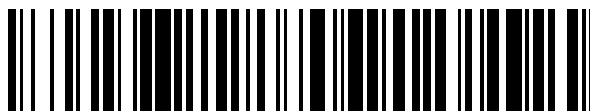


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 851**

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: **10.12.2014 PCT/US2014/069520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2014 E 14870173 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3080604**

54 Título: **Agente de tratamiento previo en ensayos sin aglutinación**

30 Prioridad:

13.12.2013 US 201361915755 P

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

06.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEI, TIE Q. y
SCHAIBLE, CHRISTY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 740 851 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

Agente de tratamiento previo en ensayos sin aglutinación

Antecedentes

5 La invención se refiere a métodos para determinar la concentración de un analito en una muestra de la que se sospecha que contiene el analito. Más particularmente, la invención se refiere a la reducción de resultados falsos en las mediciones realizadas durante los métodos mencionados anteriormente para determinar la concentración de un analito en una muestra.

10 El cuerpo se basa en un sistema de respuesta inmunológica complejo para distinguir el yo del no-yo. A veces, el sistema inmunológico del cuerpo se debe controlar para aumentar una respuesta deficiente o para suprimir una respuesta excesiva. Por ejemplo, cuando los órganos tales como el riñón, el corazón, el 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 En el tratamiento del rechazo de aloinjerto, el sistema inmunológico se suprime con frecuencia de forma controlada con la terapia con fármacos. Los fármacos inmunosupresores se administran cuidadosamente a los receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto de tejido no propio. Los dos medicamentos inmunosupresores que se administran con más frecuencia para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados son la ciclosporina (CSA) y la FK-506 (FK o tacrolimus). Otro fármaco que encuentra uso como un inmunosupresor en Estados Unidos y otros países es el sirolimus, también conocido como rapamicina. También se dice que los derivados de sirolimus son útiles como inmunosupresores. Los derivados de ese tipo incluyen, por ejemplo, Everolimus.

20 Los efectos secundarios asociados con algunos fármacos inmunosupresores se pueden controlar en parte controlando cuidadosamente el nivel de 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. Aunque los fármacos inmunosupresores son agentes inmunosupresores altamente eficaces, su uso se debe manejar con cuidado porque el intervalo de dosis eficaz a menudo es estrecho y una dosificación excesiva puede provocar efectos secundarios graves. Por otro lado, una dosis muy pequeña de un inmunosupresor puede conducir al rechazo del tejido. Debido a que la distribución y el metabolismo de un fármaco inmunosupresor pueden variar mucho entre los pacientes y debido a la gran variedad y gravedad de las reacciones adversas, es esencial una monitorización precisa del nivel de fármaco.

30 En el campo de la monitorización terapéutica de fármacos, la detección selectiva de un fármaco con respecto a otras sustancias en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco a menudo es un objetivo importante para el diseño de inmunoensayos. Esto es especialmente cierto para los fármacos inmunosupresores. Por esa razón, los ensayos de HPLC en tándem para la EM se han convertido en métodos convencionales para la medición de sirolimus, tacrolimus y otros fármacos inmunosupresores por su capacidad para medir de forma selectiva el fármaco precursor. Sin embargo, los métodos anteriores son el coste elevado y consumen mucho tiempo y, a menudo, se usan para verificar primero los resultados positivos obtenidos por otro método de ensayo en lugar de ser usados en laboratorios como determinación inicial.

40 La mayoría de los análisis de sangre completa para fármacos inmunosupresores requieren una etapa manual con reactivos para extraer el fármaco de los componentes de la sangre. Como resultado, 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 la que se eliminan las proteínas plasmáticas y las partículas de lipoproteínas, así como la mayoría de las otras moléculas. Debido a que generalmente se usan técnicas de precipitación, la muestra extraída está básicamente exenta de la mayoría de las macromoléculas sanguíneas, incluyendo las proteínas de unión al fármaco. De este modo, 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 endógenas en estos ensayos. La reactividad cruzada de un fármaco metabolito depende principalmente de su afinidad de unión a anticuerpos en dichos ensayos.

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

55 Un método para liberar un ligando de un complejo del mismo se describe en el documento WO 98/03877 A1. Este método comprende poner en contacto un medio sospechoso de contener tal complejo con una cantidad eficaz de un derivado de ácido benzoico. Además, el presente documento describe un método para la determinación de un analito

que es un miembro de un par de enlace específico en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor dicho analito, comprendiendo dicho método las etapas de (a) proporcionar en un medio de ensayo de dicha muestra y una pareja de unión para dicho analito y (b) detectar la unión de dicha pareja de unión a dicho analito. Además, el documento US 2009/317922 A1 se dirige a un método para reducir la velocidad de una reacción de unión específica en un ensayo para la detección y/o la medición de un analito en una muestra, en el que se añade una cantidad no fisiológica de un aditivo seleccionado entre sales, alcoholes, disolventes o combinaciones de los mismos a la mezcla de reacción. Los aditivos adecuados de acuerdo con el presente documento incluyen sales de un anión seleccionado entre los siguientes: cloruro, bromuro, yoduro, salicilato, tricloroacetato, tiocianato, perclorato y benzoato. Además, el presente documento desvela una variedad de compuestos aditivos adecuados, que se seleccionan entre los siguientes agentes: ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfónico, 2-guanidinobencimidazol, 2,3,5-triacetil-guanosina, bencimidazolilurea, acetamida, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), tricloroacetato de sodio, desoxicolato de sodio, creatina bencimidazol, p-tolueno-sulfonato de sodio, dicloroacetato de sodio, yoduro de sodio, fluoruro de sodio, cloroacetato de sodio, ácido 5-bencimidazolcarboxílico, salicilamida, clorhidrato de guanidina, cloruro de sodio, ácido 2-bencimidazol-propiónico, 2-bencimidazolmetanol, clorodifluoroacetato de sodio, ácido 4-guanidinobenzoico, ácido 3-clorobenzoico, N-hidroxi succinimida, y benzoato de guanidina y potasio. El documento EP 0 218 309 A2 se dirige a un método para medir la concentración de un ligando libre en un fluido biológico en presencia de ligando unido y proteínas de unión endógenas. Este método usa análogos marcados para T3 y T4 que se modifican en la cadena lateral de alanina para evitar la unión a TBG y usa salicilato y/o DNP como un reactivo inhibidor químico que se une a los sitios de unión desocupados en las moléculas de albúmina y TBPA, saturando de ese modo estas proteínas de unión y eliminando de manera eficaz su capacidad para unirse a los análogos de la tironina. El documento WO 2009/020468 A2 se dirige a métodos y reactivos para mejorar la biodisponibilidad de un fármaco hidrófobo y para determinar un fármaco hidrófobo, en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor. El presente documento enseña el uso de detergentes específicos para mejorar la biodisponibilidad de un medicamento hidrofóbico, en el que un detergente adecuado es un detergente iónico que comprende una cadena de al menos 10 átomos de carbono o un detergente no iónico que comprende una cadena de al menos 15 unidades de óxidos de etileno o unidades de óxido de propileno de repetición o una combinación de unidades de óxido de etileno y unidades de óxido de propileno.

Por lo tanto, existe la 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 tengan presentes varias sustancias interferentes. El ensayo debería proporcionar una medida precisa de la cantidad de analito en la muestra, al tiempo que minimiza las imprecisiones resultantes de las sustancias que interfieren presentes en la muestra. La reducción de las mediciones de ensayos falsos es importante para la precisión de los métodos.

Sumario

En el presente documento se describe un método para tratar previamente tanto un anticuerpo como una muestra que se va a someter a un inmunoensayo sin aglutinación. En el método el anticuerpo y la muestra se combinan con un agente de tratamiento previo seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y sales metálicas de los mismos y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno y sales metálicas de los mismos en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del inmunoensayo sin aglutinación.

Además, en el presente documento se describe un método para determinar un analito en una muestra de la que se sospecha que contiene el analito. El método comprende un inmunoensayo sin aglutinación. En el inmunoensayo sin aglutinación, se proporciona una combinación en un medio en el que la combinación comprende la muestra, un reactivo de anticuerpo que comprende un anticuerpo para el analito, y un agente de tratamiento previo seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y sales metálicas de los mismos y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno y sales metálicas de los mismos en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del inmunoensayo sin aglutinación. El medio se incuba en condiciones para unión del anticuerpo al analito con respecto al analito que se sospecha que está en la muestra. El medio se examina para la presencia de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito, la presencia y/o cantidad del complejo indicando la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

Otro ejemplo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se refiere a un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor el fármaco inmunosupresor. El método comprende un inmunoensayo sin aglutinación. En el método se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra, un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor de sustancias de unión endógenas, un reactivo de anticuerpo que comprende un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor, y un agente de tratamiento previo seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y sales metálicas de los mismos y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno y sales metálicas de los mismos en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del inmunoensayo sin aglutinación. El medio se incuba en condiciones para la unión del anticuerpo para el fármaco inmunosupresor al fármaco inmunosupresor que se sospecha que está en la muestra. El medio se examina para la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor y el anticuerpo para el fármaco

inmunosupresor, la presencia y/o cantidad del complejo indicando la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión General

5 La presente invención se dirige a la medición precisa de concentración de analitos en una muestra mediante la reducción o la eliminación de resultados de ensayo falsos en un inmunoensayo sin aglutinación. En ejemplos de los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, un anticuerpo y una muestra que se va a someter a un inmunoensayo sin aglutinación se combinan con un agente de tratamiento previo seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y sales metálicas de los mismos
10 y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno y sales metálicas de los mismos, o una combinación de dos o más de los mencionados anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del inmunoensayo sin aglutinación. La presente invención se dirige a un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor el fármaco inmunosupresor de acuerdo con la reivindicación 1.

15 Un "anticuerpo" es un miembro de un par de unión específico ("miembro de un sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en una superficie o en una cavidad, que se une de forma específica a y que de ese modo se define como complementario con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico normalmente serán miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos tales como, por ejemplo, biotina-avidina, hormonas-receptores hormonales,
20 enzima-sustrato, híbridos de ácido nucleico, IgG-proteína A, y padres de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, no son padres inmunológicos pero están incluidos dentro del alcance del miembro de sbp. Por consiguiente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con un reconocimiento menos sustancial de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica el enlace no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. La unión
25 no específica puede resultar de varios factores que influyen interacciones hidrófobos entre moléculas.

Un inmunoensayo de "no aglutinación" es un ensayo que usa al menos un anticuerpo o miembro macromolecular similar de un par de unión específico en el que el ensayo no implica la aplicación de sustancias tales como materiales particulados, por ejemplo, bacterias, células, o partículas de la látex, en virtud de la unión de antígenos en las sustancias al anticuerpo o miembro de sbp macromolecular similar.

30 Los ácidos carboxílicos C1-C5 se refieren a ácidos carboxílicos que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono, o de 1 al 2 átomos de carbono, o de 2 a 5 átomos de carbono, o de 2 a 4 átomos de carbono, o de 2 al 3 átomos de carbono, o de 3 a 5 átomos de carbono, o de 4 a 5 átomos de carbono. Los ejemplos de ácidos carboxílicos C1-C5 incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butanoico, ácido iso-butanoico, ácido n-pentanoico, ácido iso-pentanoico, por
35 ejemplo.

En algunos ejemplos, el ácido carboxílico C1-C5 está sustituido con un sustituyente hidroxifenilo, que es un grupo fenilo que comprende al menos un grupo hidroxilo, o al menos dos grupos hidroxilo. El sustituyente hidroxilo puede estar en orientación orto (o), meta (m) o para (p) con respecto al átomo de carbono del anillo fenilo de está unido al ácido carboxílico C1-C5. Los ejemplos de ácidos hidroxifenil C1-C5 carboxílicos incluyen, pero no se limitan a, ácido (o-hidroxifenil) fórmico (ácido salicílico), ácido (m-hidroxifenil) fórmico, ácido (p-hidroxifenil) fórmico, ácido (o-hidroxifenil) acético, ácido (m-hidroxifenil) acético, y ácido (p-hidroxifenil) acético, por ejemplo.

En algunos ejemplos, los ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo están en forma de una sal metálica. El metal de la sal metálica puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un metal del grupo 1 de la tabla periódica, o un metal del grupo 2 de la tabla periódica, por ejemplo. En algunos ejemplos, el metal de la sal metálica del ácido carboxílico C1-C5 sustituido con hidroxifenilo es, pero no se limita a, sodio, potasio, o litio, por ejemplo. En un ejemplo particular de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, la sal metálica del ácido carboxílico C1-C5 sustituido con hidroxifenilo es salicilato de sodio.

Los ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno son aquellos ácidos carboxílicos C1-C5 que comprenden al menos un sustituyente halógeno, o al menos dos sustituyentes halógeno, o al menos 3 sustituyentes halógeno. En algunos ejemplos, el número de sustituyentes halógeno puede estar en el intervalo de, por ejemplo, 1-4, o 1-3, o 1-2, o 2-4, o 3-4, o 2-3. En algunos ejemplos, el número de sustituyentes halógeno puede ser 1, o 2, o 3, o 4, por ejemplo. El sustituyente halógeno puede ser, por ejemplo, uno o más de cloro, bromo, flúor y yodo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, el ácido carboxílico C1-C5 sustituido con halógeno puede ser, pero no se limita a, ácido cloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido 2-cloropropiónico, ácido 2,2-dicloropropiónico, ácido 2,2,2-tricloropropiónico, ácido 2,3-dicloro- propiónico, ácido 2,3,3-

5 triclороpropiónico, ácido bromoacético, ácido dibromoacético, ácido tribromoacético, ácido 2-bromopropiónico, ácido 2,2-dibromopropiónico, ácido 2,2,2-tribromopropiónico, ácido 2,3-dibromopropiónico, ácido 2,3,3-tribromopropiónico, ácido yodoacético, ácido diyodoacético, ácido triyodoacético, ácido 2-yodopropiónico, ácido 2,2-diyodopropiónico, ácido 2,2,2-triyodopropiónico, ácido 2,3-diyodopropiónico, y ácido 2,3,3-triyodopropiónico, por ejemplo. En algunos ejemplos, el ácido carboxílico C1-C5 sustituido con halógeno puede estar en forma de una sal metálica en la que el metal de la sal metálica es del grupo 1 o del grupo 2 de la tabla periódica como se ha discutido anteriormente para la sal metálica de los ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo. En un ejemplo particular de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, la sal metálica del ácido carboxílico C1-C5 sustituido con halógeno es tricloroacetato de sodio.

10 En ejemplos de los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, un anticuerpo y una muestra que se va a someter a un inmunoensayo sin aglutinación se combinan con un agente de tratamiento previo como se ha discutido anteriormente en un medio acuoso, que puede ser un medio acuoso tamponado. El medio puede ser un medio en el que un inmunoensayo sin aglutinación se lleva a cabo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento o un medio usado para llevar a cabo el método de tratamiento previo. El pH para el medio acuoso normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5.

20 Para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el procedimiento se pueden usar varios tampones. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular usado no es crítico, pero en un ensayo individual puede ser preferente un tampón otro. Varios materiales. En los métodos mencionados anteriormente se pueden usar varios materiales auxiliares. Por ejemplo, además de los tampones el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos usados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, se pueden incluir proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de unión, por ejemplo. Todos los materiales mencionados anteriormente están presentes en una concentración o cantidad suficiente como para conseguir el efecto o función deseados.

25 El agente de tratamiento previo se usa en una cantidad suficiente para aumentar la precisión del ensayo sin aglutinación. La cantidad del agente de tratamiento previo depende de uno o más de la naturaleza del ensayo sin aglutinación, la naturaleza del reactivo de anticuerpo, la cantidad de la muestra, el intervalo que se sospecha que es la cantidad de un analito en una muestra, la cantidad de otras sustancias de las que se sospecha que están en la muestra, y la presencia de metabolitos y/o fosfolípidos, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad o concentración (porcentaje en peso) del agente de tratamiento previo en el medio de ensayo es de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 75 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 50 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 30 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 75 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 75 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 50 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 40 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 %, por ejemplo.

45 La muestra a analizar puede ser no biológica o biológica. Las "muestras no biológicas" son aquellas que no se relacionan con un material biológico e incluyen, por ejemplo, muestras de suelo, muestras de agua, muestras de aire, muestras de otros gases y muestras de minerales. La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, un elemento de aspiración corporal, un elemento de escisión corporal o un elemento de extracción 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 se pueden obtener por escisión o extracción) tales como, por ejemplo, orina, heces, mucosidad vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, fluido de ampollas y ex soldados de inflamación. Los elementos de escisión corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo tales como, por ejemplo, muestras de piel, cabello y tejidos, incluyendo biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Los elementos de aspiración corporales son aquellos materiales que se aspiran de un cuerpo como, por ejemplo, moco, saliva y esputo. Los elementos de extracción corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo tales como, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial y líquido peritoneal.

60 La cantidad de la muestra sometida a un ensayo depende de uno o más de la naturaleza del analito, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los diversos reactivos para llevar a cabo el ensayo, y la naturaleza del complejo que comprende el analito, por ejemplo. En algunos ejemplos, el volumen de la 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 de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 60 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 40 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 20 µl, o de aproximadamente 5 µl a aproximadamente 50 µl, o de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 50 µl, por ejemplo.

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

- 10 Los analitos de fármacos representativos, a modo de ilustración y no limitantes, incluyen alcaloides, esteroides, lactamas, aminoalquilbencenos, benzheterocíclicos, purinas, fármacos obtenidos a partir de la marihuana, hormonas, polipéptidos que incluyen proteínas, inmunosupresores, vitaminas, prostaglandinas, antidepresivos tricíclicos, agentes antineoplásicos, complejos antineoplásicos nucleotídicos que incluyen polinucleósidos y polinucleótidos, fármacos individuales variados que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistamínicos, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, y metabolitos y derivados de todos los mencionados anteriormente.

Dentro del término analito también se incluyen los metabolitos relacionados con estados patológicos, aminoglicósidos, tales como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina, y pesticidas tales como, por ejemplo, bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos y sulfenamidas polihalogenadas y sus derivados.

- 20 El término analito también incluye combinaciones de dos o más de polipéptidos y proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Las combinaciones de ese tipo incluyen, por ejemplo, componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos y membranas celulares. Los analitos de proteínas incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos del cáncer, marcadores nutricionales y antígenos específicos de tejido. Las proteínas de ese tipo incluyen, a modo de ilustración y no limitante, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de linfocitos T, proteoglicanos, HLA, proteínas no clasificadas, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas que se encuentran en el plasma humano, factores de coagulación de la sangre, hormonas proteicas tales como, por ejemplo, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citoquinas, antígenos del cáncer tales como, por ejemplo, PSA, CEA, a-fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9 y CA125, antígenos específicos de tejidos, 25 30 tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son los mucopolisacáridos y los polisacáridos. Como se ha indicado anteriormente, el término analito incluye además analitos de oligonucleótidos y polinucleótidos tales como m-ARN, ARN-r, ARN-t, híbridos de ADN y ADN-ARN, por ejemplo.

- 35 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, el analito es un fármaco inmunosupresor, que es un fármaco terapéutico que se administra a los receptores de trasplantes para ayudar a prevenir el rechazo de aloinjerto del tejido no propio. Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar de la siguiente manera: glucocorticoides, agentes citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre las inmunofilinas y otros fármacos tales como interferones, opiáceos, proteínas de unión a INF, micofenolato y FTY720, por ejemplo. Una clase particular de fármacos inmunosupresores comprende aquellos fármacos que actúan sobre las inmunofilinas. Las 40 inmunofilinas son un ejemplo de proteínas de unión específica de alta afinidad que tienen importancia fisiológica. En la actualidad se conocen dos familias distintas de inmunofilinas: ciclofilinas y macrofilinas, las últimas de las cuales se unen específicamente, por ejemplo, tacrolimus o sirolimus. Los fármacos inmunosupresores que actúan sobre la inmunofilina incluyen, por ejemplo, ciclosporina (incluyendo la ciclosporina A, ciclosporina B, ciclosporina C, ciclosporina D, ciclosporina E, ciclosporina F, ciclosporina G, ciclosporina H, ciclosporina I), tacrolimus (FK506, 45 PROGRAF®), sirolimus (rapamicina, RAPAMUNE®), y everolimus (RAD, CERTICAN®).

- Algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se dirigen a métodos de ensayo sin aglutinación para determinar un analito en una muestra de la que se sospecha que contiene el analito. En el ensayo sin aglutinación, se proporciona una combinación en un medio en el que la combinación comprende la muestra, un reactivo de anticuerpo que comprende un anticuerpo para el analito, y un agente seleccionado entre el 50 grupo que consiste en sales metálicas de ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del ensayo sin aglutinación.

- El reactivo de anticuerpo comprende un anticuerpo para el analito, es decir, un anticuerpo que se une de forma específica al analito. El reactivo de anticuerpo puede comprender además una o más etiquetas o reactivo etiquetado. El reactivo de anticuerpo incluye aquellos agentes necesarios para la detección del analito. La etiqueta suele ser parte 55 de un sistema de producción de señales ("sps"). La naturaleza de la etiqueta depende del formato particular del ensayo sin aglutinación. 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 detectado o a un agente que refleje la cantidad de analito a detectar.

La etiqueta es cualquier molécula que produce o se puede inducir para que produzca una señal, y puede ser, por ejemplo, un agente fluorescente, un marcador radioactivo, una enzima, un agente quimioluminiscente o un agente 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, etc., según sea el caso.

- 5 Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como la replicasa QB; promotores; colorantes; agentes fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluoescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos
- 10 cuánticos; agentes 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 metálico; cristalita; liposomas; células, etc., que se pueden etiquetar además con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Las enzimas y coenzimas adecuadas se desvelan en Litman, *et al.*, Documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.275.149, columnas 19-28, y Boguslaski, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.318.980, columnas 10-14; los agentes fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se desvelan en Litman *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.275.149, en las columnas 30 y 31.

- 20 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 agentes fluorescentes, son capaces de absorber la luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitada. Esta energía absorbida se disipa a continuación por la emisión de luz en una segunda longitud de onda. Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos y colorantes radioactivos.

- 25 Por lo tanto, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema que produce la señal podría incluir todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Los otros componentes de otro tipo pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, agentes neutralizadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señales. Una discusión detallada de los sistemas adecuados para la producción de señales se puede encontrar en Ullman, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.185.243, columnas 11-13.

- 30 La etiqueta u otros miembros de sps se pueden unir a un soporte. Un derivado de analito o un análogo de analito se pueden unir a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de los análogos de unirse al anticuerpo. En algunas realizaciones, el analito derivado o análogo de analito puede estar revestido o unido mediante enlace covalente directamente a la fase sólida o puede tener capas de una o más moléculas vehículo tales como poli(aminoácidos) que incluyen proteínas tales como
- 35 albúminas de suero o inmunoglobulinas, o polisacáridos (carbohidratos) tales como, por ejemplo, derivados de dextrano o dextrano. Los grupos de enlace también se pueden usar para unir mediante enlace covalente el soporte sólido y el análogo analítico. También son posibles otros métodos de unión de los derivados del analito. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un revestimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina o hapteno, se puede unir al derivado de analito o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y se puede conseguir mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970).

- 45 El soporte puede estar formado por un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, varilla, superficies planas tales como, por ejemplo, placa, papel, etc., o fibra. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte se puede suspender o no en el medio en el que se emplea. Los ejemplos de soportes que se pueden suspender son materiales poliméricos tales como, por ejemplo,
- 50 látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poliestireno y poli(butirato de vinilo), por ejemplo, que se pueden usar por ellos mismos o en conjunto con otros materiales.

- 55 El soporte puede ser una partícula. Las partículas deberían tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad 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* o virus de *E. coli*, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones o lipoproteínas, por ejemplo. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

Las partículas de polímero pueden estar formadas por polímeros de adición o condensación. Las partículas se podrán dispersar fácilmente en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables para permitir la conjugación con un análogo de analito, ya sea directa o indirectamente a través de un grupo de enlace. Las partículas también se pueden obtener a partir de materiales de origen natural, materiales de origen natural que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de interés particular están los polisacáridos, en particular los polisacáridos reticulados, tales como agarosa, que está disponible como SEPHAROSE®, dextrano, disponible como SEPHADEX® y SEPHACRYL®, celulosa y almidón, por ejemplo; polímeros de adición, tales como poliestireno, alcohol polivinílico, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, en particular ésteres y amidas que tienen grupos funcionales hidroxilo libres, por ejemplo.

La etiqueta y/u otro miembro de sps se puede unir a un miembro de sbp u otra molécula. Por ejemplo, la etiqueta se puede unir mediante enlace covalente 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 ligando (analito). La unión de la etiqueta al miembro sbp se puede conseguir 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 se pueden unir mediante enlace covalente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros de sps, tales como un fluorescente y un inactivador, se pueden unir a un anticuerpo diferente cuando los anticuerpos forman un complejo específico con el analito. La formación del complejo aproxima al agente fluorescente y el inactivador, lo que permite que el inactivador interactúe con el agente fluorescente para producir una señal. Los métodos de conjugación se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Rubenstein, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 3.817.837.

Las enzimas de interés particular tales como proteínas marcadoras son enzimas redox, en particular deshidrogenasas tales como 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 precursor de colorante a un colorante. Las combinaciones particulares incluyen oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasa, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa, o microperoxidasa. En la técnica se conocen combinaciones adicionales de enzimas. Cuando se usa una sola enzima como una etiqueta, otras enzimas pueden encontrar un uso tales como hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas, preferentemente las hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y β -galactosidasa. Alternativamente, se pueden usar luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana.

Las coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, FAD[H], FMN[H], por ejemplo, con enzimas habituales que implican reacciones de ciclado. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.318.980.

Con proteínas de marcado tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular promedio en peso variará de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 600.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 300.000 de peso molecular. Normalmente hay al menos aproximadamente 1 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 aproximadamente 20, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, por ejemplo.

La expresión "etiquetas que no son poli(aminoácidos)" incluye aquellas etiquetas que no son proteínas (por ejemplo, enzimas). La etiqueta que no es poli(aminoácido) se puede detectar directamente o se puede detectar 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 que no es 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 molécula orgánica pequeña (incluyendo, por ejemplo, biotina, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes y similares), secuencia de polinucleótidos amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como partícula de látex o carbono o dióxido de cromo (cromo), sol metálico, cristalita, liposoma, célula, que puede estar o no etiquetada con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento tal como, por ejemplo, un analito de fármaco inmunosupresor, un agente de liberación se puede usar antes de la combinación de la muestra con el reactivo de anticuerpo o en la combinación del reactivo de anticuerpo, la muestra y el agente de tratamiento previo.

- 5 El agente de liberación desplaza el analito de los restos de unión endógenos. En algunas realizaciones, el agente de liberación tiene una alta afinidad de unión a las proteínas de unión endógenas, de modo que desplaza fácilmente el analito, y sus metabolitos en algunos casos, de las proteínas de unión endógenas. Además, el agente de liberación no se une de manera significativa al anticuerpo para el analito que se usa en el ensayo. La expresión "no se une en ningún grado significativo" significa que el grado de unión debe ser lo suficientemente bajo como para que se pueda
10 realizar un análisis preciso para el analito. El agente de liberación puede ser cualquier resto, ya sea un solo compuesto o una mezcla de compuestos, que logre el resultado deseado de desplazamiento sin una unión significativa a un anticuerpo de ensayo.

- En algunos ejemplos, el agente de liberación es un análogo, incluyendo análogos estructurales, del analito. Un agente de liberación que es un análogo de analito es un fármaco modificado que puede desplazar el análogo de analito de una proteína de unión, pero no compete en un grado sustancial por un receptor tal como un anticuerpo para el analito. La modificación proporciona medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en algo más que el reemplazo de un hidrógeno con un enlace que vincula el análogo del analito a un centro o etiqueta, pero no es necesario. El análogo de analito puede ser, por ejemplo, el analito conjugado a otra molécula a través de un grupo de enlace, por ejemplo. Para los analitos que comprenden un grupo
15 funcional hidroxilo o ácido carboxílico, el agente de liberación puede ser un éster de analito, que tiene una afinidad de unión elevada para proteínas de unión endógenas en relación con el analito que se van a detectar y que no tienen una afinidad de unión significativa para un anticuerpo para el analito. Por ejemplo, en una determinación de sirolimus, se puede emplear un éster de sirolimus como agente de liberación siempre que cumpla con los requisitos anteriores. Se debería indicar que un análogo de analito de no liberación es un analito modificado que compete con el analito correspondiente para unirse al anticuerpo para el analito.
20
25

- Un análogo estructural es un resto 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. El análogo estructural puede ser, por ejemplo, otro compuesto que está relacionado con el analito. Por ejemplo, como se ha mencionado anteriormente, en una determinación de sirolimus, un éster de tacrolimus se puede usar como agente de liberación, o en una determinación de tacrolimus, se puede usar sirolimus como agente de liberación. El éster puede ser, por ejemplo, un carbamato, un carbonato o un éster de un ácido carboxílico de C₁ a C₆, por ejemplo. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.186.518. Otros ejemplos de agentes de liberación incluyen [Thr₂, Leu₅, D-Hiv₈, Leu₁₀]-ciclosporina A para ciclosporina A, FK506 para sirolimus, y sirolimus para FK506, por ejemplo. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.187.547.
30

- En algunas realizaciones, el agente de liberación puede ser un agente que rompe las membranas celulares en las que está atrapado el analito. Por ejemplo, un analito que está atrapado dentro de los glóbulos rojos puede ser liberado de los glóbulos rojos al emplear un agente hemolítico. Un agente hemolítico es un compuesto o mezcla de compuestos que rompe la integridad de las membranas de los glóbulos rojos, liberando de ese modo los contenidos intracelulares de las células y, en particular, los eritrocitos. En la técnica se conocen numerosos agentes hemolíticos. 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 la lisis dependiente del complemento, y similares. Los detergentes no iónicos que se pueden usar como agente hemolítico incluyen tanto detergentes sintéticos como detergentes naturales. Los ejemplos de detergentes sintéticos incluyen TRITON™ X-100, TRITON™ N-101, TRITON™ X-114, TRITON™ X-405, TRITON™ SP-135, TWEEN® 20
35 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN® 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), DOWFAX®, ZONYL®, palmitato de pentaeritritilo, ADOGEN® 464, tensioactivo ALKANOL® 6112, alcohol alílico 1,2-butoxilato-bloque-etoxilato HLB 6, BRIJ®, etilendiamin tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato) tetrol, IGEPAL®, MERPOL®, poli(etilenglicol), 2-[etil[(heptadecafluorooctil)sulfonil]amino]etil éter, polietileno-bloque-poli(etilenglicol), tetraoleato de y de sorbitán, hexaoleato de polioxietileno y sorbitol, TERGITOL® NP-9, GAFAC® (RHODAFAC®, un éster de fosfato de alquilpolioxietilenglicol tal como, por ejemplo, fosfato de alfa-dodecil-omega-hidroxi-poli(oxi-1,2-etanodilo)), y EP110® y similares. Los detergentes de origen natural que se pueden emplear como el agente hemolítico incluyen, por ejemplo, saponinas, ácido graso neutralizado con sodio o potasio, fosfolípidos neutralizados, diacilglicerol, fosfatidil serina neutralizada, fosfatidato, fosfatidil etanolamina neutralizada, fosfatidil colina, fosfatidil inositol, fosfatidilcolina, sales biliares, colesterol no esterificado, esfingosina neutralizada, ceramida y similares. También se pueden emplear
40
45
50
55 combinaciones de uno o más detergentes sintéticos o uno o más detergentes de origen natural y combinaciones de detergentes sintéticos y detergentes de origen natural.

- Otros agentes de liberación que se pueden usar 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, metoxi propanol y DMSO; y agentes para llevar a cabo la digestión de proteína tal como, por ejemplo, proteinasas, tripsina, pepsina, peptidasas; por ejemplo.
60

La concentración del agente de liberación(s) en el medio es aquella que es suficiente para conseguir el resultado deseado de desplazamiento del analito de los restos de unión endógenos para hacer que el analito y, en algunos casos metabolitos de analito, sea accesible para su unión a un anticuerpo para el analito como se ha discutido anteriormente. La cantidad o concentración del agente de liberación usada depende de uno o más de la naturaleza de la muestra, la naturaleza del analito, la naturaleza de los metabolitos farmacológicos, la naturaleza de otros componentes reactivos, y las condiciones de reacción, por ejemplo. En algunas realizaciones la cantidad del agente de liberación en el medio acuoso es de aproximadamente un 0,000001 % a aproximadamente un 0,5 %, de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 0,4 %, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,3 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,2 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 %, de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,5 %, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,2 %, por ejemplo (el porcentaje es en peso/volumen).

Para algunos analitos tales como, por ejemplo, fármacos inmunosupresores, se puede emplear un agente de lisis tal como, por ejemplo, un detergente. El detergente hace que el fármaco inmunosupresor sea más miscible en agua en una mezcla de ensayo acuosa, haciendo de ese modo que sea más accesible por los agentes de medición de ensayo, tales como los anticuerpos de ensayo. En algunos ejemplos, se emplea un detergente que puede evitar que el medicamento se difunda en partículas de lipoproteínas u otro tipo de liposomas. Por ejemplo, el detergente PLURONIC® es un detergente usado en un ensayo de tacrolimus para evitar que el medicamento se difunda en el núcleo de los complejos de lipoproteínas.

Uno o más periodos de incubación se pueden emplear en los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Se puede aplicar un periodo de incubación a un medio en uno o más intervalos, incluyendo los intervalos entre las adiciones de varios reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para la función que se está llevando a cabo, tal como por ejemplo, el tratamiento con un agente de liberación, el tratamiento con un agente de tratamiento previo, la unión de varios componentes de los reactivos tal como, por ejemplo, para que se produzca la unión del anticuerpo a un analito. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo un periodo de incubación. El método puede incluir un periodo de incubación para una o más de las etapas de los métodos actuales. Por ejemplo, se puede aplicar un periodo de incubación a una o más de la combinación del agente de liberación con la muestra, la combinación del agente de tratamiento previo con la muestra y un reactivo de anticuerpo, la combinación del agente de tratamiento previo con la muestra, un reactivo de anticuerpo y un reactivo de fase sólida, por ejemplo. En algunos ejemplos, el medio se incuba bajo condiciones para la unión del anticuerpo para el analito a un analito sospechoso de estar en la muestra como se explica más detalladamente a continuación.

La duración y las condiciones de los periodos de incubación dependen de una o más de la naturaleza y concentración de los reactivos, la naturaleza del analito, y la concentración sospechada del analito, por ejemplo. Las temperaturas de incubación son 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 tiempo para un periodo de incubación depende de una o más de la temperatura del medio y la velocidad de reacción o de unión de los diversos reactivos. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo.

Después de un periodo de incubación, si lo hubiera, para la unión del anticuerpo para el analito al analito, se examina el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito. La presencia y/o cantidad del complejo indica la presencia y/o cantidad del analito en la muestra. La expresión "complejo que comprende el anticuerpo para el analito" se refiere a un complejo en el que el anticuerpo para el analito está unido a una o más sustancias que pueden ser una o más de analito y otras sustancias en una muestra que se une al anticuerpo para el analito.

En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se ha discutido anteriormente, existen numerosos métodos por 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 radioactividad y reactivos químicos.

El examen de presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es solo una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y la cantidad de señal detectada están relacionadas con la presencia y la cantidad de analito presentes en una muestra si el ensayo está haciendo una determinación precisa. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, por ejemplo. En un enfoque, las curvas convencionales se forman

usando concentraciones conocidas de los analitos que se van a identificar sistemáticamente. Como se discute en el presente documento, también se pueden usar calibradores y otros controles.

5 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 de analito. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra de la que se sospecha que contiene el analito, se considera que está incluido dentro del alcance de la expresión anterior. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para mediciones, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Descripción general de ensayos sin aglutinación para un analito

10 Cualquier ensayo sin aglutinación adecuado se puede emplear para determinar un analito de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. El ensayo se puede llevar a cabo en la muestra como una continuación inmediata del tratamiento previo como se ha discutido anteriormente o el ensayo se puede llevar a cabo en un punto posterior. Por lo tanto, un ensayo particular se puede realizar de forma secuencial o simultánea. Los ensayos se realizan combinando la muestra respectiva con reactivos para determinar la cantidad de analito en la muestra.
15 La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo a realizar. En general, el ensayo es un método para la determinación de la cantidad de un analito en una muestra. A continuación se describen varios métodos de ensayo a modo de ilustración y no de limitación.

20 El ensayo comprende la adición de reactivos para determinar la concentración del analito en la muestra a un medio que comprende la muestra. Para inmunoensayos, los reactivos comprenden al menos un anticuerpo para el analito o un miembro de un sbp similar. Se mide la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito y la cantidad del complejo se relaciona con la concentración de analito y otras sustancias en la muestra.

25 Un grupo general de inmunoensayos sin aglutinación que se puede emplear incluye inmunoensayos sin aglutinación que usan una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos sin aglutinación implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales tal como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el analito. Otro grupo de inmunoensayos sin aglutinación son ensayos homogéneos sin separación en los cuales los reactivos etiquetados modulan la señal de la etiqueta sobre las reacciones de unión de analito-anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos sin aglutinación incluye reactivos de anticuerpos etiquetados, ensayos competitivos limitados 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 libre depende de la concentración del analito en la muestra.
30

35 Los anticuerpos específicos para un analito para uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como la inmunización de un hospedador y la recolección de sueros (policlonales) o mediante la preparación de 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.

40 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, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, se pueden usar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre y cuando se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

45 Como se ha discutido anteriormente, un anticuerpo seleccionado para su uso en un inmunoensayo para un analito, por ejemplo, debería unir específica y preferentemente el analito (y sus metabolitos farmacéuticamente activos, si es necesario o se desea) con respecto a otros ligandos, tales como otros metabolitos o sustancias relacionadas. Otros reactivos están incluidos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que se va a llevar a cabo.

Como se ha discutido anteriormente, los inmunoensayos sin aglutinación puede implicar reactivos etiquetados. Los inmunoensayos etiquetados sin aglutinación incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida y ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

50 En algunas realizaciones se pueden usar inmunoensayos homogéneos sin aglutinación; dichos ensayos también se pueden denominar inmunoensayos esencialmente exentos 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 de los analitos. En un ensayo de "extracción no manual", una muestra tal como una muestra de sangre completa, sin extracción en, por ejemplo, un disolvente orgánico, se combina

con reactivos para realizar un ensayo para el analito en un medio adecuado y se realiza el método de ensayo. Los métodos actuales también encuentran aplicación a los ensayos de extracción manual.

Los ensayos se pueden realizar sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) que se desvela en Rubenstein, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los que se describen en Ullman, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 3.996.345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los que se describen en Maggio *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se describe, por ejemplo, en, entre otros, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.354.693; etcétera.

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

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); Inmunoensayos con etiqueta de éster de acridinio que utilizan partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayos ADVIA Centaur); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que involucran la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de la superficie inmovilizada con un anticuerpo tras la unión de un analito. 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 y ensayos de electrodos amperométricos, por ejemplo.

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

En una realización, el ensayo es un inmunoensayo de luminiscencia inducido, que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula de etiqueta que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula etiquetada se conjuga con un miembro sbp, por ejemplo, un anticuerpo para el analito que se puede unir al analito para formar un complejo, o a un segundo miembro sbp para formar un complejo, en relación con la cantidad de analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente se acercan mucho. 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.

A modo de ilustración adicional, se emplean partículas quimioluminiscentes, que comprenden el compuesto quimioluminiscente asociado con las mismas, tal como por incorporación en las mismas o unión a las mismas. Un miembro de un sbp que se une al analito, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para analito, está unido a un polisacárido que reviste las partículas. Un segundo miembro de sbp que se une al analito es parte de un conjugado de biotina. La estreptavidina se conjuga con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado. La unión de la estreptavidina a este segundo conjunto de partículas (partículas fotosensibilizadoras) puede 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. El medio de reacción se incubaba para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los miembros del sbp al analito. A continuación, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora cerca del fotosensibilizador en virtud de la presencia de las sustancias y/o el analito, se activa con oxígeno singlete y emite luminiscencia. A continuación se examina el medio para determinar la cantidad de luminiscencia o luz emitida, y su presencia está relacionada con la cantidad de sustancias que se unen al anticuerpo para el analito o la cantidad de analito.

Otro ejemplo particular de un ensayo que se puede usar para la determinación de un analito se discute en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.616.719 (Davalian, *et al.*), que describe inmunoensayos de canalización de oxígeno fluorescente.

Otra realización de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el anticuerpo para el analito se une mediante enlace covalente a una partícula magnética. La muestra se incuba con estas partículas para permitir que los anticuerpos para el analito se unan al analito y/o sustancias en la muestra que no sean analitos que también se unan al anticuerpo. Posteriormente, una enzima que tiene el analito o un derivado del analito unido mediante enlace covalente se incuba con la partícula magnética. Después del lavado, la cantidad de enzima que está unida a la partícula magnética se mide y está inversamente relacionada con la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito. Como alternativa, la cantidad de enzima en el líquido sobrenadante se mide y está directamente relacionada con la cantidad de un complejo que comprende el anticuerpo para el analito.

5 Los ensayos que se han discutido anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio acuoso tamponado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad óptima al ensayo y no interfiere con el ensayo empleado. El pH para el medio de ensayo generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH generalmente será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como los miembros de un sistema productor de señales, y así sucesivamente.

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

15 Como se ha mencionado anteriormente, se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre las adiciones de varios reactivos mencionados anteriormente. Las condiciones para un periodo de incubación se han discutido anteriormente.

20 La concentración de analito que se puede analizar 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 presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración de analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

25 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán mediante el intervalo de concentraciones 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 por vía empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo en el rango. Es decir, una variación en la concentración de analito que sea importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza de un sistema productor de señales y la naturaleza del análisis normalmente determinan las concentraciones de los distintos reactivos.

30 Aunque el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo sin aglutinación. El orden de adición más simple es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, los reactivos se pueden combinar de manera secuencial. Opcionalmente, se puede involucrar una etapa de incubación posterior a cada adición como se ha discutido anteriormente.

Ejemplos específicos de inmunoensayos sin aglutinación para la determinación de un fármaco inmunosupresor

35 Los siguientes ejemplos específicos son a modo de ilustración y no limitantes del alcance de la presente invención. La selección de tacrolimus o sirolimus como fármaco inmunosupresor también es a modo de ilustración y no de limitación, ya que la presente invención tiene una aplicación general para la detección de analitos en general y fármacos inmunosupresores en particular.

40 La muestra que se va a analizar es una que se sospecha que contiene uno o más analitos inmunosupresores farmacológicos. En estos ejemplos, la muestra es sangre completa, que es sangre no fraccionada o sangre que comprende tanto glóbulos rojos como plasma. La muestra se trata con uno o más agentes de liberación para liberar el analito inmunosupresor de fármaco de la unión de sustancias endógenas. Para el fármaco inmunosupresor en este ejemplo, los agentes de liberación pueden incluir uno o más de un agente de lisis y un agente hemolítico como se ha discutido anteriormente para liberar el fármaco inmunosupresor de los glóbulos rojos. La naturaleza y la cantidad o concentración del agente hemolítico y/o del agente de lisis empleado se han discutido anteriormente. La muestra y el

reactivo de anticuerpo también se someten a un agente de tratamiento previo como se ha descrito anteriormente, que puede llevarse a cabo como una etapa separada, o el agente de tratamiento previo se puede incluir en el medio con uno o más agentes de liberación. Por lo tanto, todo lo anterior se puede combinar de forma simultánea en el medio o uno o más de los reactivos anteriores se pueden añadir secuencialmente en concentraciones como se ha discutido anteriormente. El medio también puede comprender uno o más conservantes como se conoce en la técnica.

En un ejemplo, después de un tratamiento con uno o más agentes de liberación que incluyen el éster FK506, una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor tacrolimus en un medio de ensayo se mezcla con un conjugado de tacrolimus, es decir, por ejemplo, un análogo de tacrolimus que se une a biotina. La muestra se incuba para permitir la unión de tacrolimus de la muestra al anticuerpo para tacrolimus en competencia con el análogo de tacrolimus, donde el anticuerpo es capaz de unirse a tacrolimus o al análogo de tacrolimus. El medio también incluye salicilato de sodio como agente de tratamiento previo como se ha discutido anteriormente. Después de enjuagar con un tampón de lavado apropiado, se puede añadir 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 a continuación se examina para determinar la cantidad de señal. La cantidad de señal está relacionada con la cantidad de tacrolimus en la muestra.

En otro ejemplo, un inmunoensayo sin aglutinación empleado es un ensayo de luminiscencia inducida como se ha descrito 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 revestido con tacrolimus o un análogo de tacrolimus y contiene un colorante quimioluminiscente. El segundo reactivo de perlas está revestido con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. Un medio que contiene una muestra de lo que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor tacrolimus y un reactivo de anticuerpo se trata con ácido tricloroacético como un agente de tratamiento previo como se ha mencionado anteriormente, en el que el medio puede contener uno o más agentes de liberación que incluyen 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 que se une al anticuerpo tacrolimus.

Otro ejemplo específico de acuerdo con los principios que se presentan en el presente documento implica un formato de ensayo conocido como ACMIA (Affinity Chromium dioxide Mediated Immuno Assay). Para el formato de ensayo ACMIA, las partículas de cromo, que están revestidas 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 indicadora (por ejemplo, beta-galactosidasa), se añade a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la requerida para unir todo el analito que pueda estar presente en una muestra. Después del tratamiento con salicilato de sodio como agente de tratamiento previo como se ha discutido anteriormente y con uno o más agentes de liberación que incluyen el éster de tacrolimus, el medio que comprende la muestra sospechosa de contener sirolimus y el conjugado anticuerpo-enzima se incuba para permitir que el analito de sirolimus sea una al anticuerpo. A continuación, se añade el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. A continuación, 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 indicadora se añade al recipiente de reacción final, y la actividad enzimática se mide por vía espectrofotométrica como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de sirolimus en la muestra.

En un formato de ensayo sándwich, a modo de ejemplo, se emplean un primer reactivo que comprende partículas de cromo revestidas con anticuerpos anti-tacrolimus y un segundo reactivo que comprende un segundo anticuerpo (o proteína de unión) para el primer anticuerpo conjugado con una enzima indicadora. Después del tratamiento con salicilato de sodio como agente de tratamiento previo como se ha mencionado anteriormente y con uno o más agentes de liberación que incluyen FK506, se incuba una muestra de lo que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor tacrolimus y las partículas de cromo se incuban de manera que todo el tacrolimus, si está presente en la muestra, se une a las partículas de cromo. Las partículas de cromo se lavan, usando un imán para separar el analito unido del sobrenadante. A continuación, el segundo reactivo, es decir, el anticuerpo (o proteína de unión) conjugado con una enzima indicadora, se incuba con las partículas de cromo para formar un "sándwich". Después del lavado, se mide la cantidad de enzima que se une al cromo y se relaciona con la cantidad de tacrolimus en la muestra.

Otro ejemplo específico de un formato de ensayo, con fines de ilustración y no de limitación, es EMIT® (Enzyme-Mediated Immunoassay Technology). Después del tratamiento con ácido tricloroacético como agente de tratamiento previo como se ha discutido anteriormente y con uno o más agentes de liberación que incluyen el éster de tacrolimus, un medio que comprende la muestra sospechosa de contener sirolimus y un anticuerpo para sirolimus, un conjugado enzimático, por ejemplo, un conjugado de G-6-PDH, se incuba durante un periodo de tiempo apropiado. Después de realizar el ensayo, se mide la cantidad de actividad enzimática y se relaciona con la cantidad de sirolimus en la muestra.

Kits para realizar inmunoensayos sin aglutinación

- 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 combinación envasada, un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, reactivos para liberar un analito de sustancias de unión endógenas, un anticuerpo para un analito y otros reactivos para realizar un
- 5 inmunoensayo sin aglutinación, 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, tales como miembros sbp adicionales, reactivos auxiliares, tales como un sustrato de enzima auxiliar, y así sucesivamente.
- 10 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 se deben producir durante el presente método y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit se pueden proporcionar como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluidos los excipientes, que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones
- 15 adecuadas 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 ha descrito anteriormente.

La expresión "al menos" como se usa en el presente documento se refiere a que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número mencionado. El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere a que el número mencionado puede diferir en más o menos un 10 %; por ejemplo,

20 "aproximadamente 5" se requiera un intervalo de 4,5 a 5,5.

Los siguientes ejemplos describen más detalladamente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y pretenden describir y no limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes que se describen en el presente documento están en volumen, a menos que se indique de otro modo.

Ejemplos

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

El ensayo se lleva a cabo con el analizador DIMENSION® RxL, disponible en Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. El instrumento se emplea usando la tecnología de inmunoensayo ACMIA. El método de ensayo ACMIA se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 7.186.518, 5.147.529, 5.128.103, 5.158.871,

30 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 usado en el presente documento y discutido con más detalle a continuación, se usa 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

35 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 usado, 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

40 valores se pueden usar para calcular el porcentaje de actividad enzimática unida al anticuerpo activo.

Los siguientes términos usados en el presente documento se definen como sigue a continuación: "µg" es microgramo(s); "ml" es mililitro(s); "mg" es miligramo(s); "µl" es microlitro(s); y "ng" es nanogramo(s).

EJEMPLO 1

Inmunoensayo sin aglutinación automatizado para Tacrolimus

- 45 Preparación de la solución de tratamiento previo. Esta solución de tratamiento previo contenía sirolimus, azida de sodio, sal de sodio de Pipes 1.5, deshidrato de disodio con EDTA, saponina, PLURONIC® 25R2, PROCLIN® 300, sulfato de neomicina y agente de tratamiento previo (tricloroacetato de sodio, salicilato de sodio o una combinación de ambos).

50 Preparación de conjugado de anticuerpo anti-tacrolimus-β-galactosidasa. El anticuerpo monoclonal anti-tacrolimus (clon 1H6 de Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Glasgow, Delaware) se conjugó con β-galactosidasa usando un conector de SMCC heterobifuncional convencional (trans-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) de acuerdo con técnicas conocidas. La solución de conjugado de anticuerpos contiene aproximadamente 7,5 µg/ml de anticuerpo anti-tacrolimus-P-galactosidasa, 30 mg/ml de albúmina de suero bovino

exento de proteasas, 0,126 mg/ml de MgCl₂, 0,03 ml/ml de etilenglicol, 35,14 mg/ml de Sal de sodio PIPES 1.5, 50 mg/ml de NaCl y muteína beta-gal (beta-galactosidasa inactivada), pH 6,5.

5 Preparación de partículas magnéticas de cromo. Las partículas de cromo tacrolimus (fase sólida del inmunoensayo) se preparan conjugando tacrolimus-C22 con fluoresceína, que se usa para decorar previamente el anticuerpo anti-fluoresceína inmovilizado sobre 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®.

10 Ensayo de no aglutinación para Tacrolimus. El principio y el funcionamiento del ensayo ACMIA para tacrolimus usando un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento es el siguiente: 15 µl de una muestra de sangre completa sospechosa de contener tacrolimus se mezcla con la solución de tratamiento previo hemolítica en un recipiente en el analizador DIMENSION® RxL. Se toma una muestra de sangre completa de una taza convencional mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre completa con la solución de tratamiento previo garantiza la hemólisis de la sangre completa y el desplazamiento de las moléculas de tacrolimus unidas a la proteína de sus sitios de unión cuando las moléculas de sirolimus estaban presentes.

20 Se añade conjugado de anticuerpo anti-tacrolimus-P-galactosidasa (50 µl) junto a cada uno de los recipientes de reacción y la mezcla se mantiene durante un periodo de tiempo (10 a 15 minutos) y a una temperatura de 43 °C para permitir que el tacrolimus, si estuviera presente, reaccione con el reactivo de anticuerpo. Las partículas de cromo con tacrolimus-CMO-DA10-Dexal inmovilizado preparado como se ha descrito anteriormente se añaden (50 µl) a cada uno de los recipientes de reacción y se les 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 25 clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido (CPRG). La velocidad para cada recipiente de reacción se mide bicromáticamente a 577 y 700 nm.

Para fines de comparación, la solución de tratamiento previo mencionada anteriormente se usó sin un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

30 Tricloroacetato de sodio como agente de tratamiento previo. La Tabla 1 muestra la composición de la solución de tratamiento previo, que contiene un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Cant es cantidad. EDTA es etilendiamintetraacetato.

Tabla 1

Solución de Tratamiento Previo	
Nombre	Cant (mg/ml)
Sirolimus	0,0012
Tricloroacetato de Sodio	135
Azida de Sodio	0,99
Sal de sodio Pipes 1.5	6,8
Dihidrato de EDTA disódico	0,3
Saponina	1
PLURONIC® 25R2	0,9
PROCLIN® 300	0,4
Sulfato de neomicina	0,024

5 La Tabla 2 muestra la comparación entre la solución de tratamiento previo que contiene un agente de tratamiento previo (12 % tricloroacetato de sodio) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento y la solución de tratamiento previo que no contiene un agente de tratamiento previo. En las siguientes tablas, LC/MS² es cromatografía líquida/espectrometría de masas llevada a cabo en un espectrómetro de masas en tándem usando una columna de fase inversa. TCA es tricloroacetato de sodio (agente de tratamiento previo). PT es solución de tratamiento previo. Control representa el uso de un reactivo de tratamiento previo que no contiene TCA.

Tabla 2

LC/MS ² ng/ml	TCA al 12 % en PT	Control Sin TCA en PT (ng/ml)
11,8	11,9	10,2
5,7	5,7	4,2
2,9	2,8	2,2
0,1	-0,3	-0,1
5,9	5,9	5,1
6,8	6,7	5,1
4,8	4,8	3,9
10,5	10,8	9,8
15,1	15,6	13,9
6,8	7,4	5,9
7,6	7,7	6,3
8,2	8,2	6,9
6,6	6,7	5,6
4,1	3,8	3,1
12,3	11,7	10,6
4,1	4,1	3,3
5,9	6,0	5,3
4,8	4,8	4,3

10

Como se puede observar a partir de los resultados en la Tabla 2, el uso de un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento obtiene resultados del ensayo que son casi paralelos a los obtenidos usando LC/MS² mientras que el control no los obtiene

15 Salicilato de sodio como agente de tratamiento previo. La Tabla 3 muestra la composición de la solución de tratamiento previo, que contiene un agente de tratamiento previo (salicilato de sodio al 5 %) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

Tabla 3

Solución de Tratamiento Previo	
Nombre	Cant (mg/ml)
Sirolimus	0,0012
Salicilato de Sodio	50
Azida de Sodio	0,99

(continuación)

Solución de Tratamiento Previo	
Nombre	Cant (mg/ml)
Sal de sodio Pipes 1.5	6,8
Dihidrato de EDTA disódico	0,3
Saponina	1
PLURONIC® 25R2	0,9
PROCLIN® 300	0,4
Sulfato de neomicina	0,024

La Tabla 4 muestra la comparación entre la solución de tratamiento previo que contiene un agente de tratamiento previo (salicilato de sodio al 5 %) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento y la solución de tratamiento previo que no contiene un agente de tratamiento previo.

5

Tabla 4

LC/MS ²	Salicilato al 5 % en PT (ng/ml)	Control Sin Salicilato en PT (ng/ml)
3,1	3,4	4,6
5,1	4,7	3,8

Como se puede observar a partir de los resultados en la Tabla 4, el uso de un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento obtiene resultados del ensayo que son casi paralelos a los obtenidos usando LC/MS mientras que el control no los obtiene.

- 10 Combinación de salicilato de sodio y tricloroacetato de sodio como agente de tratamiento previo. La Tabla 5 muestra la composición de la solución de tratamiento previo, que contiene un agente de tratamiento previo (salicilato de sodio al 1 %/tricloroacetato de sodio al 11 %) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

Tabla 5

Solución de Tratamiento Previo	
Nombre	Cant (mg/ml)
Sirolimus	0,0012
Salicilato de Sodio	10
Tricloroacetato de Sodio	110
Azida de Sodio	0,99
Sal de sodio Pipes 1.5	6,8
Dihidrato de EDTA disódico	0,3
Saponina	1
PLURONIC® 25R2	0,9
PROCLIN® 300	0,4
Sulfato de neomicina	0,024

- 15 La Tabla 6 muestra la comparación entre la solución de tratamiento previo que contiene un agente de tratamiento previo (salicilato de sodio al 1 %/tricloroacetato de sodio al 11 %) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento y la solución de tratamiento previo que no contiene un agente de tratamiento previo.

Tabla 6

LC/MS ²	Salicilato al 1 %/TCA al 11 % en PT (ng/ml)	Control Sin Salicilato/TCA (ng/ml)
3,1	3,2	4,6
5,1	4,7	3,8

- 20 Como se puede observar a partir de los resultados en la Tabla 6, el uso de un agente de tratamiento previo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento obtiene resultados del ensayo que son casi paralelos a los obtenidos usando LC/MS mientras que el control no los obtiene.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de la que se sospecha que contiene el fármaco inmunosupresor, comprendiendo el método un inmunoensayo sin aglutinación que comprende:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

- 5 (i) la muestra,
(ii) un agente de liberación para liberar el fármaco inmunosupresor de sustancias de unión endógenas, en el que el agente de liberación se selecciona entre el grupo que consiste en uno o más de un análogo estructural del fármaco inmunosupresor y un agente hemolítico,
10 (iii) un reactivo de anticuerpo que comprende un anticuerpo para el fármaco inmunosupresor,
(iv) un agente de tratamiento previo seleccionado entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con hidroxifenilo y sales metálicas de los mismos y ácidos carboxílicos C1-C5 sustituidos con halógeno y sales metálicas de los mismos en una cantidad eficaz para aumentar la precisión del inmunoensayo sin aglutinación;

15 (b) incubar el medio en condiciones para unir el anticuerpo para el fármaco inmunosupresor al fármaco inmunosupresor que se sospecha que está en la muestra, en el que la temperatura de incubación es de 5 °C a 99 °C y el periodo de tiempo para la incubación es de 0,2 segundos a 24 horas,

20 (c) examinar el medio para la presencia de un complejo que comprende el fármaco inmunosupresor y el anticuerpo para el fármaco inmunosupresor, la presencia y/o cantidad del complejo indicando la presencia y/o cantidad del fármaco inmunosupresor en la muestra, en el que el fármaco inmunosupresor se selecciona entre el grupo que consiste en ciclosporina, everolimus, sirolimus y tacrolimus.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el agente de tratamiento previo es una sal metálica de ácido salicílico.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el agente de tratamiento previo es una sal metálica de un ácido carboxílico C1-C5 sustituido con cloro.

25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el agente de tratamiento previo es una sal metálica de un ácido acético sustituido con cloro.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el agente de tratamiento previo es una sal metálica de ácido tricloroacético.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el reactivo de anticuerpo además comprende una etiqueta.

30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la combinación además comprende una partícula.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el reactivo de anticuerpo además comprende una etiqueta enzimática y la combinación además comprende una partícula magnética.

35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la combinación además comprende un análogo estructural del fármaco inmunosupresor y al menos uno del anticuerpo para el fármaco inmunosupresor o el análogo comprende una etiqueta.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el agente de liberación además comprende un agente de solubilidad.