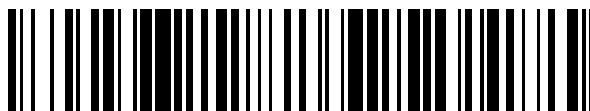


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 404**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2013 PCT/US2013/039810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13169689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 13787140 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2847588**

54 Título: **Determinación de la concentración total de analito**

30 Prioridad:

07.05.2012 US 201213465574

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

18.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEI, TIE Q.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 704 404 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

Determinación de la concentración total de analito.

Antecedentes

5 La invención se refiere a métodos y kits para la determinación de la concentración de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. Más particularmente, la invención se refiere a determinar la concentración de analito en muestras desconocidas en presencia de sustancias interferentes que participan en la generación de señales falsas en el formato de inmunoensayos convencionales.

10 El cuerpo se basa en un complejo sistema de respuesta inmune para distinguir lo propio de lo foráneo. A veces, el sistema inmunológico del cuerpo debe controlarse para aumentar una respuesta deficiente o suprimir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando los órganos como el riñón, el corazón, corazón-pulmón, la médula ósea y el hígado se trasplantan en seres humanos, el cuerpo a menudo rechazará el tejido trasplantado mediante un proceso denominado rechazo de aloinjerto.

15 Al tratar el rechazo de aloinjerto, el sistema inmunológico se suprime con frecuencia de forma controlada con la terapia con medicamentos. Los medicamentos inmunosupresores se administran con cuidado a los receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido no propio. Los dos fármacos inmunosupresores que se administran con mayor frecuencia para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados son la ciclosporina (CSA) y la FK-506 (FK o tacrolimus). Otro fármaco que se usa como inmunosupresor en los Estados Unidos y otros países es el sirolimus, también conocido como rapamicina. También se dice que algunos derivados de sirolimus son útiles como inmunosupresores. Tales derivados incluyen, por ejemplo, everolimus, y similares.

20 Los efectos secundarios asociados con algunos fármacos inmunosupresores pueden controlarse en parte controlando cuidadosamente el nivel del fármaco presente en un paciente. Se requiere un control terapéutico de las concentraciones de fármacos inmunosupresores y fármacos relacionados en la sangre para optimizar los regímenes de dosificación para garantizar la máxima inmunosupresión con una toxicidad mínima. Si bien los medicamentos inmunosupresores son agentes inmunosupresores altamente efectivos, su uso debe manejarse con cuidado porque el rango de dosis efectivo es a menudo estrecho y la dosis excesiva puede provocar efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosis muy pequeña de un inmunosupresor puede llevar al rechazo del tejido. Debido a que la distribución y el metabolismo de un fármaco inmunosupresor pueden variar mucho entre pacientes y debido a la gran variedad y severidad de las reacciones adversas, es esencial un control preciso del nivel del fármaco.

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

35 Muchos análisis de sangre entera para medicamentos inmunosupresores requieren un paso manual con reactivos para extraer el medicamento de los componentes de la sangre. Las moléculas del fármaco y las moléculas del metabolito del fármaco se disocian de las proteínas de unión endógenas y se extraen en una solución relativamente limpia en donde se eliminan las proteínas plasmáticas y las partículas de lipoproteína, así como la mayoría de las otras moléculas. Debido a que generalmente se usan técnicas de precipitación, la muestra extraída está básicamente libre de la mayoría de las macromoléculas sanguíneas, incluidas una o ambas proteínas de unión para los componentes del inmunoensayo y otras sustancias que pueden interferir con la señal del ensayo. Por lo tanto, en las muestras extraídas, el fármaco original y sus metabolitos se disuelven como moléculas individuales no unidas y compiten entre sí por la reacción con un anticuerpo de ensayo en la mezcla de inmunorreacción. La unión del anticuerpo del ensayo al fármaco se produce en ausencia de la mayoría de las sustancias de unión endógenas en estos ensayos. La reactividad cruzada de un metabolito fármaco depende principalmente de su afinidad de unión a anticuerpos en dichos ensayos.

50 En un ensayo homogéneo para un fármaco inmunosupresor en donde no hay extracción manual o separación del fármaco de los constituyentes de la sangre, un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor tiene que detectar el fármaco en presencia de la mayoría o todos los constituyentes de la sangre, la presencia de lo que podría interferir en el resultado del ensayo como, por ejemplo, con el anticuerpo del fármaco inmunosupresor, lo que lleva a un resultado falso del ensayo o interfiere con una medición de la concentración real del fármaco en la muestra de sangre.

55 Existe, por lo tanto, una necesidad continua de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir los niveles de analitos en muestras tomadas de un paciente. Los métodos deben ser completamente automatizables y precisos incluso cuando se realicen con muestras que contengan diversas sustancias interferentes. El ensayo debe proporcionar una medición precisa de la cantidad de analito en la muestra al tiempo que minimiza las imprecisiones resultantes de sustancias interferentes, particularmente sustancias interferentes no específicas, presentes en una muestra.

Resumen

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a métodos para determinar una cantidad total de un analito en una muestra desconocida sospechosa de contener el analito en presencia de sustancias interferentes endógenas potencialmente presentes en la muestra desconocida. Los métodos implican medir una cantidad [Y] de la porción del analito en la muestra desconocida que está unida por sustancias de unión endógena (analito unido) empleando un ensayo para el analito. Una cantidad [Z] de analito en la muestra desconocida que no está unida por sustancias de unión endógenas (analito libre) se determina mediante la fórmula: $[Z] = a[Y] + b$, en donde "a" y "b" están predeterminados realizando el ensayo en muestras que contienen cantidades conocidas de analito pero sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas. Al agregar [Y] (analito unido) y [Z] (analito libre) se obtiene una cantidad total [X] del analito en la muestra desconocida. Las sustancias de unión endógena comprenden inmunofilinas.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a los métodos para determinar una cantidad total de tacrolimus en una muestra desconocida que se sospecha que contiene tacrolimus en presencia de sustancias interferentes endógenas potencialmente presentes en la muestra desconocida. Una cantidad [Y] de la porción de tacrolimus que está unida por sustancias de unión endógenas se mide determinando una cantidad [V] de tacrolimus por medio de un ensayo realizado en una porción de la muestra en presencia de un agente capaz de desplazar tacrolimus a partir de sustancias de unión endógenas, determinando una cantidad [W] de tacrolimus por medio de un ensayo realizado en una porción de la muestra en ausencia del agente capaz de desplazar tacrolimus de sustancias de unión endógenas, y restando [W] de [V]. Una cantidad [Z] de tacrolimus que no está unida por sustancias de unión endógenas se determina mediante la fórmula: $[Z] = a[Y] + b$, en donde "a" y "b" se predeterminan al realizar el ensayo en muestras que contienen cantidades del analito de tacrolimus pero sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas. En la ecuación anterior, "a" es la pendiente de una regresión entre el analito que no está enlazado por sustancias de unión endógenas y el analito que está enlazado por sustancias de unión endógena y "b" es la intersección de la regresión. La cantidad total [X] de tacrolimus en la muestra desconocida se determina agregando [Y] y [Z].

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de una concentración de tacrolimus libre frente a una concentración de tacrolimus que está enlazada por sustancias de unión endógenas.

Descripción detallada de realizaciones específicas

30 Discusión General

Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a la medición precisa de una cantidad total de un analito en una muestra desconocida que potencialmente contiene sustancias interferentes endógenas. Aunque las muestras pueden tratarse con un agente de desplazamiento para desplazar el analito en una muestra desconocida de cualquier sustancia de unión endógena que pueda estar presente, las sustancias interferentes endógenas como, por ejemplo, proteínas interferentes no específicas que pueden estar presentes en la muestra desconocida, se unen a los componentes de inmunoensayo y dan como resultado una determinación inexacta de la concentración de analito en la muestra desconocida. Además, muchas muestras desconocidas no tienen sustancias endógenas que interfieran con una señal de ensayo; sin embargo, para aquellas muestras desconocidas que tienen tales sustancias, las cantidades de tales sustancias interferentes endógenas varían de una muestra a otra. De acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la concentración de analito real puede medirse en muestras desconocidas en presencia de sustancias interferentes endógenas tales como, por ejemplo, proteínas interferentes no específicas.

De acuerdo con los principios descritos en el presente documento, se establece una relación entre el analito que está unido por sustancias de unión endógenas (en lo sucesivo, "analito unido") y el analito que no está unido por sustancias de unión endógenas (en lo sucesivo, "analito libre") en muestras conocidas que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas, para determinar un conjunto de coeficientes, que luego se pueden emplear para determinar la concentración de analito real en muestras desconocidas en presencia de sustancias interferentes endógenas que puedan estar presentes en ellas. Las muestras que contienen cantidades conocidas de analito que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas como, por ejemplo, proteínas de unión, se someten a un ensayo para que el analito determine una relación entre el analito unido y el analito libre y los datos resultantes se someten a análisis de regresión. La cantidad de analito libre se representa en función de la cantidad de analito unido para que las muestras conocidas obtengan los coeficientes que se pueden emplear para calcular, para muestras que contienen una cantidad desconocida de analito y que potencialmente contengan sustancias interferentes endógenas, la cantidad total verdadera de analito en las muestras desconocidas. La relación entre el analito libre y el analito unido que se establece para un ensayo en particular y los reactivos que utilizan las muestras de concentración conocida puede emplearse para determinar la concentración de analito real para muestras con una concentración de analito desconocida, incluso aunque dichas muestras puedan contener sustancias interferentes endógenas como, por ejemplo, proteínas interferentes no específicas.

- La muestra por analizar puede ser no biológica o biológica. Las "muestras no biológicas" son aquellas que no están relacionadas 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 como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, una aspiración corporal, una escisión corporal o un extracto corporal. El cuerpo suele ser el de un mamífero y, en algunas realizaciones, el cuerpo es un cuerpo humano. Las excreciones corporales son aquellas sustancias que se excretan de un cuerpo (aunque también pueden obtenerse por escisión o extracción) como, por ejemplo, orina, heces, excrementos, mucosidad vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, fluido de ampollas y exudados inflamatorios. Las escisiones corporales son aquellos materiales que se extraen 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, moco, saliva y esputo. Los extractos corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, fluido espinal, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático, fluido sinovial y fluido peritoneal.
- El analito es una sustancia de interés o el compuesto o composición que se va a detectar y/o cuantificar. Los analitos incluyen, a título ilustrativo y no limitativo, fármacos terapéuticos, fármacos de abuso, metabolitos, pesticidas, compuestos orgánicos volátiles, compuestos orgánicos semivolátiles, compuestos orgánicos no volátiles, proteínas, polisacáridos, contaminantes, toxinas, lípidos y ácidos nucleicos, (ADN, ARN), por ejemplo.
- Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí tienen una aplicación particular a los analitos que están en muestras que contienen sustancias endógenas que se unen al analito. Tales sustancias de unión endógenas son aquellas que están presentes en una muestra tomada de su fuente. La naturaleza de las sustancias de unión endógena depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza de la fuente de la muestra, la naturaleza del analito y la naturaleza de un complejo molecular que comprende el analito, por ejemplo. Las sustancias de unión endógenas pueden ser tanto sustancias de unión endógenas como sustancias de interferencia endógenas.
- Las sustancias de unión endógena son inmunofilinas que están compuestas de categorías principales (por ejemplo, ciclofilina que se une a CsA, proteínas de unión a FK que se unen a tacrolimus y sirolimus) y menores. La categoría menor contiene dos grupos: uno con actividad de peptidilprolil cis/trans isomerasa (12, 25 y 56-50 kDa, el otro sin actividad de peptidilprolil cis/trans isomerasa (14, 37 y 52 kDa), diana de la rapamicina (TOR); glucoproteínas ácidas α 1, lipoproteínas, albúmina y globulinas, por ejemplo, o una combinación de dos o más de las anteriores.
- Las sustancias interferentes incluyen cualquier sustancia que interfiera con la producción de señal en un ensayo. La interferencia puede resultar de la unión de la sustancia interferente a uno o más componentes de un ensayo. Dichos componentes de ensayo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de ensayo, enzimas de señal, enlazadores, proteínas u otros reactivos que están presentes en un soporte sólido, y sustratos de reactivos de ensayo, por ejemplo. Las sustancias interferentes pueden ser, pero no se limitan a, proteínas de unión no específicas, por ejemplo. Como se mencionó anteriormente, la unión no específica se refiere a la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras de superficie específicas. Interferencias como la unión no específica pueden ser el resultado de varios factores, incluidas las interacciones hidrófobas entre las moléculas. La naturaleza de la molécula o moléculas que resultan en interferencias, como la unión no específica en los ensayos, dependen de una o más de la naturaleza de la muestra y la naturaleza de los componentes del inmunoensayo, por ejemplo. Las sustancias que interfieren, como las proteínas de unión no específicas, son aquellas a partir de las cuales el agente de desplazamiento no desplaza el analito como se describe más adelante.
- En algunos ejemplos, las sustancias interferentes incluyen, pero no se limitan a, materiales proteicos como, por ejemplo, inmunoglobulinas no específicas, sustancias que pueden causar aglutinación de reactivos; las sustancias pueden aumentar o disminuir la actividad de la enzima señal o la molécula señal en un ensayo como, por ejemplo, sustancias como, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a enzimas que producen señales (por ejemplo, conversión de un sustrato enzimático, por ejemplo, rojo de clorofenol (CPR), a un producto coloreado, por ejemplo, rojo de clorofenol - β -D-galactopiranosido (CPRG)); sustancias que disminuyen o aumentan la unión del anticuerpo de ensayo a un análogo de analito presente en un soporte sólido; sustancias que se unen a un reactivo conjugado señal como, por ejemplo, un conjugado de un anticuerpo y una enzima (conjugado enzima-anticuerpo), que incluyen sustancias que se unen a una o más partes componentes del conjugado enzima-anticuerpo como, por ejemplo, un grupo de enlace que une el anticuerpo y la enzima, el propio anticuerpo, la propia enzima, o una combinación de uno o más de los mismos; sustancias que pueden reducir o aumentar la unión del anticuerpo al analito; sustancias que pueden cambiar la conversión enzimática de un sustrato en un producto para la producción de una señal de ensayo, por ejemplo, materiales lipofílicos como, por ejemplo, lipoproteínas (por ejemplo, colesterol y triglicéridos), bicapa lipídica y membranas de plasma; células tales como, por ejemplo, glóbulos rojos, por ejemplo, o una combinación de dos o más de los anteriores.
- Los fármacos inmunosupresores son un grupo de analitos que son susceptibles de ser unidos por sustancias de unión endógena. Como se mencionó anteriormente, los medicamentos inmunosupresores son medicamentos terapéuticos que se administran a receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido no propio. Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar en cuatro grupos: glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre las inmunofilinas y otros fármacos, como los interferones, las proteínas de unión a INF,

opiáceos, micofenolato, FTY720 y similares. Una clase particular de medicamentos inmunosupresores comprende aquellos medicamentos que actúan sobre las inmunofilinas. Las inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión específica de alta afinidad que tienen importancia fisiológica. Actualmente se conocen dos familias distintas de inmunofilinas: ciclofilinas y macrofilinas, las últimas de las cuales se unen específicamente a, por ejemplo, tacrolimus o sirolimus. Los medicamentos inmunosupresores que actúan sobre la inmunofilina incluyen, por ejemplo, ciclosporina (incluyendo ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F,

ciclosporina G, ciclosporina H, ciclosporina I), tacrolimus (FK506, PROGRAF®), sirolimus (rapamicina, RAPAMUNE®) y everolimus (RAD, CERTICAN®), por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a métodos para determinar una cantidad total verdadera de un analito en una muestra desconocida sospechosa de contener el analito en presencia de sustancias interferentes endógenas. El ensayo y los reactivos de ensayo se usan primero en muestras conocidas que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas para determinar ciertos coeficientes. Una ecuación que emplea estos coeficientes se puede usar para calcular las cantidades totales de analito en muestras desconocidas, en presencia de sustancias interferentes endógenas, simplemente mediante la determinación de una cantidad de analito en la muestra desconocida que está unida por sustancias de unión endógenas y utilizando la ecuación. Como se discutió anteriormente, los ensayos se realizan en muestras que contienen cantidades conocidas del analito para determinar las cantidades de analito libre y las cantidades de analito unido para cada una de las muestras que contienen cantidades diferentes pero conocidas de analito. A partir de un análisis de regresión de la gráfica de datos de mediciones de analito libre y analito unido, se determinan los coeficientes que se pueden usar en una ecuación para calcular la concentración total de analito en muestras que contienen cantidades desconocidas del analito, independientemente de la presencia de sustancias interferentes endógenas.

Como se mencionó anteriormente, los coeficientes se determinan realizando ensayos en muestras que contienen cantidades conocidas de analito y representando los datos resultantes. Las muestras están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas. La concentración de analito en las muestras conocidas debe abarcar el rango de concentración de interés sospechoso del analito en las muestras desconocidas. Las muestras conocidas se pueden preparar agregando cantidades conocidas de analito a una muestra biológica o una muestra no biológica similar a la preparación de calibradores. Por otro lado, las muestras pueden seleccionarse de aquellas que se sabe que contienen ciertas cantidades de analito pero que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas. En cualquiera de las dos metodologías, el número de muestras de diferentes concentraciones conocidas de analito para determinar los coeficientes depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza de la muestra, la naturaleza de las sustancias de unión endógena y la naturaleza de los reactivos de ensayo o componentes, por ejemplo. En ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí, el número de muestras de diferentes concentraciones de analito conocidas para la determinación debe ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, o aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o aproximadamente 4 a aproximadamente 5, o aproximadamente 5 a aproximadamente 7, por ejemplo. Las cantidades conocidas de analito deben variar de una muestra a otra en aproximadamente 1% a aproximadamente 10 000%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 1 000%, o aproximadamente 50% a aproximadamente 300%, por ejemplo, con una diferencia entre 0 cantidades de analito y la siguiente cantidad más alta es al menos aproximadamente 30 ng/mL, o al menos aproximadamente 50 ng/mL, o al menos aproximadamente 75 ng/mL, por ejemplo. En algunos ejemplos, las muestras que contienen cantidades conocidas de analito se preparan añadiendo una muestra a una cantidad deseada del analito.

Como se mencionó anteriormente, las muestras conocidas deben estar sustancialmente libres de sustancias interferentes. La expresión "sustancialmente libre de sustancias interferentes" significa que las muestras conocidas no contienen tales sustancias en una cantidad que afecte el resultado de la medición en más de aproximadamente el 10%, o en más de aproximadamente el 5%, o en más de aproximadamente el 3% o por más del 1%. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, se pueden obtener muestras sustancialmente libres de sustancias interferentes sometiendo las muestras a análisis mediante un método tal como, entre otros, cromatografía líquida, espectrometría de masas o una combinación de los mismos, como por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)-espectrometría de masas estándar (LCMS²), por ejemplo, y selección de muestras que son negativas para sustancias interferentes. Otros enfoques incluyen la realización del ensayo en cuestión en las muestras y la selección de aquellas que no dan ninguna señal relacionada con el analito. La expresión "sustancialmente ninguna señal relacionada con el analito" significa que la señal medida en el ensayo no es detectable o que la proporción de analito unido sobre el analito total ($[Y]/[X]$) es mayor que aproximadamente 50%, o mayor que aproximadamente 60%, o mayor que aproximadamente 70%, o mayor que aproximadamente 80%, o aproximadamente mayor que 90%, o mayor que aproximadamente 95%, o mayor que aproximadamente 99%, o es el rango de aproximadamente 50% a aproximadamente 99.99% o aproximadamente 60% a aproximadamente 99.99% o aproximadamente 70% a aproximadamente 99.99% o aproximadamente 80% a aproximadamente 99.99% o aproximadamente 90% a aproximadamente 99.99%.

El ensayo en las muestras conocidas es el ensayo que se va a usar en las muestras desconocidas. La determinación de los coeficientes es para el método de ensayo y los reactivos de ensayo que se utilizan para realizar el ensayo en

muestras desconocidas. El ensayo se realiza en muestras que contienen cantidades conocidas de analito tanto en presencia de un agente de desplazamiento (para medir una cantidad de analito unido y una cantidad de analito libre) como en ausencia de un agente de desplazamiento (para medir la cantidad de analito libre). La señal de ensayo que se mide en las distintas muestras se convierte en valores para la cantidad de analito libre en la muestra más analito que está enlazado por sustancias de unión endógenas (ensayo realizado con la adición de un agente de desplazamiento) y en valores por la cantidad de solo analito libre en la muestra (ensayo realizado en ausencia de un agente de desplazamiento). La sustracción de este último del anterior produce la cantidad de analito en la muestra que está unida por sustancias de unión endógenas. Los resultados se someten a un análisis de regresión en donde la cantidad de analito libre en la muestra se representa frente a la cantidad de analito unido en la muestra. Un coeficiente es variable y corresponde a la pendiente de la regresión y un coeficiente es constante y corresponde a la intersección de la regresión. Los valores del coeficiente variable (dependiente) y el coeficiente constante (independiente) se pueden usar para calcular una cantidad total del analito en muestras que contienen cantidades desconocidas de analito y potencialmente contienen sustancias interferentes endógenas, como se explica más detalladamente a continuación.

Los métodos para determinar las cantidades totales de analito en muestras desconocidas implican medir una cantidad [Y] del analito en la muestra desconocida que representa el analito que está unido por sustancias de unión endógenas (analito unido) empleando un ensayo para el analito. Una cantidad [Z] de analito en la muestra desconocida que no está unida por sustancias de unión endógenas (analito libre) se determina mediante la fórmula: $[Z] = a[Y] + b$, en donde "a" y "b" son coeficientes referidos anteriormente para ensayos realizados en muestras que contienen cantidades conocidas del analito pero sustancialmente libres de sustancias interferentes. Al agregar [Y] y [Z] se obtiene la cantidad total [X] del analito en la muestra desconocida, que se determina en presencia de sustancias interferentes endógenas en la muestra desconocida. El coeficiente "a" es un coeficiente dependiente y el coeficiente "b" es un coeficiente independiente. Como se mencionó anteriormente, los coeficientes "a" y "b" se determinan mediante la realización de ensayos en muestras que contienen cantidades conocidas de analito y el trazado de los datos resultantes. Los valores de "a" y "b" se pueden usar para calcular la cantidad total del analito en muestras que contienen cantidades desconocidas de analito en presencia de sustancias interferentes.

Ciertos aspectos de la siguiente discusión se aplican a los ensayos tanto para las muestras conocidas como para las muestras desconocidas. Como se explica con más detalle a continuación, se puede emplear cualquier ensayo. El ensayo comprende agregar reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra. En algunas realizaciones, el ensayo es un inmunoensayo y los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito. Se mide una cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito. La medición de un nivel de señal generado solo por el analito libre y el generado por el analito libre más el analito unido por sustancias de unión endógenas se realiza utilizando el ensayo. Los ensayos realizados en las porciones de muestra se pueden llevar a cabo de forma secuencial o concomitante en recipientes de reacción separados o secuencialmente en el mismo recipiente de reacción para cada porción de muestra. La expresión "complejo que comprende el anticuerpo para el analito" se refiere a un complejo en donde el anticuerpo para el analito está complejoado con el analito en la muestra.

La cantidad del analito unido se mide al someter una porción de una muestra a un ensayo en donde, antes o durante el ensayo, la muestra se trata con un agente que desplaza el analito unido de las sustancias de unión endógena. El agente de desplazamiento desplaza el analito que está unido por sustancias de unión endógenas. De esta manera, la cantidad de analito que se mide es la que estaba unida por las sustancias de unión endógenas, pero ahora está desplazada más la cantidad de analito libre (es decir, el analito en la muestra que no está enlazado por las sustancias de unión endógenas). Para medir una cantidad de analito libre, otra porción de la muestra se somete a un ensayo en donde la muestra no se trata con un agente de desplazamiento de este tipo. La resta de este último del anterior produce una cantidad [Y] de analito que está unida por sustancias de unión endógenas en la muestra. Un agente que desplaza el analito de las sustancias de unión endógenas se denomina aquí un agente de desplazamiento. La naturaleza del agente de desplazamiento depende de una o más de la naturaleza del analito y, en menor grado, de la naturaleza de las sustancias de unión endógenas, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, las mediciones del analito se llevan a cabo en muestras que han sido tratadas con un agente de desplazamiento y muestras que no se han tratado con un agente de desplazamiento para determinar la cantidad de analito unido más analito libre y la cantidad de analito libre, sólo, respectivamente. La resta de este último del anterior produce la cantidad de analito unido en la muestra. Como se mencionó anteriormente, una porción de la muestra se emplea para realizar ensayos para determinar una cantidad de analito unido. Para las mediciones, la porción de muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. El tamaño de la porción de muestra depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los diversos reactivos para realizar el ensayo y la naturaleza del complejo que comprende el analito, por ejemplo. El tamaño de la porción de muestra debe ser sustancialmente el mismo para ambas mediciones. En algunas realizaciones, el volumen de la porción de muestra es de aproximadamente 1 μL a aproximadamente 100 μL , o de aproximadamente 2 μL a aproximadamente 100 μL , o de aproximadamente 5 μL a aproximadamente 100 μL , o de aproximadamente 10 μL a aproximadamente 100 μL , o de 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 , para ejemplo.

- La porción de la muestra para realizar un ensayo para obtener una medición del analito que está unido por sustancias de unión endógena implica tratar la muestra con un agente de desplazamiento como se explicó anteriormente. La cantidad de agente de desplazamiento que se agrega a la muestra es la suficiente para desplazar sustancialmente todo el analito de las sustancias de unión endógena, de modo que la señal obtenida en un ensayo en la muestra sea representativa de la cantidad de analito que se unió por las sustancias de unión endógenas y de la cantidad de analito libre en la muestra. De acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la expresión "desplaza sustancialmente todo el analito que está unido por sustancias de unión endógenas" significa que el analito está al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos 99%, o al menos 99.5%, o al menos 99.9% o está 100% desplazado de las sustancias de unión endógena y disponible para detección durante un ensayo.
- Después de la adición de un agente de desplazamiento, la muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para desplazar sustancialmente todo el analito de las sustancias de unión endógena. La duración y las condiciones de la incubación dependen de una o más de la naturaleza del agente de desplazamiento, la naturaleza del analito y la concentración sospechosa del analito, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser de aproximadamente 5°C a aproximadamente 99°C, o aproximadamente de 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 de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. La incubación puede llevarse a cabo en un medio que, por conveniencia, puede ser un medio de ensayo como se discute aquí, pero no es necesario.
- Para determinar una cantidad de analito en la muestra que está libre, una porción de la misma muestra se somete al ensayo sin tratamiento con un agente de desplazamiento. El ensayo se lleva a cabo como se describe anteriormente para la muestra que se trató con un agente de desplazamiento. La cantidad de analito libre se resta de la cantidad tanto de analito libre como de analito unido como se discutió anteriormente para obtener una cantidad de solo el analito unido. Para muestras desconocidas, esta cantidad del analito unido se emplea para calcular la cantidad total de analito en la muestra. La cantidad de analito unido se representa en la fórmula anterior mediante [Y]. Habiendo determinado previamente los valores para "a" y "b" para un ensayo particular y un conjunto de reactivos de ensayo que utilizan muestras que contienen cantidades conocidas de analito pero sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas, una cantidad [Z] de analito en la muestra desconocida que no está unido por sustancias de unión endógena (analito libre) se determina por la fórmula: $[Z] = a[Y] + b$. Al agregar [Y] y [Z] se obtiene la cantidad total [X] del analito en la muestra desconocida, que se determina en presencia de sustancias interferentes en la muestra desconocida.
- El agente de desplazamiento puede ser cualquier unidad estructural, ya sea un compuesto único o una mezcla de compuestos, que logre el resultado deseado del desplazamiento del analito de sustancias de unión endógena sin unión significativa a reactivos de ensayo como, por ejemplo, un anticuerpo de ensayo. En algunos ejemplos, el agente de desplazamiento desplaza el analito, y sus metabolitos, si es necesario, de sustancias de unión endógenas para hacer que tanto el analito como los metabolitos sean sustancialmente accesibles para un asociado de unión para el analito, como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito.
- En algunas realizaciones, el agente de desplazamiento es un análogo, que incluye análogos estructurales, del analito. Un análogo de analito es un analito modificado que puede desplazar el analito análogo de una sustancia de unión pero no compite en ningún grado sustancial por un receptor como un anticuerpo para el analito. La modificación puede proporcionar medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno con un enlace que une el análogo del analito a un centro o etiqueta, pero no es necesario. El análogo de analito puede ser, por ejemplo, una molécula relacionada estructuralmente con el analito, y el analito conjugado con otra molécula a través de un grupo de enlace, por ejemplo. Para los analitos que comprenden una funcionalidad hidroxilo o ácido carboxílico, el agente de desplazamiento puede ser un éster del analito, que tiene una alta afinidad de unión por sustancias de unión endógenas en relación con el analito por detectar y que no tiene afinidad de unión significativa por un anticuerpo para el analito. Un análogo estructural es una unidad estructural que tiene características estructurales o espaciales iguales o similares a las del analito, de modo que el análogo estructural logra el mismo resultado o resultado similar al análogo del analito al desplazar el analito de las sustancias de unión endógenas. El análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el analito.
- En el caso de un fármaco inmunosupresor, el análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el fármaco inmunosupresor. En un ejemplo de un agente de desplazamiento para una determinación de tacrolimus, a modo de ilustración y no de limitación, puede emplearse un éster de tacrolimus (por ejemplo, FK506) como agente de desplazamiento, siempre que cumpla con los requisitos anteriores. En otro ejemplo, en una determinación para sirolimus, se puede emplear un éster de tacrolimus como agente de desplazamiento. El éster puede ser, por ejemplo, un carbamato, un carbonato o un éster de un ácido carboxílico de C1 a C6. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,186,518. Otros ejemplos de agentes de desplazamiento incluyen, pero no se limitan a, [Thr2, Leu5, D-Hiv8, Leu10]-ciclosporina A para la ciclosporina A, FK506 para sirolimus y sirolimus para FK506, por ejemplo. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,187,547.

La concentración del agente de desplazamiento en el medio es la suficiente para lograr el resultado deseado de desplazar sustancialmente todo el analito, y en algunos casos los metabolitos del analito, de sustancias de unión endógenas para hacer el analito, y los metabolitos si se desea, accesible para unirse a un anticuerpo para el analito como se discutió anteriormente. La cantidad o concentración del agente de desplazamiento empleado depende de una o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del analito, la naturaleza de los metabolitos del analito, la naturaleza de otros componentes reactivos y las condiciones de reacción, por ejemplo. En algunas realizaciones, la cantidad de agente de desplazamiento es 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 en peso/volumen).

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

En algunas realizaciones, se emplea un agente hemolítico, que es un agente que rompe las membranas celulares en las que puede atraparse el analito. Por ejemplo, un analito que está atrapado dentro de los glóbulos rojos puede ser liberado de los glóbulos rojos empleando un agente hemolítico. Un agente hemolítico es un compuesto o mezcla de compuestos que rompe la integridad de las membranas de los glóbulos rojos, desplazando así los contenidos intracelulares de las células y, en particular, los eritrocitos. Se conocen numerosos agentes hemolíticos en la técnica. Los agentes hemolíticos incluyen, por ejemplo, detergentes no iónicos, detergentes aniónicos, detergentes anfóteros, soluciones acuosas de baja fuerza iónica (soluciones hipotónicas), agentes bacterianos, anticuerpos que causan lisis dependiente del complemento, y similares.

Los detergentes no iónicos que pueden emplearse como agente hemolítico incluyen tanto detergentes sintéticos como 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 (monooleato polioxietileno (20) de sorbitán), DOWFAX®, ZONYL®, palmitato de pentaeritrito, ADOGEN® 464, ALKANOL® 6112 surfactante, alcohol alílico 1,2-butoxilato-etoxilato de bloque HLB 6, BRIJ®, etilendiamina tetrakis - propoxilato)tetrol, IGEPAL®, MERPOL®, poli(etilenglicol), 2-[etil[(heptadecafluorooctil)sulfonil]amino]etil éter, polietileno-bloque-poli(etilenglicol), polioxietileno sorbitano tetraoleato, polioxietileno sorbitol hexaoleato, TERGITOL® NP-9, GAFAC® (RHODAFAC®, un éster de fosfato de alquilpolioxietilenglicol tal como, por ejemplo, alfa-dodecil-omega-hidroxiolil(oxi-1,2-etanodil)fosfato), y EP110® y similares. Los detergentes naturales que se pueden emplear como agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, ácidos grasos neutralizado con sodio o potasio, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidil serina neutralizada, fosfatidato, fosfatidil etanolamina neutralizada, fosfatidil etanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidil inositol, fosfatidilcolina, sales biliares, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También se pueden emplear combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes naturales y combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes naturales.

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

Descripción general de ensayos para un analito.

Se puede emplear cualquier ensayo adecuado para determinar los resultados de la medición del ensayo, como se discutió anteriormente. Los ensayos pueden llevarse a cabo en las porciones de muestra como una continuación inmediata del tratamiento de las porciones con un agente de desplazamiento como se discutió anteriormente o el ensayo se puede llevar a cabo en un punto posterior. Los ensayos se realizan combinando las porciones de muestra respectivas con reactivos para determinar la cantidad de analito en la muestra. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo por realizar. En general, el ensayo es un método para la determinación de la cantidad de un analito en una muestra. El ensayo puede ser un inmunoensayo o un no inmunoensayo. A continuación se describen varios métodos de ensayo a modo de ilustración y no de limitación.

En muchas realizaciones, los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito y el ensayo generalmente se denomina inmunoensayo, a diferencia de los ensayos que no utilizan un anticuerpo, que se denominan no inmunoensayos. Por la expresión "anticuerpo para el analito" se entiende un anticuerpo que se une específicamente

al analito (y a los metabolitos del analito si se desea) y no se une en ningún grado significativo a otras sustancias que distorsionarían el análisis del analito.

5 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 como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el analito. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los cuales los reactivos marcados modulan la señal de la marca en las reacciones de unión de analito-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados con reactivos de anticuerpos marcados para el analito que evitan el uso de haptenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, un analito inmovilizado en fase sólida está presente en una cantidad constante y limitada. La partición de una etiqueta entre el analito inmovilizado y el analito no inmovilizado depende de la concentración de analito en la muestra.

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

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

20 Como se discutió anteriormente, un anticuerpo seleccionado para su uso en un inmunoensayo para un analito, por ejemplo, debería unirse específica y preferentemente al analito (y sus metabolitos farmacéuticamente activos, si es necesario o deseable) sobre otros ligandos como otros metabolitos o sustancias relacionadas.

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

30 Como se discutió anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica una unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores, incluidas las interacciones hidrófobas entre las moléculas. En muchas realizaciones de ensayos, los socios de unión preferidos son anticuerpos y los ensayos se denominan inmunoensayos.

35 Como se discutió anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica una unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores, incluidas las interacciones hidrófobas entre las moléculas. En muchas realizaciones de ensayos, los socios de unión preferidos son anticuerpos y los ensayos se denominan inmunoensayos.

40 Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que involucran reactivos no marcados generalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que involucran uno o más anticuerpos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitina y aglutinación y técnicas correspondientes de dispersión de la luz tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida y ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

45 En algunas realizaciones se pueden emplear inmunoensayos homogéneos; dichos ensayos también pueden denominarse inmunoensayos esencialmente libres de partición. Los presentes métodos se aplican a ensayos homogéneos totalmente automatizados en los que, antes del ensayo, no se extrae ni se separa el analito de otros constituyentes de la muestra, incluidos los metabolitos del analito. En un ensayo de "extracción no manual", una muestra como una muestra de sangre entera, sin extracción en, por ejemplo, un solvente orgánico, se combina con reactivos para realizar un análisis del analito en un medio adecuado y se realiza el método de ensayo. Los métodos actuales también encuentran aplicación a los ensayos de extracción manual.

50 Los ensayos se pueden realizar sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT®

(Syva Company, San Jose, CA) descrito en Rubenstein, et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los descritos en Ullman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") como los descritos en Maggio et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se describe, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de los Estados Unidos No. 5,354,693; etc.

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

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoensayos ("LIA"); inmunoensayos marcados con éster de acridinio que usan partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayos ADVIA Centaur); etc. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que involucran el monitoreo de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada por anticuerpos tras la unión de un medicamento hidrofóbico. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodos amperométricos, y similares.

En muchos de los ensayos descritos en el presente documento para la determinación de un analito, se emplea una etiqueta; la etiqueta suele ser parte de un sistema de producción de señales ("sps"). La naturaleza de la etiqueta depende del formato de ensayo particular. Un SP 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 sin unir, es decir, la cantidad de etiqueta unida o no unida al analito que se detecta o a un agente que refleje la cantidad de analito que se va a detectar. La etiqueta es cualquier molécula que produce o puede inducirse 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 se mide detectando la actividad de la enzima, la luminiscencia, la absorbancia de la luz o la radiactividad, dependiendo de la naturaleza de la etiqueta.

Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no de 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 la replicasa QB; promotores colorantes fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimioluminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridinio, por ejemplo; sensibilizadores coenzimas; sustratos enzimáticos; 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 colorante, catalizador u otro grupo detectable. Las 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; los 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.

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 los fluorescentes, son capaces de absorber la 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 por la emisión de luz en una segunda longitud de onda. Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos y colorantes radioactivos.

Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema que produce la señal incluiría todos los componentes necesarios 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 que generan señales. Una discusión detallada de los sistemas adecuados para la producción de señales se puede encontrar en Ullman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,185,243, columnas 11-13.

La etiqueta u otros miembros de sps pueden estar vinculados a un soporte. Un analito o análogo de analito puede unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre y cuando la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad del analito o análogo para unirse con un anticuerpo. En algunas realizaciones, el analito o análogo de analito puede estar recubierto o unido covalentemente directamente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas portadoras tales como poli(aminoácidos) que incluyen proteínas tales como

- 5 albúminas de suero o inmunoglobulinas, o polisacáridos (carbohidratos) como, por ejemplo, dextrano o derivados de dextrano. Los grupos de enlace también se pueden usar para unir covalentemente el soporte sólido y el analito. También son posibles otros métodos de unión del analito. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña como, por ejemplo, avidina, un anticuerpo, etc., y una molécula pequeña como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse al analito o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura. Ver, por ejemplo, "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970).
- 10 El soporte puede comprender un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo perlas, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla, superficies planas (como, por ejemplo, placa y papel) y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no ser suspendible 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 composiciones de soporte incluyen polímeros, como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), polietileno y poli(vinil butirato), ya sea por sí mismos o en conjunto con otros materiales.
- 15 El soporte puede ser una partícula. Las partículas deben tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0.3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus, E. coli, virus y similares. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.
- 20 Las partículas de polímero se pueden formar 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, ya sea 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, como la agarosa, que está disponible como SEPHAROSE®, el dextrano, disponible como SEPHADDEX® y SEPHACRYL®, la celulosa, el almidón y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, alcohol polivinílico, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidades hidroxilo libres, por ejemplo.
- 25 La etiqueta y/u otro miembro de sps puede estar unido a un miembro de sbp u otra molécula. Por ejemplo, la etiqueta puede unirse covalentemente a un miembro de un 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 se puede lograr 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 enlace entre la etiqueta y el miembro sbp. Otros miembros de sps también pueden estar vinculados covalentemente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros sps, como un fluorescente y un extintor, pueden unirse a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo acerca el fluorescente y el extintor, lo que permite que el extintor 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.
- 30 Las enzimas de particular interés como proteínas marcadoras son enzimas rédox, particularmente deshidrogenasas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y lactato deshidrogenasa, por ejemplo, y enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor de un colorante. Combinaciones particulares incluyen sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas heterocíclicas, como la uricasa y la xantina oxidasas, junto con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa como la peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa, o microperoxidasa. En la técnica se conocen combinaciones adicionales de enzimas. Cuando se usa una única enzima como etiqueta, otras enzimas pueden encontrar un uso como las hidrolasas, las transferasas y las oxidoreductasas, preferiblemente las hidrolasas, como la fosfatasa alcalina y la beta-galactosidasa. Alternativamente, se pueden usar luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H], etc., usualmente coenzimas que implican reacciones cíclicas. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,318,980.

5 Con proteínas marcadoras como, por ejemplo, enzimas, el rango de peso molecular será de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 600.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 300.000 de peso molecular. Por lo general, hay al menos aproximadamente 1 análogo de analito 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 de análogos de analito es de 1 a 10 aproximadamente 20, aproximadamente 2 a aproximadamente 15, aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o aproximadamente 6 a aproximadamente 10, por ejemplo.

15 El término "etiquetas no poli(aminoácido)" incluye aquellas etiquetas que no son proteínas (por ejemplo, enzimas). La etiqueta de no poli(aminoácido) se puede detectar directamente o es detectable a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores que no son de poli(aminoácidos) 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, una pequeña molécula orgánica (incluyendo, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes y similares), secuencia de polinucleótidos amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como una partícula de látex o carbono o una partícula 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.

25 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 utiliza una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula etiquetada que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula marcada 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 para 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 se acercan mucho. 30 El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están muy cerca. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que comprende el anticuerpo para el analito.

35 A modo de ilustración adicional, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con las mismas, tal como mediante la incorporación en las mismas o la unión a las mismas. Un miembro de un sbp que se une al analito, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito, está unido a un polisacárido que recubre las partículas. Un segundo miembro sbp que se une al analito es parte de un conjugado de biotina. La estreptavidina se conjuga con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado con ellas. La unión de la estreptavidina a este segundo conjunto de partículas (partículas fotosensibilizadoras) puede o no implicar un polisacárido en las partículas. Las partículas quimioluminiscentes se mezclan con la porción respectiva de la muestra sospechosa de contener un analito y con las partículas fotosensibilizadoras. Con respecto a la primera porción de la muestra, el medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan a sustancias o componentes en la muestra que no sea el analito. Con respecto a la segunda porción de la muestra, el medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los miembros sbp al analito. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar 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. Luego se examina el medio para determinar la cantidad de luminiscencia o luz emitida, y su presencia está relacionada con la cantidad del analito. 45

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

55 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 generalmente estará en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el rango 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 específico y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, como los miembros de un sistema productor de señales, por ejemplo. Se pueden usar diversos reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el período de incubación. Reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, Tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. 60 El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, tetraacetato de etilendiamina (EDTA), tetraacetato de etilenglicol

(EGTA), citrato, heparina y similares. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de los reguladores y conservantes, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; 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.

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

La concentración de analito que puede analizarse generalmente varía de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, o de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad de analito de fármaco eritrocitofílico 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 rango de concentración de interés del analito, la naturaleza del ensayo, la afinidad y avidéz del anticuerpo 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 sea importante debería proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza de un sistema productor de señales y la naturaleza del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más simple 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 pueden combinarse secuencialmente. Opcionalmente, puede estar involucrado un paso de incubación después de cada adición como se discutió anteriormente. La duración del período de incubación es la suficiente para cumplir la función deseada.

Realizaciones específicas de ensayos para ciertos analitos inmunosupresores

Las realizaciones específicas de los ensayos que pueden emplearse para analizar las porciones de muestra respectivas se discuten a continuación a modo de ilustración y no como limitación para los analitos inmunosupresores.

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 sospechosa de contener el analito se combina en un medio acuoso de forma simultánea o secuencial 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, lo que resulta en la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por la enzima. Las enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero pueden emplearse otras enzimas. El analito y los restos del conjugado enzimático compiten por los sitios de unión en el anticuerpo. Luego se mide la actividad de la enzima en el medio, generalmente por medios espectrofotométricos.

Los ensayos mencionados anteriormente se pueden llevar a cabo utilizando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mutante como enzima del conjugado enzimático. Esta enzima mutante se describe en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,090,567 y 6,033,890. Además, el ensayo se puede llevar a cabo utilizando anticuerpos para el analito y utilizando los procedimientos descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,328,828 y 5,135,863.

Los ensayos heterogéneos generalmente implican uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una variedad de formatos de ensayos competitivos y no competitivos se describen 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, teniendo 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, se determina la actividad enzimática del soporte o el medio mediante técnicas convencionales para determinar el resultado de la medición.

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

10 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 para el 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 se une a las partículas magnéticas y se relaciona inversamente con la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito.

15 Las siguientes descripciones de los ensayos son a modo de ilustración y no como una limitación en el alcance de los presentes ejemplos. La selección de tacrolimus o sirolimus como fármaco inmunosupresor también es a modo de ilustración y no limitativa, ya que la presente invención tiene una aplicación general para la detección de fármacos inmunosupresores en particular y otros analitos en general.

20 En una realización, la porción de muestra se mezcla con un conjugado de tacrolimus, es decir, por ejemplo, un análogo de tacrolimus que está unido a la biotina. Dependiendo de la porción de la muestra que se analiza, la porción de la muestra se incuba para permitir que la unión de sustancias en la muestra que no sea el analito se una a un anticuerpo para el tacrolimus o para permitir la unión de tales sustancias y el tacrolimus de la muestra para unirse al anticuerpo para tacrolimus en competencia con el análogo de tacrolimus en donde el anticuerpo es capaz de unirse a tacrolimus o al análogo de tacrolimus. Después de enjuagar con un regulador de lavado apropiado, se puede agregar al medio una molécula de detección que consiste en estreptavidina o avidina conjugada a una enzima, fluorescente o molécula quimioluminiscente o un resto radiactivo, que luego se examina para determinar la cantidad de señal. La cantidad de señal está relacionada con la cantidad de tacrolimus en la muestra.

25 En una realización, el ensayo empleado es un ensayo de luminiscencia inducida como se describe anteriormente. En algunas realizaciones del ensayo de luminiscencia inducida a modo de ilustración y no de limitación, los reactivos incluyen dos reactivos de perlas de látex y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tacrolimus biotilado. El primer reactivo de perla está recubierto con tacrolimus o un análogo de tacrolimus y contiene un colorante quimioluminiscente. El segundo reactivo de perla está recubierto con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. Las porciones de una muestra sospechosa de contener tacrolimus se tratan como se describió anteriormente. Una porción de muestra se trata con un anticuerpo para tacrolimus sin tratamiento con un agente de desplazamiento. La porción de muestra se incuba con anticuerpo biotilado para tacrolimus, lo que permite que el tacrolimus en la muestra se una al anticuerpo biotilado. En un segundo paso, se agrega el primer reactivo de perla y conduce a la formación de inmunocomplejos de perla/anticuerpo biotilado con la fracción del anticuerpo biotilado que no se une al analito. Luego se agrega el segundo reactivo de perlas y se une a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de perlas. Cuando se ilumina con luz a 680 nm, el segundo reactivo de perla convierte el oxígeno disuelto en la solución de reacción en la forma de oxígeno singlete más energética. En los pares de perlas, el oxígeno singlete se difunde en el primer reactivo de perlas, lo que desencadena una reacción quimioluminiscente. La señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración de otras sustancias que el tacrolimus en la muestra que se une al anticuerpo tacrolimus. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de dichas sustancias en la muestra.

45 El mismo ensayo también se lleva a cabo en otra porción de muestra, que se trata con FK506 para liberar tacrolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, la señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración de tacrolimus en la muestra (tanto tacrolimus libre como tacrolimus que estaba unido a sustancias de unión endógenas) que se une al anticuerpo tacrolimus. La resta de la cantidad de tacrolimus libre de la cantidad de tacrolimus libre más la que se desplazó da la cantidad de tacrolimus unido en la muestra y los valores pueden usarse en la ecuación mencionada anteriormente para calcular la cantidad total de tacrolimus en la muestra en presencia de sustancias interferentes endógenas.

50 Un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de otro formato de ensayo es ACMIA (ensayo de inmunidad mediado por dióxido de cromo de afinidad). Para el formato de ensayo ACMIA, las partículas de cromo, que están recubiertas con sirolimus o un análogo de sirolimus, se emplean como primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para sirolimus. Este anticuerpo, reticulado a 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 de sirolimus que podría estar presente en una muestra. Una muestra sospechosa de contener sirolimus se divide en porciones iguales. Una porción de muestra, que no fue sometida a tratamiento con un agente de desplazamiento, se trata con un anticuerpo para sirolimus, que se une a sirolimus libre pero no a otros reactivos empleados en el ensayo o a sustancias interferentes en la muestra. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con la porción de muestra para permitir que el analito de sirolimus se una al anticuerpo. A continuación, se agrega el reactivo de partículas de cromo para enlazar cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Luego, se aplica un imán, que extrae de la suspensión todas las partículas de cromo y el exceso de enzima-anticuerpo, 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 sirolimus libre en la muestra.

5 El mismo ensayo también se lleva a cabo en otra porción de muestra, que se trata con un éster de tacrolimus como un agente de desplazamiento para liberar sirolimus de sustancias de unión endógenas en la muestra. Después de realizar el ensayo, se mide la actividad enzimática resultante y se relaciona con la cantidad de sirolimus libre y sirolimus que se desplazó de las sustancias de unión endógenas. La sustracción de la actividad enzimática obtenida de la primera porción de muestra de la actividad enzimática obtenida de la segunda porción de muestra da la cantidad de actividad enzimática atribuida a la cantidad de sirolimus en la muestra que estaba unida por sustancias de unión endógenas en la muestra, la cual está relacionada con la cantidad de sirolimus enlazado. Los valores pueden usarse en la ecuación mencionada anteriormente para calcular una cantidad total de sirolimus en la muestra en presencia de sustancias interferentes endógenas.

Etapa de medición

15 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 determinar la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito (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. En el caso de una porción de muestra, la medición refleja una cantidad de analito libre en la muestra (es decir, analito en la muestra que no está unida por sustancias de unión endógenas) al anticuerpo anti-analito para formar un complejo que comprende el anti-analito anticuerpo. En el caso de una segunda porción de muestra, la medición refleja una cantidad de analito que representa la cantidad de analito que es tanto analito libre en las muestras como analito en la muestra que se libera mediante la adición de un agente de desplazamiento al anticuerpo anti-analito para formar un complejo que comprende el anticuerpo anti-analito.

20 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, se considera que un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra sospechosa de contener el analito, está 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.

25 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 del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema que produce la señal. Como se explica en el presente documento, existen numerosos métodos mediante los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente por examen visual, e incluye, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radiactividad y reactivos químicos.

30 La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema que producen señales. 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 que producen señales que están en la superficie de una partícula, la adición de una base puede resultar en la activación. A los expertos en la técnica se les sugerirán otros métodos de activación en vista de las descripciones de este documento. Para algunos sistemas que producen señales, no es necesario ningún agente de activación, como los sistemas que involucran una etiqueta que es una etiqueta radiactiva, una enzima, etc. Para los sistemas enzimáticos, puede ser necesario agregar un sustrato y/o un cofactor.

35 El examen de la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en donde se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro, un actinómetro o un instrumento fotográfico, por ejemplo. La cantidad de señal detectada se relaciona con la cantidad de analito 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, se forman curvas estándar utilizando concentraciones conocidas de los analitos que se van a examinar. Como se discute aquí, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Kits para realizar ensayos en las porciones de muestra.

40 Los reactivos para realizar un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito. En una realización, un kit comprende en una combinación de reactivos empacados para desplazar un analito de sustancias de unión endógena, un anticuerpo para un analito y otros reactivos para realizar un ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar varios reactivos 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, como miembros sbp adicionales, reactivos auxiliares, como un sustrato de enzima auxiliar, y así sucesivamente.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante el presente método y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en la disolución 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 describe anteriormente.

10 Aparato para realizar ensayos en las porciones de muestra.

Como se mencionó anteriormente, los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden automatizarse usando un aparato de ensayo para llevar a cabo las etapas del método. Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden llevar a cabo bajo control informático, es decir, con la ayuda de un ordenador, que puede estar asociado con el aparato de ensayo. El ordenador puede ser, por ejemplo, un ordenador personal (PC). El ordenador está controlado por un software que es particular para los métodos descritos en este documento, incluidos los cálculos que utilizan las ecuaciones mencionadas anteriormente.

20 El software que puede usarse para llevar a cabo los métodos puede ser, por ejemplo, Microsoft Excel o Microsoft Access, extenderse adecuadamente a través de funciones y plantillas escritas por el usuario, y vincularse cuando sea necesario a programas independientes que realizan otras funciones. Ejemplos de software o programas de ordenador utilizados para asistir en la realización de los métodos actuales se pueden escribir, por ejemplo, en C, C++ o Visual Basic. Debe entenderse que la información de ordenador anterior y el software utilizado en este documento son a modo de ejemplo y no de limitación. Los métodos actuales se pueden adaptar a otros ordenadores y softwares.

25 Se puede utilizar un programa informático para llevar a cabo los pasos del método anterior. El programa informático proporciona (i) la medición de una cantidad [Y] de una porción del analito en la muestra desconocida que está unida por sustancias de unión endógena que emplean un ensayo para el analito, (ii) que determina una cantidad [Z] de analito en la muestra desconocida que no está unida por sustancias de unión endógenas por la fórmula: $[Z] = a[Y] + b$, en donde "a" y "b" están predeterminadas al realizar el ensayo en muestras que contienen cantidades conocidas del analito pero sustancialmente libre de sustancias interferentes endógenas, y (c) agregando [Y] y [Z] para obtener la cantidad total [X] del analito en la muestra desconocida.

30 En algunos ejemplos, de acuerdo con los principios descritos, el programa informático prevé (i) medir una cantidad [Y] de una porción de tacrolimus que está unida por sustancias de unión endógena al (a') determinar una cantidad [V] de tacrolimus por medio de un ensayo realizado en una porción de la muestra en presencia de un agente capaz de desplazar tacrolimus de sustancias de unión endógena, (b') que determina una cantidad [W] de tacrolimus por medio de un ensayo realizado en una porción de la muestra en ausencia de un agente capaz de desplazar tacrolimus de sustancias de unión endógenas, y (c') restar [W] de [V], (ii) determinar una cantidad [Z] de tacrolimus que no está unida por sustancias de unión endógenas por fórmula: $[Z] = a[Y] + b$, en donde "a" y "b" están predeterminados al realizar el ensayo en muestras que contienen cantidades conocidas del analito pero sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas, (c) agregando [Y] y [Z] para determinar una cantidad total [X] De tacrolimus en la muestra.

40 El programa informático puede ejecutarse en un producto de programa que incluye un medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene un programa informático almacenado en él y que, cuando se carga en un procesador programable, proporciona instrucciones al procesador de ese aparato de manera que ejecute los procedimientos requeridos para realizar un método de la presente invención. El medio de almacenamiento legible por ordenador puede ser una memoria óptica, magnética o de estado sólido, cualquiera de las cuales puede ser portátil o fija. Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a un producto de programa informático que comprende un medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene un programa informático almacenado en el mismo que, cuando se carga en un ordenador, realiza el método mencionado anteriormente.

50 La expresión "al menos" como se usa en este documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número recitado. La expresión "aproximadamente" como se usa en este documento significa que el número citado puede diferir en más o menos un 10%; por ejemplo, "alrededor de 5" significa un rango de 4.5 a 5.5.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y se pretende que describan y no que limiten el alcance de la invención. Las partes y porcentajes aquí descritos están en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

55 Todos los productos químicos se pueden adquirir en 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. El sirolimus se puede obtener de Pfizer Inc., New York NY.

- La prueba se lleva a cabo utilizando el analizador DIMENSION® RxL, disponible en Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. El instrumento se emplea utilizando la tecnología de inmunoensayo ACMIA. El método de ensayo ACMIA se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,186,518, 5,147,529, 5,128,103, 5,158,871, 4,661,408, 5,151,348, 5,302,532, 5,422,284, 5,447,870 y 5,434,051. En la realización del método ACMIA utilizado aquí y discutido con más detalle a continuación, se utiliza la competencia entre el análogo de tacrolimus en partículas de cromo y tacrolimus en muestras de pacientes para el 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 las partículas de cromo se elimina por separación magnética. La actividad enzimática del conjugado que permanece 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 cuando se analiza 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 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.
- Los grupos reunidos de sangre entera sin tacrolimus se analizan ejecutando el ensayo ACMIA mencionado anteriormente para identificar los grupos de sangre entera que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas. La selección se lleva a cabo examinando la consistencia de las recuperaciones de tacrolimus de los depósitos a las muestras individuales de sangre entera sin tacrolimus. Si las recuperaciones de la mayoría de las muestras de sangre entera sin tacrolimus se encuentran dentro de la sensibilidad final baja del ensayo cuando se utiliza el conjunto como calibrador sin tacrolimus, el conjunto se acepta como una matriz libre de sustancias interferentes endógenas. Los grupos reunidos se utilizan para hacer los calibradores de tacrolimus (o estándares) mediante la adición de diferentes cantidades de tacrolimus puro en los grupos reunidos. Los calibradores (que están sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas) se emplean para generar la relación de $[Z] = a[Y] + b$ durante la calibración del método, que se logra al probar los calibradores en presencia y ausencia de un desplazamiento agente (sirolimus). Tanto $[Z]$ como $[Y]$ se generan a partir de la calibración. Los valores $[Z]$ de los calibradores se generan ejecutando los calibradores en ausencia del agente de desplazamiento (que representa el fármaco libre) y los valores $[Y]$ de los calibradores se generan restando el valor $[Z]$ del total del fármaco medido en presencia del agente de desplazamiento (que representa el fármaco unido). Los calibradores fabricados a partir de un grupo de sangre entera que está sustancialmente libre de sustancias interferentes endógenas se seleccionan para su uso en los experimentos a continuación.

Ejemplo 1.

Determinación de coeficientes para el ensayo de tacrolimus utilizando muestras conocidas

- Preparación de conjugado de 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 conjuga con la β -galactosidasa utilizando un enlazador SMCC heterobifuncional estándar (carboxilato de trans-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-succinimidilo) de acuerdo con técnicas conocidas. La solución de conjugado de anticuerpos contiene aproximadamente 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-tacrolimus- β -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, 50 mg/mL de NaCl y muteína beta-gal (β -galactosidasa inactivada), pH 6.5.
- Preparación de partículas de cromo magnético. Las partículas de cromo tacrolimus (fase sólida del inmunoensayo) se preparan conjugando la oxima de tacrolimus-C22 (preparada de una manera similar a la descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 7,078,495) con fluoresceína, que se utiliza para decorar previamente el anticuerpo anti-fluoresceína inmovilizado en partículas de dióxido de cromo a través del glutaraldehído. El reactivo de partículas de cromo contiene aproximadamente 2.5 mg/mL de suspensión de partículas de cromo tacrolimus, 60.8 mg/mL de trehalosa dihidratada y 7.2 mg/mL de CARBOWAX®.
- Preparación de muestras. Se utiliza el grupo reunido de sangre entera sustancialmente libre de sustancias interferentes endógenas identificadas anteriormente. Las alícuotas (100 mL) de la reserva de sangre entera se enriquecen con diversas cantidades de tacrolimus, de modo que la concentración resultante de tacrolimus en las muestras de sangre entera es 0, 2.8, 6.0, 11.9 y 31.3 ng/mL (muestras I-V).
- Determinación de la concentración de analito de tacrolimus libre más analito de tacrolimus unido. Un conjunto de muestras I-V se trata de la siguiente manera: A cada muestra se le agrega un agente de desplazamiento de sirolimus (SIRO) para desplazar tacrolimus en la muestra de proteínas de unión endógenas. La formulación para la solución de desplazamiento SIRO se expone con más detalle en la Tabla 1.

55

Tabla 1

Nombre	Cantidad (por mL)	Función
SIRO	5µg/mL	Agente Disociador
SesquiNa PIPES	17 mg/mL	regulador (pH 6.8)
EDTA disódico	0.75 mg/mL	Prevención de la formación de coágulos
Saponina	2.5 mg/mL	lisis de células sanguíneas
PROCLIN® 300	5.0 ml/L	Conservante
Sulfato de neomicina	0.06 g/L	Preservativo

5 Las muestras se incuban a 37°C durante un período de 140 minutos en presencia de un agente de desplazamiento para desplazar el tacrolimus de las sustancias de unión endógenas. Posteriormente, cada muestra se somete al ensayo mencionado anteriormente y la señal (mAU) se mide y se relaciona 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 fue desplazado de sustancias de unión endógenas) en las muestras.

10 Ensayo. El ensayo ACMIA para tacrolimus es el siguiente: 15 µL de una muestra de sangre entera I-V de arriba (sustancialmente libre de sustancias interferentes endógenas y con tacrolimus) se mezcla con la solución de desplazamiento SIRO (Tabla 1) en un vaso en el analizador DIMENSION® RxL. Se toma una muestra de la sangre entera de un recipiente estándar mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de desplazamiento SIRO asegura el desplazamiento de las moléculas de tacrolimus unidos desde sus sitios de unión cuando las moléculas SIRO están presentes. Como resultado, la señal generada a partir de este ensayo está relacionada con la cantidad de analito de tacrolimus libre más la cantidad de analito de tacrolimus desplazado (analito unido) en la muestra.

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

20 Determinación de la concentración de analito de tacrolimus libre. Un conjunto de muestras I-V se trata y analiza como se indicó anteriormente, excepto que la formulación de la Tabla 1 no contiene SIRO. Como resultado, la señal generada a partir de este ensayo es para la cantidad de analito de tacrolimus libre solo en la muestra.

25 Determinación de la concentración del analito de tacrolimus unido. La concentración del analito de tacrolimus unido se determina restando para cada muestra la concentración del analito de tacrolimus libre de la concentración del analito de tacrolimus libre más el analito de tacrolimus unido. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

BV ng/mL	mAU +SIRO	mAU-SIRO	+SIRO ng/mL	-SIRO ng/mL	Unido a proteína ng/mL
0.0	19	18	0.0	0.0	0.0
2.8	37	23	2.8	0.7	2.1

ES 2 704 404 T3

BV ng/mL	mAU +SIRO	mAU-SIRO	+SIRO ng/mL	-SIRO ng/mL	Unido a proteína ng/mL
6.0	55	27	6.0	1.2	4.9
11.9	80	33	11.9	2.2	9.7
31.3	125	53	31.3	5.7	25.6
Unido a proteína ng/mL	-SIRO ng/mL				
0.0	0.0				
2.1	0.7				
4.9	1.2				
9.7	2.2				
25.6	5.7				
Pendiente	0.218				
Intersección	0.0981				

La concentración de analito libre se grafica contra la concentración de analito unido como se muestra en la Figura 1. La pendiente y la intersección de la regresión son 0.218 y 0.0981, respectivamente, que corresponden a los coeficientes "a" y "b" en la fórmula $[Z] = a[Y] + b$, como se discutió anteriormente.

- 5 El ensayo ACMA anterior se lleva a cabo en muestras desconocidas que se sabe que contienen sustancias interferentes endógenas. Las muestras se obtienen de diversos hospitales y se identifican como se establece en la primera columna de la Tabla 3 a continuación. La concentración de tacrolimus [Y] unido se determina como se describió anteriormente. La ecuación $[Z] = 0.218[Y] + 0.0981$ con los valores de "a" y "b" determinados como se discutió anteriormente para este ensayo de ACMA se usa para determinar una concentración de tacrolimus [Z] libre en las muestras. La concentración total verdadera estimada de tacrolimus [X] en cada muestra se determina agregando [Y] + [Z]. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Valores verdaderos estimados (ng/mL) para muestras que muestran interferencia							
Muestra	ng/mL desplazador	+	ng/mL desplazador	-	Fármaco unido	Fármaco libre	Estimado verdadero ng/mL
Dussel	14.4		12.2		2.3	0.6	2.9
109	16.4		21.3		0.0	0.0	0.0
FP15	10.9		3.8		7.1	1.6	8.7
864408	27.7		25.4		2.3	0.6	2.9

ES 2 704 404 T3

Valores verdaderos estimados (ng/mL) para muestras que muestran interferencia							
Muestra	ng/mL desplazador	+	ng/mL desplazador	-	Fármaco unido	Fármaco libre	Estimado verdadero ng/mL
09-238-057	32.7		36.1		0.0	0.0	0.0

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y con fines de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones al respecto sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, la descripción anterior, a los fines de la explicación, utilizó una nomenclatura específica para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que no se requieren los detalles específicos para practicar la invención. Por lo tanto, las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se presentan con fines de ilustración y descripción; no pretenden ser exhaustivos ni limitar la invención a las formas precisas divulgadas. Muchas modificaciones y variaciones son posibles a la vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se eligieron y describieron para explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y, de ese modo, permitir que otros expertos en la técnica utilicen la invención.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la cantidad total de un analito en una muestra desconocida que se sospecha que contiene el analito en presencia de sustancias interferentes endógenas, comprendiendo el método:
- 5 (a) medir una cantidad [Y] de la porción del analito en la muestra desconocida que está unida por sustancias de unión endógena que emplean un ensayo para el analito, comprendiendo dichas sustancias de unión endógena inmunofilinas,
- (b) determinar una cantidad [Z] de analito en la muestra desconocida que no esté unida por sustancias de unión endógenas, mediante la fórmula:
- $$[Z] = a[Y] + b,$$
- 10 en donde "a" y "b" están predeterminados al realizar el ensayo en muestras que contienen cantidades conocidas del analito pero sustancialmente libres de sustancias interferentes endógenas, y
- (c) determinar la cantidad total [X] del analito en la muestra desconocida agregando [Y] y [Z], en donde "a" es la pendiente de una regresión entre el analito que no está enlazado por sustancias de unión endógena y analito que está enlazado por sustancias de unión endógenas, y "b" es la intersección de la regresión.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde [Y] se mide por:
- 15 (a) determinación de una cantidad [V] de analito por medio del ensayo realizado en una porción de la muestra en presencia de un agente capaz de desplazar el analito de las sustancias de unión endógena,
- (b) determinación de una cantidad [W] de analito por medio del ensayo realizado en una porción de la muestra en ausencia del agente capaz de desplazar el analito de las sustancias de unión endógenas, y
- (c) resta de [W] de [V].
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el analito es tacrolimus.
4. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde la muestra es una excreción corporal, aspiración corporal, escisión corporal o extracto corporal.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el ensayo comprende:
- 25 (i) agregar reactivos para determinar una cantidad del analito en la muestra a un medio que comprende la porción de la muestra de la etapa (a) y a un medio que comprende la porción de la muestra de la etapa (b) en donde los reactivos comprenden al menos un asociado de unión para el analito, y
- (ii) medir en la etapa (a) una cantidad de un complejo que comprende el asociado de unión para el analito en donde la cantidad del complejo está relacionada con la cantidad del analito en la muestra y medir en la etapa (b) una cantidad de un complejo que comprende el asociado de unión para el analito, en donde la cantidad del complejo está
- 30 relacionada con la cantidad del analito en la muestra.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, cuando depende de la reivindicación 3, en donde la al menos un asociado de unión es un anticuerpo contra tacrolimus.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde los reactivos en la etapa (i) comprenden además un análogo del analito y el análogo comprende una etiqueta.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde en la etapa (i) se agrega un segundo asociado de unión al medio en donde el segundo asociado de unión se une a un complejo que comprende el asociado de unión para el analito en donde, cuando depende de la reivindicación 6, el segundo asociado de unión y el asociado de unión es un anticuerpo contra tacrolimus.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde al menos el asociado de unión para el analito o el segundo asociado de unión comprende una etiqueta.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde uno de los reactivos de la etapa (i) comprende una etiqueta.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde uno de los reactivos de la etapa (i) comprende una partícula.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde uno de los reactivos de la etapa (i) comprende un marcador enzimático y uno de los reactivos comprende una partícula magnética.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el método de ensayo es un método de ensayo homogéneo.

Estimado de fármaco libre en WB

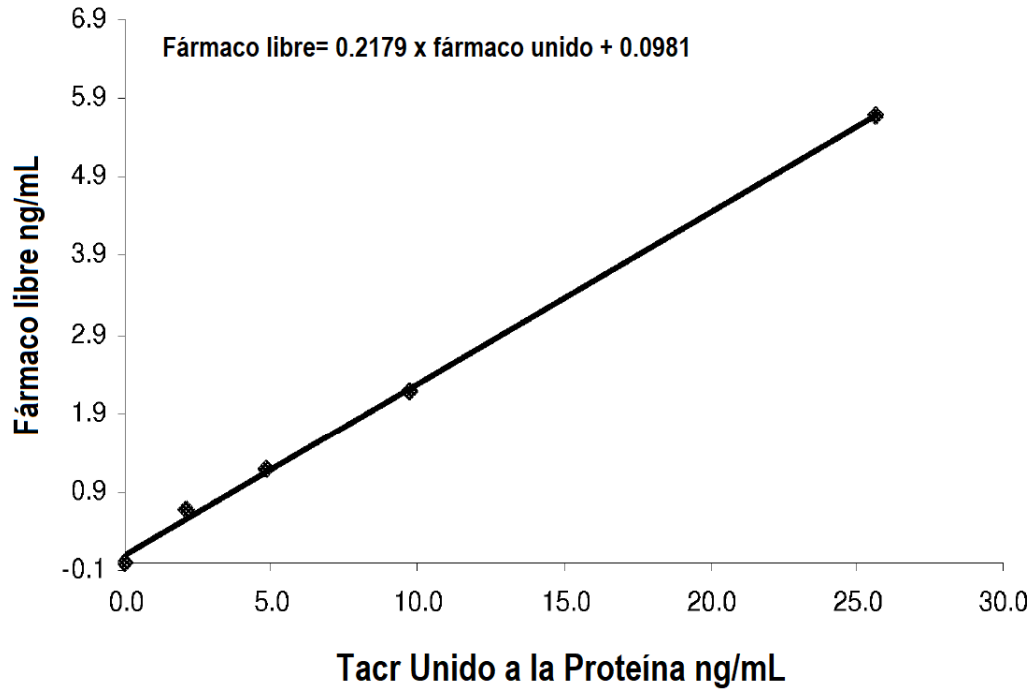


FIG. 1