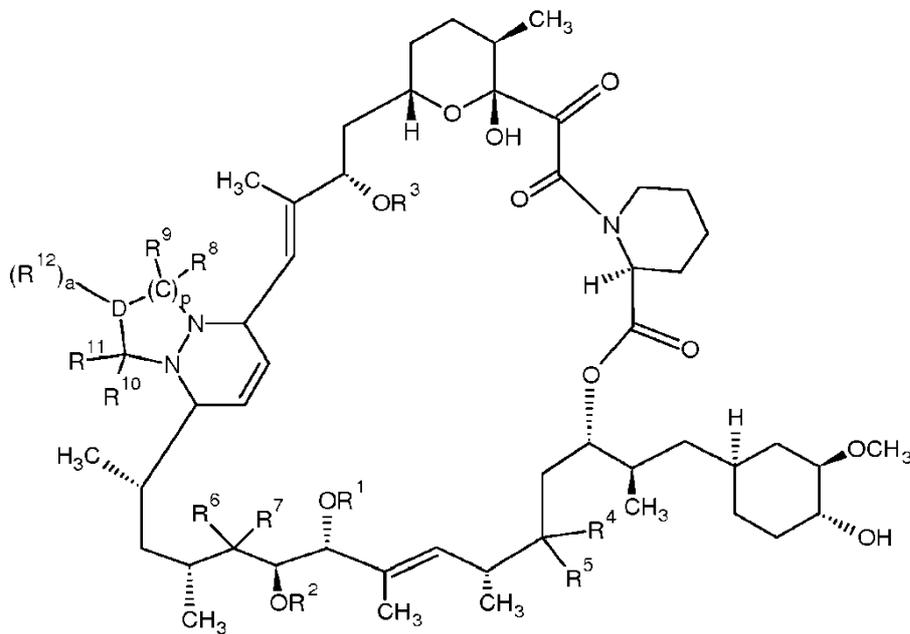
5 en donde los derivados de rapamicina y de tacrolimus son:

derivados preparados a través de la esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida,

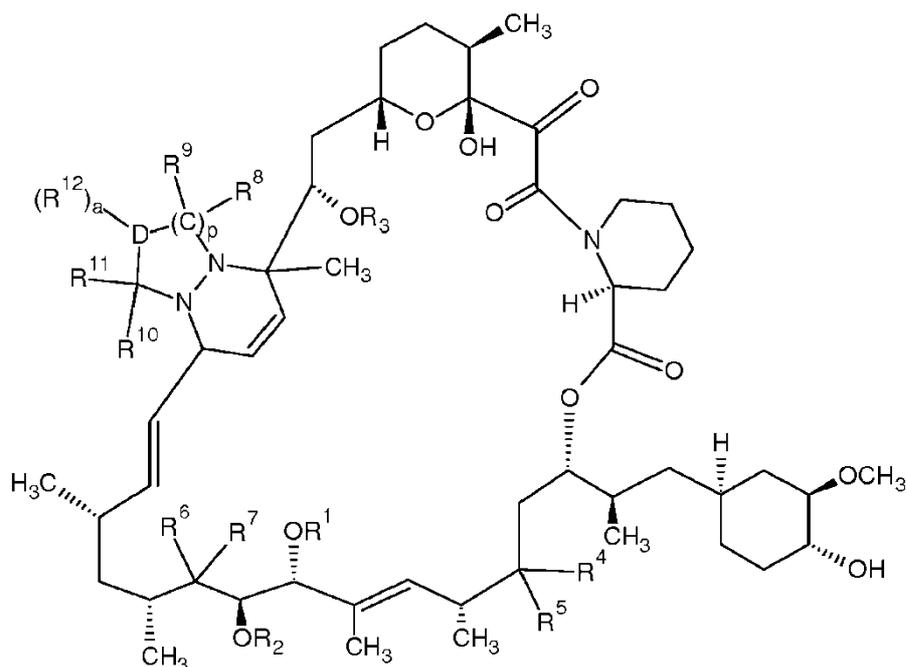
compuestos resultantes de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o reducción de uno o más de los dobles enlaces;

10 comprendiendo la composición:

(a) un compuesto de la fórmula:



o de la fórmula:



o una mezcla de los mismos;

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

5 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

10 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

15 p es 1, 2 o 3;

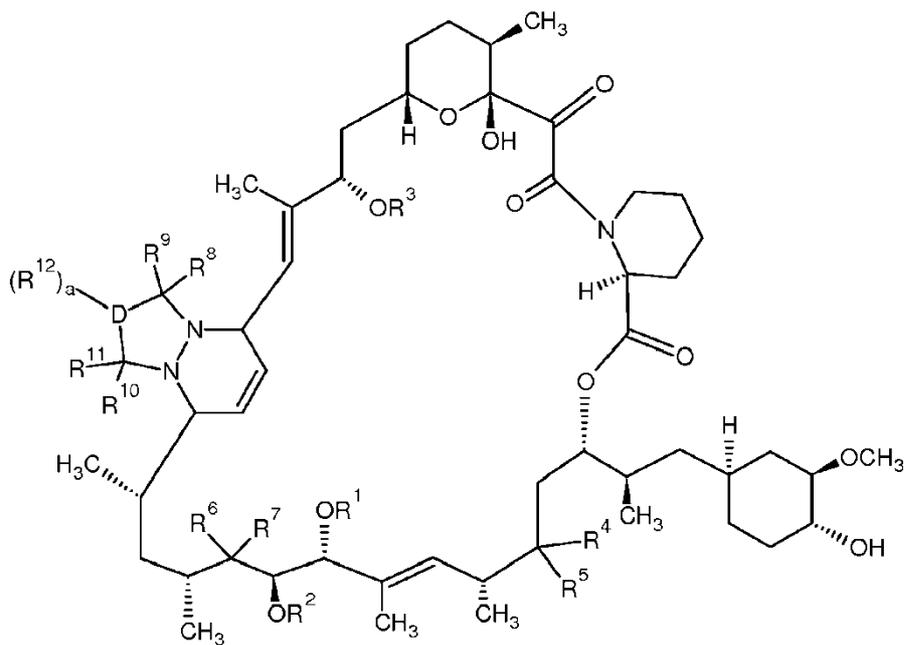
a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a sea 0 cuando D es O; y

(b) un medio regulado.

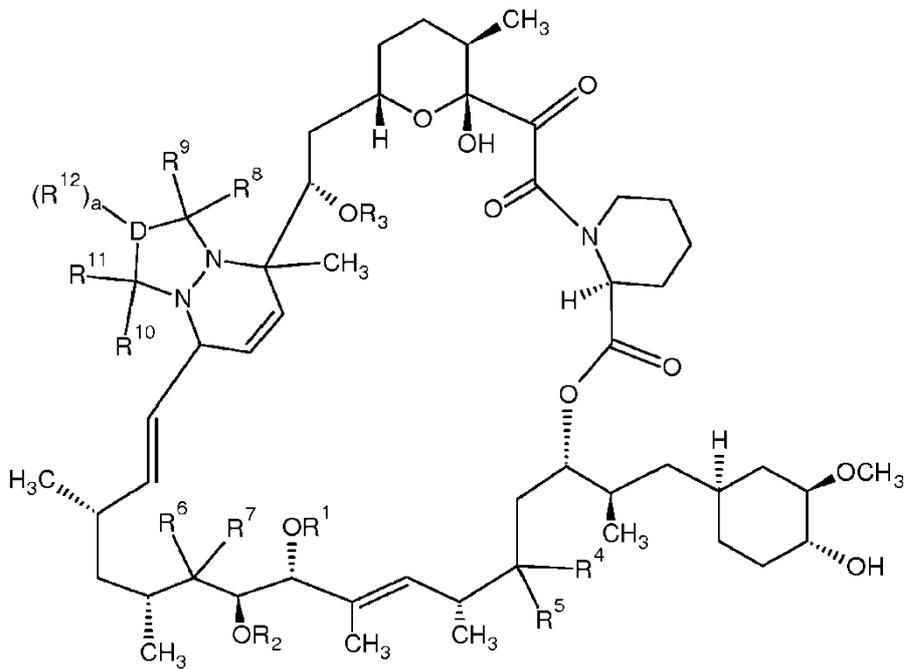
20 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un agente hemolítico, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en detergentes, soluciones acuosas de baja fuerza iónica, agentes bacterianos y anticuerpos que causan lisis dependiente del complemento o en donde la composición adicionalmente comprende uno o más de un agente anticoagulante y un conservante.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la fórmula:



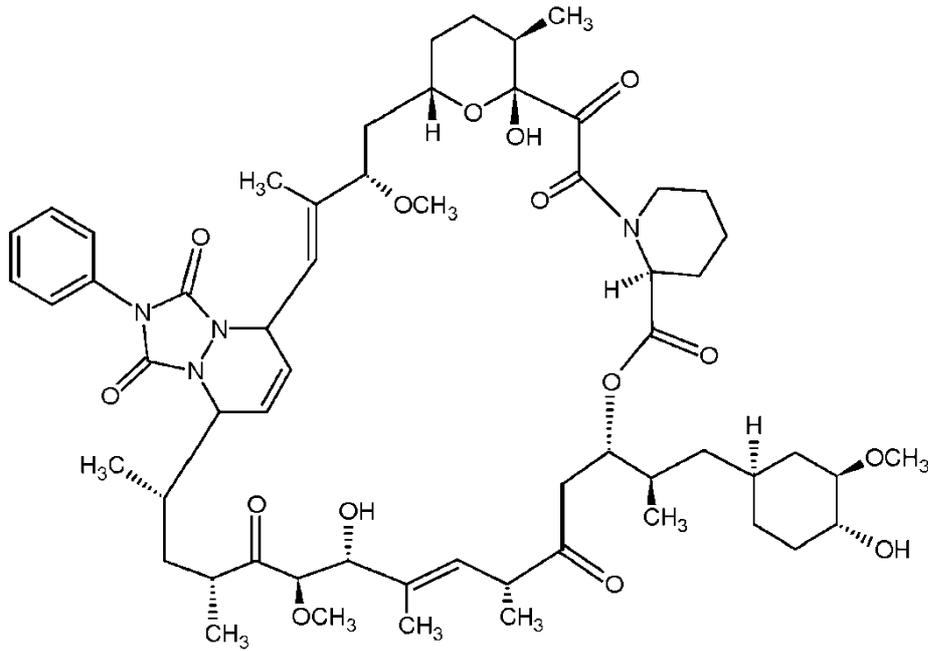
en donde R¹ a R¹², a y D tienen el significado que se indica en la reivindicación 1:

o en donde el compuesto tiene la fórmula:

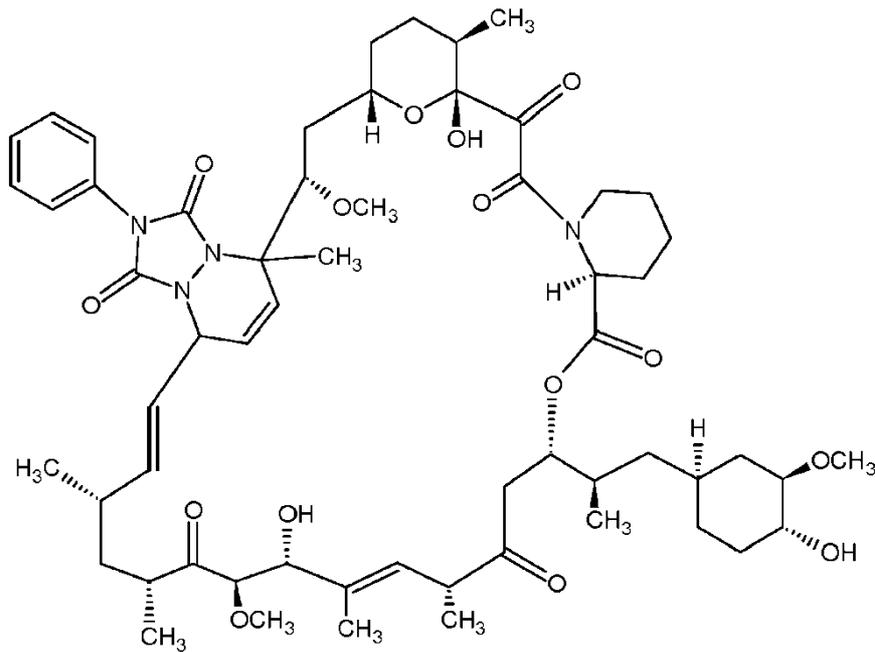


5 en donde R¹ a R¹², a y D tienen el significado indicado en la reivindicación 1;

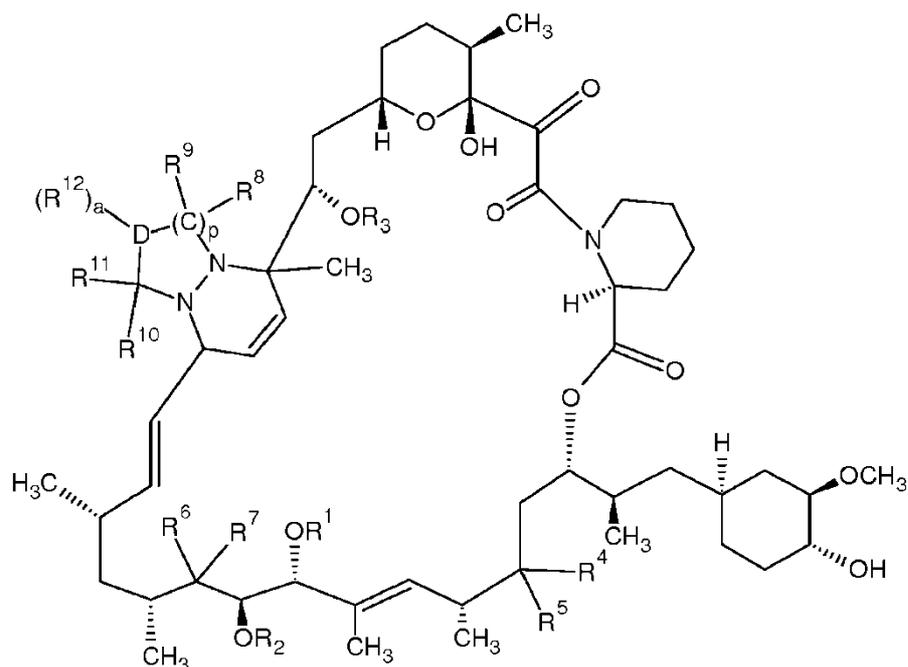
o en donde el compuesto tiene la fórmula:



o en donde el compuesto tiene la fórmula:



- 5 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:
- R¹ es H y R² y R³ son cada uno independientemente alquilo inferior;
 - R⁴ y R⁵ se toman juntos para formar un doble enlace a O;
 - R⁶ y R⁷ se toman juntos para formar un doble enlace a O;
 - R⁸ y R⁹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;
 - 10 R¹⁰ y R¹¹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;
 - R¹² es arilo;



o una mezcla de los mismos;

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

- 5 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo, o

N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂ o N-alquilo,

- 10 o N-O-alquilo;

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

- 15 R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

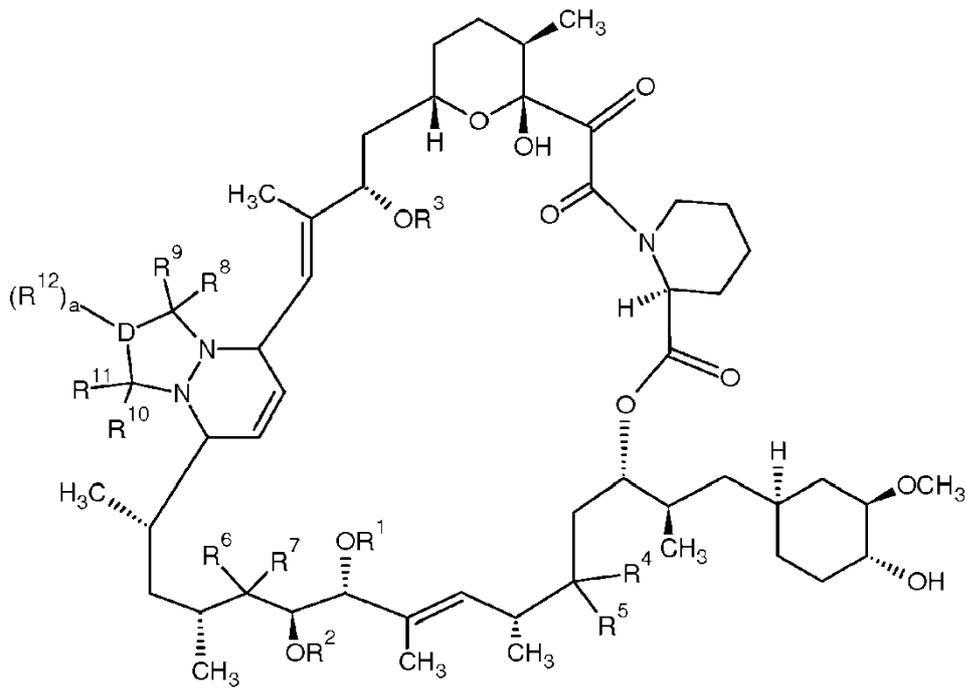
p es 1, 2 o 3;

a es 0 o 1; y

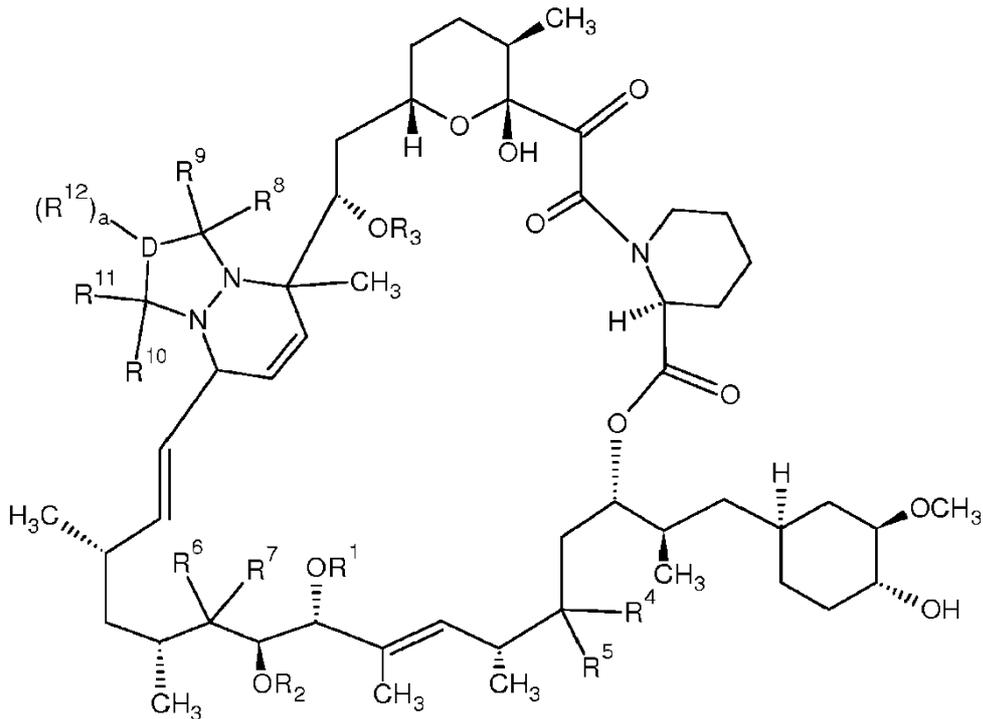
D es N, O o CH, con la condición de que a sea 0 cuando D es O; e

- 20 incubar la combinación en condiciones suficientes para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el compuesto es de fórmula:



o de la fórmula:



o una mezcla de los mismos;

5 en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

10 R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂ o N-alquilo, o N-O-alquilo;

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

- 5 R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso o un radical orgánico voluminoso;
en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O, e

- 10 incubar la combinación en condiciones suficientes para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde en la fórmula para el compuesto:

R¹ es H y R² y R³ son cada uno independientemente alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

R⁶ y R⁷ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

- 15 R⁸ y R⁹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

R¹⁰ y R¹¹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

R¹² es arilo;

a es 1;

D es N.

- 20 10. Un método para determinar una o ambas de la presencia y cantidad de un fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, en donde el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP es rapamicina, tacrolimus o un derivado del mismo, en donde los derivados de rapamicina y de tacrolimus son:

- 25 derivados preparados a través de la esterificación de uno o más grupos hidroxilo en un éster carboxílico, un carbamato, un éster de sulfonato o una amida,

compuestos resultantes de la reducción de uno o más carbonos de carbonilo a un grupo hidroxilo o reducción de uno o más de los dobles enlaces;

comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

- 30 (i) la muestra, y

(ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas, en donde el agente de liberación es un compuesto de la fórmula:

R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

5 R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

p es 1, 2 o 3;

a es 0 o 1; y

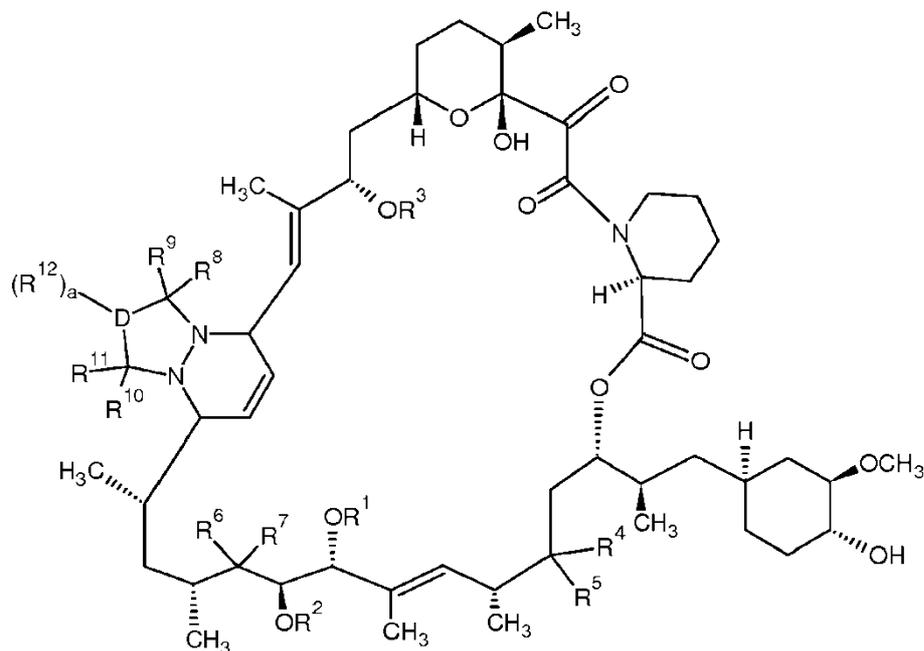
D es N, O o CH, con la condición de que a sea 0 cuando D es O;

10 (b) incubar el medio en condiciones para liberar el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP de sustancias de unión endógenas,

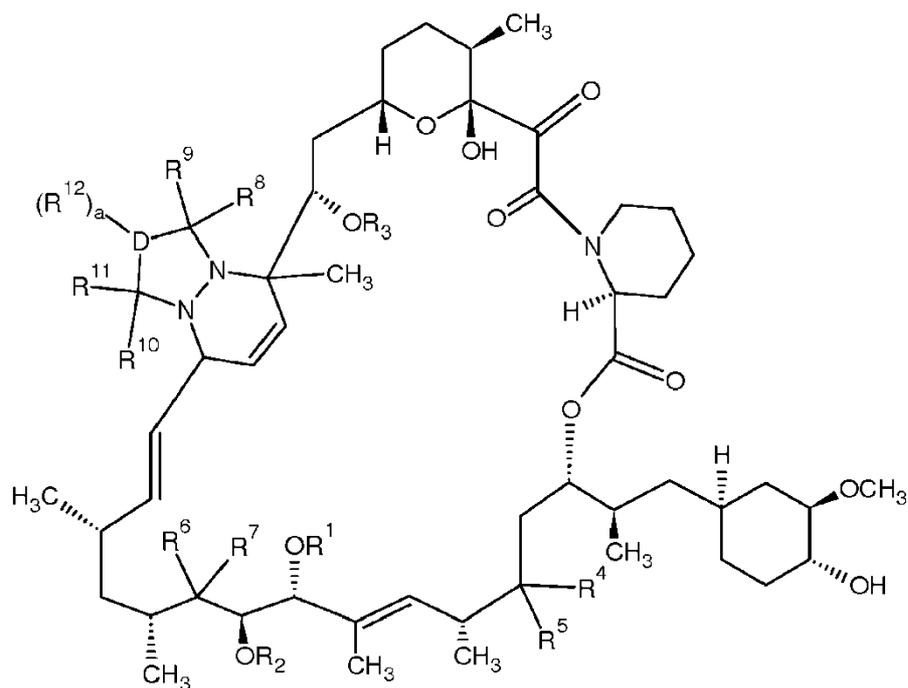
(c) añadir al medio reactivos para determinar la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en la muestra en la que los reactivos comprenden al menos un miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, y

15 (d) examinar el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP y el miembro de unión específico para el fármaco inmunosupresor de unión a FKBP, la presencia y/o cantidad del complejo que indica la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP en la muestra.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente de liberación es un compuesto de la fórmula:



20 o de la fórmula:



o una mezcla de los mismos;

en donde:

R¹, R² y R³ son cada uno independientemente H o alquilo inferior;

- 5 R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente H, hidrocarbilo inferior o hidrocarbilo inferior o se toman juntos para formar un doble enlace a O, CH₂, N-alquilo o N-O-alquilo;

- 10 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente H, radical orgánico no voluminoso o un radical orgánico voluminoso, o se toman juntos para formar un doble enlace a O o CH₂;

R¹² es H, hidrocarbilo no voluminoso, o un radical orgánico voluminoso;

en donde al menos uno de R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ o R¹² es un radical orgánico voluminoso;

- 15 a es 0 o 1; y

D es N, O o CH, con la condición de que a es 0 cuando D es O.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde en el compuesto del agente de liberación:

R¹ es H y R² y R³ son cada uno independientemente alquilo inferior;

R⁴ y R⁵ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

- 20 R⁶ y R⁷ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

R⁸ y R⁹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

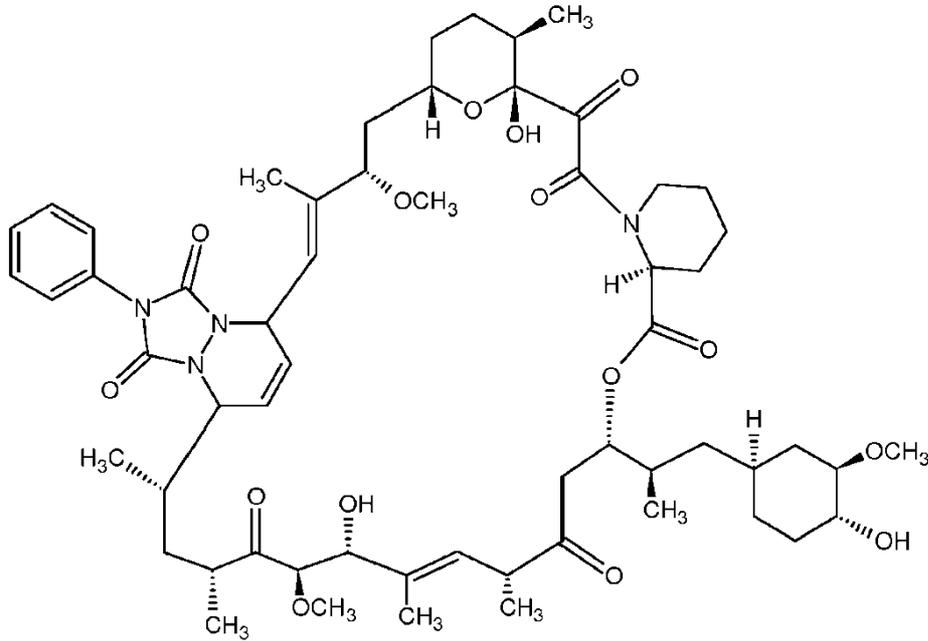
R¹⁰ y R¹¹ se toman juntos para formar un doble enlace a O;

R¹² es arilo;

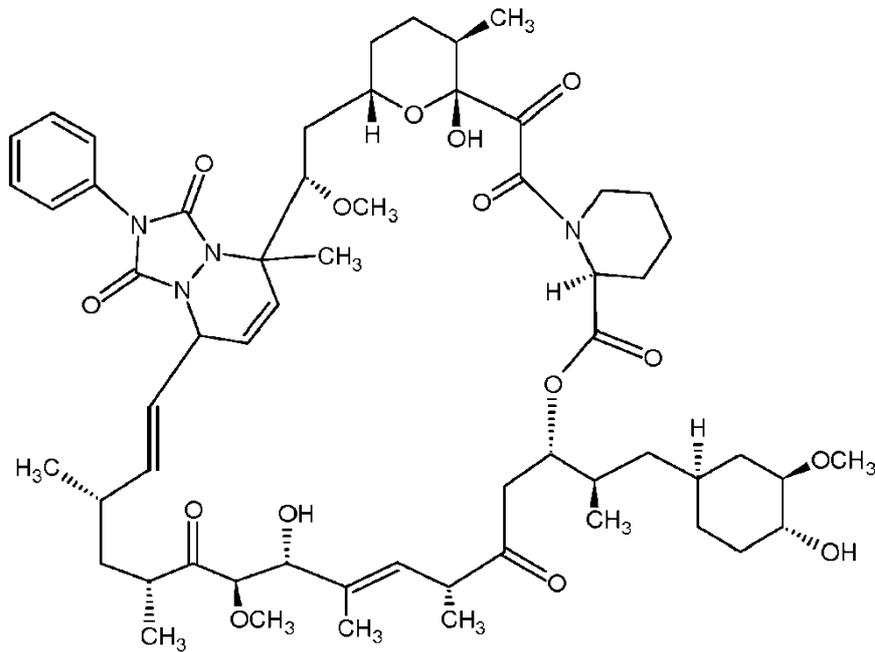
a es 1;

D es N.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el compuesto del agente de liberación tiene la fórmula:



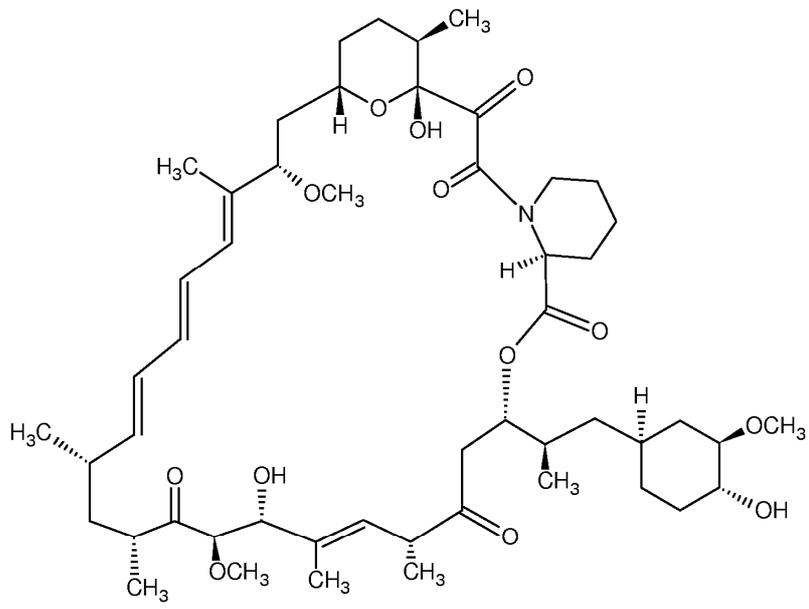
o la fórmula:



5

14. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los reactivos en la etapa (c) comprenden además un análogo del fármaco inmunosupresor de unión a FKBP que comprende un marcador.

10 15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde en la etapa (c) se añade un segundo miembro de unión específico al medio en donde el segundo miembro de unión específica se une al complejo.



Sirolimus

FIG. 1

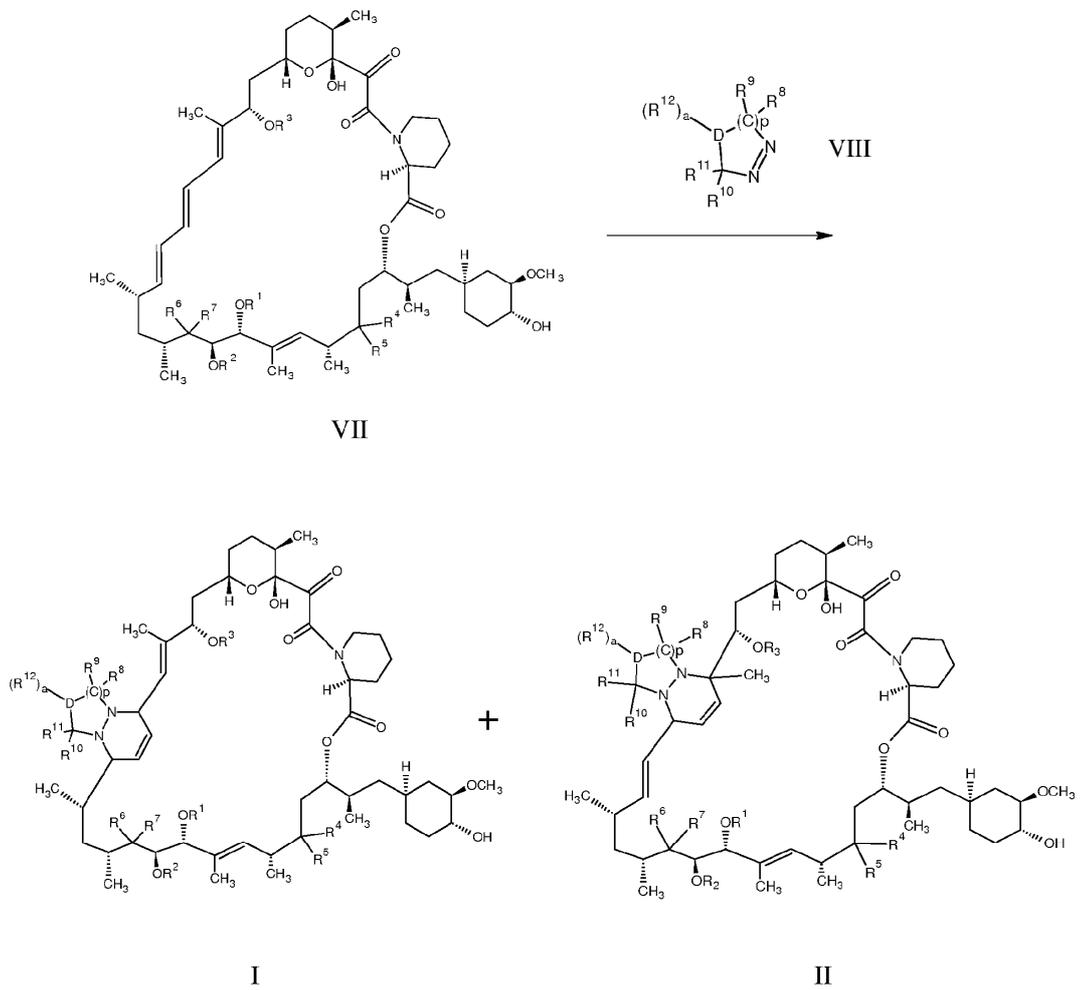


FIG. 3

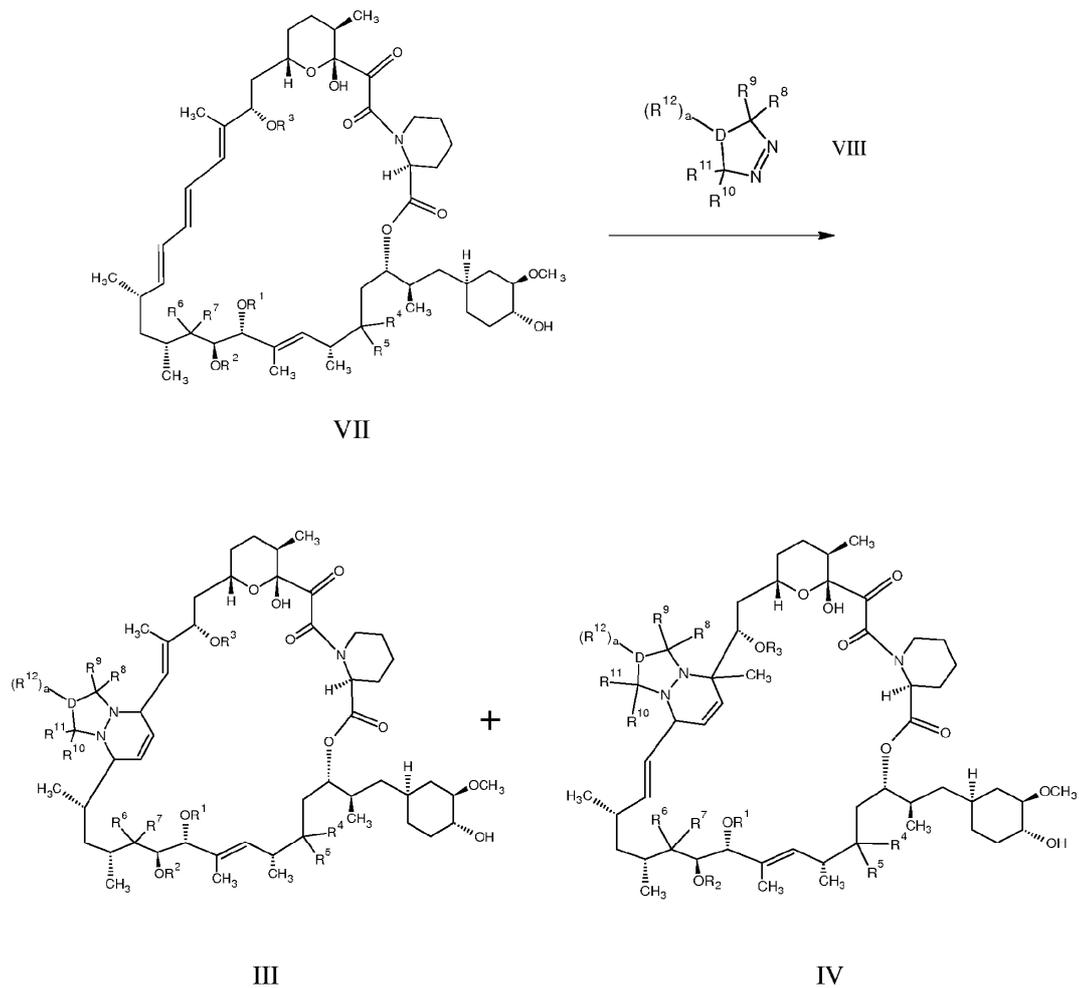


FIG. 4

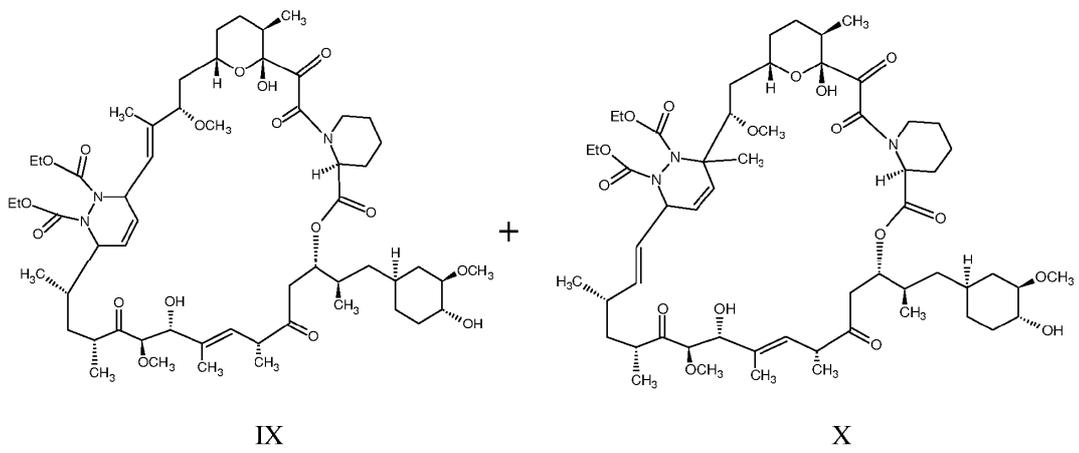


FIG. 6

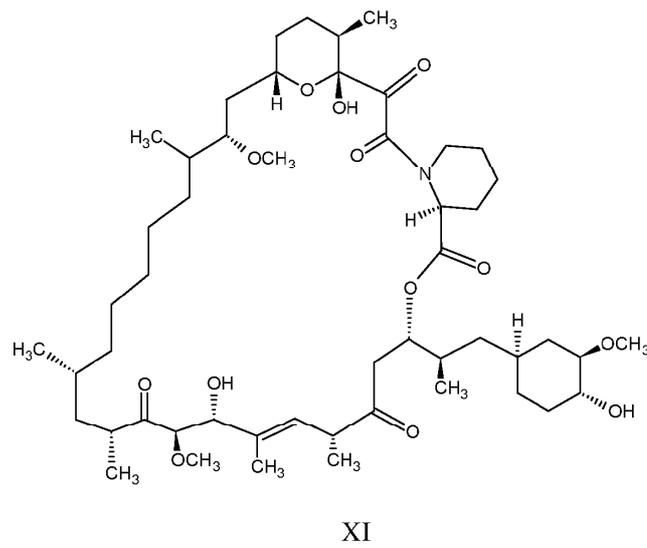


FIG. 7