

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 364**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2007 E 07865858 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2118654**

54 Título: **Ensayo diagnóstico para la detección de una molécula o fármaco en sangre entera**

30 Prioridad:

**29.12.2006 US 882732 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.05.2013**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (20.0%)  
D0377, BLDG AP6A-1A, 100 ABBOTT PARK  
ROAD  
ABBOTT PARK, IL 60064, US;  
GRENIER, FRANK C. (20.0%);  
WORKMAN, RYAN F. (20.0%);  
SYED, HINA N. (20.0%) y  
ALI, SALMAN (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GRENIER, FRANK C;  
WORKMAN, RYAN F;  
SYED, HINA N y  
ALI, SALMAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 405 364 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Ensayo diagnóstico para la detección de una molécula o fármaco en sangre entera

### 5 **Campo técnico**

Esta descripción se relaciona con el uso de una o más proteasas en la preparación de muestras para ensayos diagnósticos para reducir o eliminar el sesgo de las muestras producido por la congelación o el almacenamiento de muestras biológicas antes del ensayo.

10

### **Antecedentes**

Muchos analitos de interés clínico son captados por las células o se acomplejan con uno o más de otros componentes de la muestra de ensayo. Por consiguiente, para obtener una medición exacta de la cantidad de analito presente en la muestra, es necesario tratar la muestra y/o realizar el ensayo en condiciones tales que el analito se libere de las células u otro(s) componente(s) para su detección en el ensayo.

15

Por ejemplo, los fármacos inmunosupresores tales como tacrolimus, everolimus, temsorolimus y ciclosporina son efectivos para el tratamiento del rechazo de órganos o de tejidos tras una cirugía de trasplante, de la enfermedad del injerto contra el huésped y de enfermedades autoinmunes en humanos. Durante la terapia con fármacos inmunosupresores, la monitorización de los niveles de concentración en sangre del inmunosupresor es un aspecto importante del cuidado clínico, ya que niveles insuficientes de fármaco dan lugar a rechazo del injerto (órgano o tejido) y niveles excesivos dan lugar a efectos colaterales y toxicidades no deseados. Se miden, por lo tanto, los niveles en sangre de inmunosupresor para poder ajustar las dosificaciones del fármaco con objeto de mantener el nivel del fármaco en la concentración apropiada. Los ensayos diagnósticos para la determinación de los niveles en sangre de inmunosupresor han encontrado así un amplio uso clínico.

20

25

Inicialmente, se debe extraer y separar el inmunosupresor de los otros componentes de la muestra del paciente. El grueso del fármaco inmunosupresor en la muestra del paciente está presente en un complejo con diversas moléculas "portadoras", tales como proteínas de unión. El sirolimus, el tacrolimus y la ciclosporina se encuentran predominantemente en los hematíes de los especímenes de los pacientes y se asocian con proteínas de unión específicas, FKBP para el sirolimus y el tacrolimus y ciclofilina para la ciclosporina. Para asegurar una medición precisa de la concentración de fármaco total en el espécimen, preferiblemente se libera el fármaco unido a las proteínas de unión antes de la cuantificación. Se ha abordado esto usando detergentes para lisar las células y/o solventes orgánicos para desnaturalizar las proteínas de la muestra.

30

35

Después de su extracción de las proteínas de unión, se puede medir el fármaco en una serie de formas diferentes, incluyendo por inmunoensayo o cromatografía con absorbancia o detección espectrofotométrica de masas. Los inmunoensayos para fármacos inmunosupresores están disponibles en una variedad de formatos, pero todos utilizan la unión de un anticuerpo o proteína de unión (v.g., FKBP) al fármaco inmunosupresor. Un inmunoensayo comúnmente utilizado es un ensayo que conlleva la unión de un primer anticuerpo al inmunosupresor y la unión de inmunosupresor marcado (v.g., acridinio-sirolimus) al resto de los sitios libres de unión del anticuerpo, seguido de cuantificación por detección del marcaje.

40

La Solicitud de Patente Europea Nº EP 0.753.744 A2, publicada el 15 de Enero de 1997, describe un método de ensayo de una muestra de sangre en cuanto a la concentración de un fármaco inmunosupresor unido a una inmunofilina. Se incubaba la muestra con un detergente no iónico y una proteasa, se inactiva la proteasa y se determina la concentración del fármaco.

45

La Patente EE.UU. Nº 5.135.875, publicada el 4 de Agosto de 1992, describe un reactivo de precipitación consistente en una sal de zinc, un glicol y un alcohol lineal o ramificado de aproximadamente 1 a 4 átomos de carbono. El reactivo es útil para precipitar proteínas y extraer analitos hidrofóbicos (ciclosporina en particular) de una muestra de ensayo biológica, tal como sangre entera.

50

### 55 **Resumen**

Esta invención se relaciona con el descubrimiento de que se pueden incorporar una o más proteasas en preparaciones (v.g., para inmunoensayos) para resolver el sesgo en la concentración de un analito (v.g., fármaco) observado entre la utilización de muestras enteras frescas no lisadas (v.g., muestras de sangre de pacientes) y de muestras lisadas congeladas-descongeladas (v.g., diluyente de calibrador). También se descubrió que la(s) proteasa(s) es/son particularmente útil(es) en la preparación de muestras para ensayos diagnósticos en donde una proteína de unión se proteoliza a lo largo del tiempo, cambiando así la afinidad por su ligando (analito), lo que, a su vez, cambia la concentración del ligando detectado en el ensayo diagnóstico.

60

Así, en ciertas realizaciones, esta invención proporciona métodos de preparación de una muestra de ensayo para uso en un ensayo para la detección de un analito no proteico unido a un ligando intracelular según se define en las reivindicaciones. Los métodos típicamente implican el contacto de dicha muestra de ensayo (v.g., muestra biológica) con un reactivo de ensayo que incluye un reactivo de lisis libre de detergente según se define en la reivindicación 1 y una proteasa que tiene actividad proteolítica para el ligando intracelular, para formar una mezcla homogénea compatible para uso en un inmunoensayo sin posteriores etapas de extracción, donde no se usa ningún detergente para lisar o solubilizar la muestra de ensayo. En diversas realizaciones, la muestra de ensayo consiste en sangre entera o en una fracción de sangre (v.g., suero). En diversas realizaciones, la muestra de ensayo consiste en sangre humana (v.g., sangre de un humano en tratamiento con un inmunosupresor). En diversas realizaciones, la proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en una serina proteasa, una metaloproteasa, una tioproteasa, una ácido aspártico proteasa y una ácido glutámico proteasa. En ciertas realizaciones, la proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en proteinasa K, dispasa y tripsina. El reactivo de lisis consiste en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos (v.g., metanol, etanol, propanol y similares). La razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, más preferiblemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. En ciertas realizaciones, la muestra de ensayo es añadida al reactivo de lisis (o a los componentes del reactivo de lisis), para formar una mezcla de muestra:reactivo de lisis en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2. En ciertas realizaciones, el método no incluye la centrifugación de la muestra. En ciertas realizaciones, el reactivo de ensayo incluye además un competidor que compite con el analito por la unión al ligando intracelular, pero que substancialmente no tiene reacción cruzada con el sistema de captura del ligando (analito) (v.g., anticuerpo u otro ligando de captura) en el sistema de detección del ensayo. En ciertas realizaciones, el ligando intracelular es un ligando de inmunofilina. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en una molécula diferente, aunque estructuralmente similar (v.g., un análogo) que puede ser o no un fármaco inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

En ciertas realizaciones, esta descripción proporciona métodos de preparación de una muestra de ensayo para uso en un ensayo para la detección de un analito unido a un ligando intracelular. Los métodos típicamente implican el contacto de la muestra de ensayo con un reactivo consistente en un reactivo de lisis libre de detergente y una proteasa que tiene actividad proteolítica para el ligando intracelular. En diversas realizaciones, la muestra de ensayo consiste en sangre entera o en una fracción de sangre (v.g., suero). En diversas realizaciones, la muestra de ensayo consiste en sangre humana (v.g., sangre de un humano en tratamiento con un inmunosupresor). En diversas realizaciones, la proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en una serina proteasa, una metaloproteasa, una tioproteasa, una ácido aspártico proteasa y una ácido glutámico proteasa. En ciertas realizaciones, la proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en proteinasa K, dispasa y tripsina. En diversas realizaciones, el reactivo de lisis consiste en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un análogo de los mismos, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos (v.g., metanol, etanol, propanol y similares). En ciertas realizaciones, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, más preferiblemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2. En ciertas realizaciones, la muestra de ensayo es añadida al reactivo de lisis (o a los componentes del reactivo de lisis), para formar una mezcla de muestra:reactivo de lisis en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2. En ciertas realizaciones, el método no incluye la centrifugación de la muestra. En ciertas realizaciones, no se usa un detergente para lisar o solubilizar la muestra de ensayo. En ciertas realizaciones, el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo con un detergente. En ciertas realizaciones, el reactivo de ensayo incluye además un competidor que compite con el analito por la unión al ligando intracelular, pero que substancialmente no tiene reacción cruzada con el sistema de captura del ligando (analito) (v.g., anticuerpo u otro ligando de captura) en el sistema de detección del ensayo. En ciertas realizaciones, el ligando intracelular es un ligando de inmunofilina. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en una molécula diferente, aunque estructuralmente similar (v.g., un análogo) que puede o no ser un fármaco inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

También se describe un método para determinar la concentración de un analito (v.g., un fármaco inmunosupresor) en una muestra de ensayo. Los métodos típicamente implican el contacto de una muestra de ensayo con un reactivo de ensayo para producir una mezcla de ensayo compatible para uso en un inmunoensayo sin posteriores etapas de extracción, donde el reactivo de ensayo está constituido por un reactivo de lisis (o sus componentes) y una proteasa que tiene actividad proteolítica para un ligando intracelular que se une al analito, y el ensayo de la mezcla de lisis en cuanto al analito (v.g., un fármaco inmunosupresor). En ciertas realizaciones, la mezcla de ensayo es una mezcla homogénea y/o el ensayo consiste en un inmunoensayo. En ciertas realizaciones, el fármaco inmunosupresor es seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de

cualquiera de estos compuestos. En ciertas realizaciones, la muestra de ensayo consiste en una muestra de sangre humana (v.g., sangre entera o una fracción de sangre (v.g., suero)).

5 En ciertas realizaciones, el método no incluye la centrifugación de la muestra. En ciertas realizaciones, no se usa un detergente para lisar o solubilizar la muestra de ensayo. En ciertas realizaciones, el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo con un detergente. En ciertas realizaciones, el reactivo de ensayo incluye además un competidor que compite con el analito por la unión al ligando intracelular, pero que substancialmente no presenta reacción cruzada con el sistema de captura del ligando (analito) (v.g., anticuerpo u otro ligando de captura) en el sistema de detección del ensayo. En ciertas realizaciones, el ligando intracelular es un ligando de inmunofilina. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en una molécula diferente, aunque estructuralmente similar (v.g., un análogo), que puede ser o no un fármaco inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

15 La invención proporciona un método para determinar la concentración de un fármaco inmunosupresor como se define en la reivindicación 11.

20 En ciertas realizaciones, esta invención proporciona un kit de ensayo que incluye al menos un anticuerpo o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado entre sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina, y un reactivo de ensayo consistente en un reactivo de lisis no detergente como se define en la reivindicación 21 y una proteasa que degrada un ligando de inmunofilina, donde la mezcla del reactivo de lisis es compatible para uso en un inmunoensayo sin ulteriores etapas de extracción y el reactivo de lisis, cuando se mezcla con una muestra de ensayo, forma una mezcla de reactivo de lisis que es una mezcla homogénea. El reactivo de lisis no detergente comprende un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos, según se define en la reivindicación 21. El kit puede eventualmente incluir además una composición de control que contenga el al menos un fármaco inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el kit incluye también un competidor que compite con el analito por la unión a un ligando intracelular, pero que no presenta reacción cruzada con el sistema de captura del ligando (analito) (v.g., anticuerpo u otro ligando de captura) en el sistema de detección del ensayo. En ciertas realizaciones, el ligando intracelular es un ligando de inmunofilina. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en una molécula diferente, aunque estructuralmente similar (v.g., un análogo) que puede ser o no un fármaco inmunosupresor. En ciertas realizaciones, el analito consiste en un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina. En ciertas realizaciones, se aporta el competidor en el reactivo de ensayo. En ciertas realizaciones, el ligando intracelular es un ligando de inmunofilina. En diversas realizaciones, el competidor consiste en un fármaco inmunosupresor que es diferente del fármaco inmunosupresor que se está estudiando, aunque estructuralmente similar a él.

#### 40 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra esquemáticamente una realización de los métodos de preparación de muestras aquí descritos.

#### **Descripción detallada**

45 Esta invención se relaciona, en general, con el uso de una o más proteasas en la preparación de muestras para ensayos diagnósticos con objeto de reducir o eliminar el sesgo de la muestra producido por la congelación o el almacenamiento de muestras biológicas antes del ensayo.

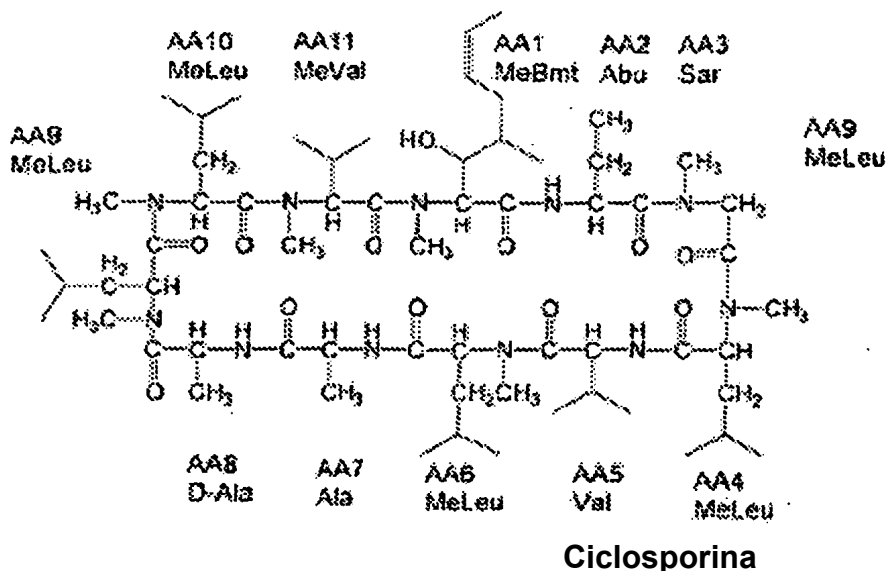
#### **Definiciones**

50 A continuación, se definen los términos usados en las reivindicaciones y en la memoria como se expone a continuación, a menos que se especifique de algún otro modo.

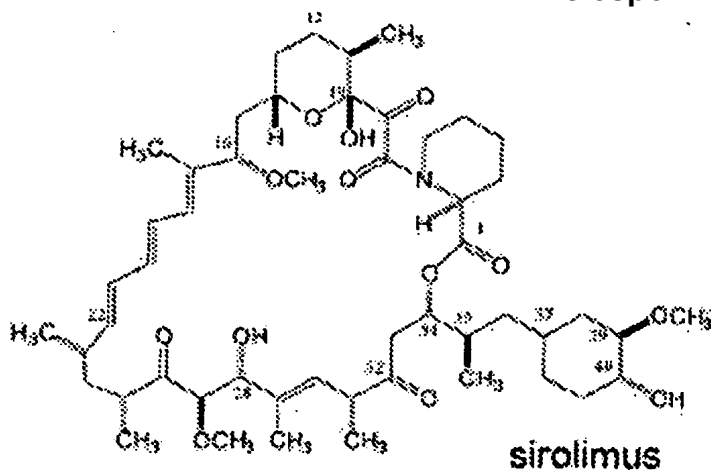
55 Un "fármaco inmunosupresor" o "inmunosupresor", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto terapéutico, ya esté basado en una molécula pequeña o en un anticuerpo, que tiene una estructura química idéntica o similar a la de la rapamicina (sirolimus) o a la de la ciclosporina, también conocida como ciclosporina A. Se considera aquí a cualquier análogo conocido o a partir de ahora desarrollado de la rapamicina o de la ciclosporina como un inmunosupresor. Como inmunosupresores preferidos, se incluyen sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsolorimus, zotarolimus y ciclosporina. El tacrolimus y la ciclosporina son inhibidores de la calcineurina que suprimen la activación precoz de los linfocitos T del sistema inmune por inhibición de citoquinas tales como la interleuquina 2. Por el contrario, el objetivo primario del sirolimus, del everolimus y del zotarolimus es el objetivo de la rapamicina de mamíferos (mTOR), una proteína reguladora específica del ciclo celular. La inhibición de mTOR conduce a la supresión de la proliferación de linfocitos T dirigida por citoquinas.

La fórmula química de la ciclosporina está en la Fórmula A. La fórmula química del sirolimus (rapamicina) está en la Fórmula B. La fórmula química de la diferencia estructural entre el everolimus (RAD) y el sirolimus está en la Fórmula C.

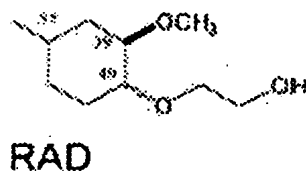
**A**



**B**



**C**



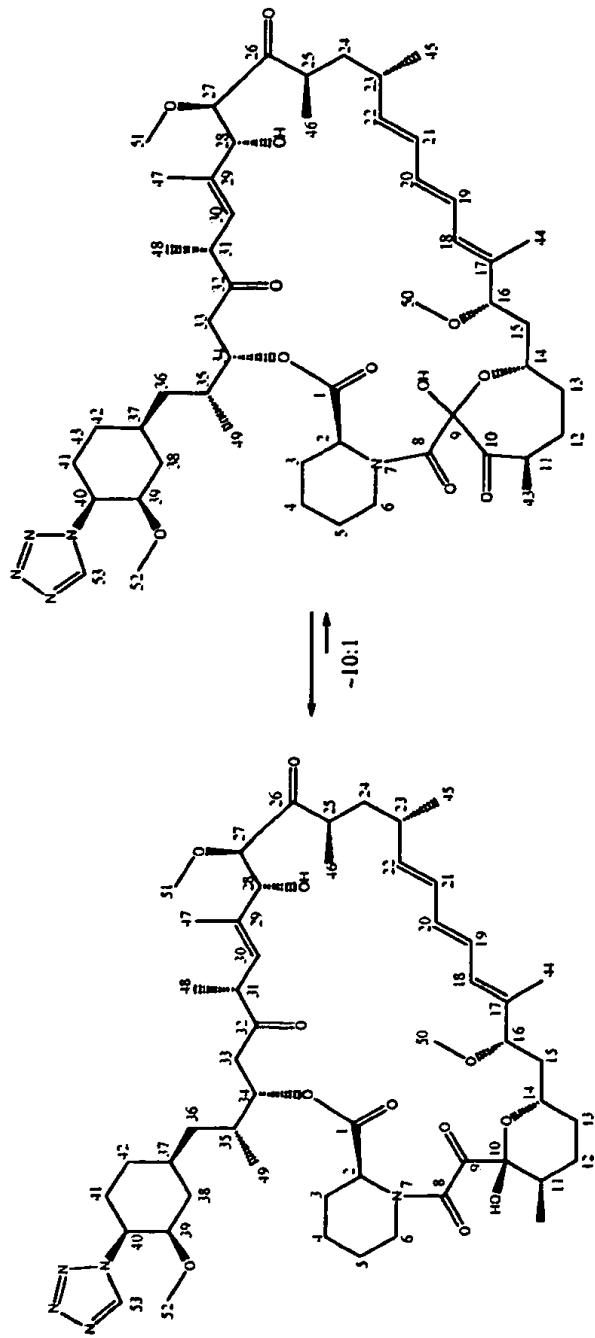
- 5
- Se han preparado numerosos derivados o análogos de ciclosporina. La descripción incluye reactivos de lisis, métodos de lisis, ensayos y kits de ensayo para ciclosporina o cualquiera de sus análogos.
- 10 Se han preparado numerosos derivados o análogos de rapamicina. Por ejemplo, éstos incluyen la preparación de derivados éster mono- y di-éster de rapamicina (Solicitud Internacional PCT WO 92/05179), 27-oximas de rapamicina (Patente EP 0.467.606), análogo 42-oxo de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.023.262), rapamicinas bicíclicas (Patente EE.UU. N° 5.120.725), dímeros de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.120.727), éteres silícicos de rapamicina (Patente EE.UU. N° 5.120.842) y arilsulfonatos y sulfamatos (Patente EE.UU. N° 5.177.203). La
- 15 rapamicina fue recientemente sintetizada en su forma enantiomérica natural (K. C. Nicolaou *et al.*, J. Am. Chem.

Soc., 1993, 115, 4419-4420; S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 7906-7907; S. J. Danishefsky, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9345-9346). La descripción incluye reactivos de lisis, métodos de lisis, ensayos y kits de ensayo para rapamicina o cualquiera de sus análogos.

5 Otro análogo inmunosupresor de la rapamicina es FK-506, también conocido como tacrolimus, que fue aislado de una cepa de *S. tsukubaensis*. La fórmula química del FK-506 está publicada en la Patente Europea EP 0.293.892 B1. Como análogos de FK-506, se incluyen, aunque sin limitación, los productos naturales relacionados FR-900520 y FR-900523, que difieren de FK-506 en su sustituyente alquilo en C-21 y que fueron aislados de *S. hygrosopicus yakushimnaensis*. Otro análogo, FR-900525, producido por *S. tsukubaensis*, difiere de FK-506 en el reemplazo de  
10 un resto de ácido pipercolico con un grupo prolina. Se describe un gran número de compuestos que conservan la estructura básica y las propiedades inmunológicas de FK-506 en una serie de publicaciones, por ejemplo: las Patentes Europeas Patente EP 184.162, Patente EP 315.973, Patente EP 323.042, Patente EP 423.714, Patente EP 427.680, Patente EP 465.426, Patente EP 484.936, Patente EP 532.088 y Patente EP 474.126; las Solicitudes Internacionales PCT WO 91/13889, WO 91/19495 y WO 93/5059; y similares. La descripción incluye reactivos de  
15 lisis, métodos de lisis, ensayos y kits de ensayo para FK-506 o cualquiera de sus análogos. El temsorolimus es otro derivado éster del sirolimus que puede ser monitorizado con la invención.

ABT-578 [40-epi-(1-tetrazolil)rapamicina], más conocido hoy en día como zotarolimus, es un antibiótico triénico macrólido semisintético derivado de rapamicina. En la Fórmula D se muestra la estructura del zotarolimus.  
20

Fórmula D. Los isómeros de zotarolimus



Pirano\_1 (isómero N-1)

Oxepano\_2

(1a)

(1b)

Tal como se utiliza aquí en relación a fármacos inmunosupresores, el término "estructuralmente similar" indica que los fármacos tienen estructuras suficientemente similares como para que los fármacos se unan competitivamente a al menos un compañero de unión común (v.g., una proteína de unión).

5 El término "muestra de ensayo" se refiere a un componente, tejido o fluido del cuerpo de un animal que es la fuente del analito del fármaco inmunosupresor. Estos componentes, tejidos y fluidos incluyen fluidos corporales humanos y animales, tales como sangre entera, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cerebroespinal, orina, líquidos linfáticos y diversas secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células blancas de la sangre, mielomas y similares; fluidos biológicos tales como sobrenadantes de cultivos celulares; 10 especímenes tisulares fijados; y especímenes celulares fijados. Preferiblemente, la muestra de ensayo es una muestra de sangre periférica humana.

Tal como se utiliza aquí, un "anticuerpo" se refiere a una proteína consistente en uno o más polipéptidos substancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Este 15 término abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos, así como moléculas obtenidas por ingeniería a partir de secuencias de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como infinidad de genes de regiones variables de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de 20 inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" 25 (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos primariamente responsables del reconocimiento antigénico. Los términos "cadena ligera variable (VL)" y "cadena pesada variable (VH)" hacen referencia a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados 30 producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de las uniones disulfuro en la región de bisagra para producir  $F(ab')_2$ , un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH I por un enlace disulfuro. El  $F(ab')_2$  puede reducirse en condiciones suaves para romper la unión disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de este modo el dímero  $(Fab')_2$  en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). 35 Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden ser sintetizados *de novo* químicamente o utilizando metodología del ADN recombinante.

Así, el término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por 40 modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* utilizando metodologías del ADN recombinante. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos de una sola cadena (anticuerpos que existen como una sola cadena polipeptídica), más preferiblemente anticuerpos Fv de una sola cadena (sFv o scFv), en donde una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un conector peptídico) 45 para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de una sola cadena es un heterodímero VH-VL covalentemente unido que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluya secuencias codificantes de VH y VL unidas directamente o unidas por un conector codificante de péptido (Huston *et al.* (1988), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883). Aunque VH y VL se conectan cada uno como una sola cadena polipeptídica, los dominios VH y VL se asocian no covalentemente. Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras convierten las 50 cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas de forma natural, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional substancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno, como es sabido para los expertos en la técnica (véase, v.g., Patentes EE.UU. N° 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778).

"Analito", tal como se utiliza aquí, se refiere a la sustancia que se ha de detectar, que puede ser sospechosa de 55 estar presente en la muestra de ensayo. El analito puede ser cualquier sustancia para la cual exista un compañero de unión específica natural o para la cual se pueda preparar un compañero de unión específica. Así, un analito es una sustancia que puede unirse a uno o más compañeros de unión específica en un ensayo.

Un "compañero de unión", tal como se utiliza aquí, es un miembro de un par de unión, es decir, un par de moléculas 60 donde una de las moléculas se une a la segunda molécula. Los compañeros de unión que se unen específicamente se denominan "compañeros de unión específica". Además de los compañeros de unión antígeno y anticuerpo comúnmente utilizados en inmunoensayos, otros compañeros de unión específica pueden incluir biotina y avidina,



carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas y similares. Como compañeros de unión específica inmunorreactivos, se incluyen antígenos, fragmentos de antígenos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, y complejos de los mismos, incluyendo los formados por métodos de ADN recombinante.

5 El término "unión específica" se define aquí como la unión preferente de unos compañeros de unión a otros (v.g., un polipéptido y un ligando (analito), dos polipéptidos, un polipéptido y una molécula de ácido nucleico o dos moléculas de ácido nucleico) en sitios específicos. El término "se une específicamente" indica que la preferencia de unión (v.g., afinidad) para la molécula/secuencia diana es al menos 2 veces mayor, más preferiblemente al menos 5 veces mayor y más preferiblemente al menos 10 ó 20 veces mayor con respecto a una molécula diana no específica (v.g., una molécula generada aleatoriamente que carece del/de los sitio(s) específicamente reconocido(s)).

10 Se dice que un anticuerpo que se une específicamente a un fármaco inmunosupresor es "específico para" ese fármaco inmunosupresor.

15 Los términos "reactivo de captura" o "agente de captura" hacen referencia a un compañero de unión que se une a un analito, más preferiblemente que se une específicamente a un analito. En diversas realizaciones, los agentes de captura pueden unirse a una fase sólida. Tal como se utiliza aquí, la unión de un agente de captura fijado a fase sólida a un analito forma un "complejo fijado a fase sólida."

20 El término "agente de detección marcado" es utilizado aquí para hacer referencia a un compañero de unión que se une a un analito, preferiblemente de manera específica, y que está marcado con un marcaje detectable o que resulta marcado con un marcaje detectable durante su uso en un ensayo.

25 Un "marcaje detectable" incluye un resto que es detectable o que puede hacerse detectable.

Tal como se utiliza en relación a un agente de detección marcado, un "marcaje directo" es un marcaje detectable que se une, por cualquier medio, al agente de detección.

30 Tal como se utiliza en relación a un agente de detección marcado, un "marcaje indirecto" es un marcaje detectable que se une específicamente al agente de detección. Así, un marcaje indirecto incluye un resto que es el compañero de unión específica de un resto del agente de detección. La biotina y la avidina son ejemplos de dichos restos, que se emplean, por ejemplo, por contacto de un anticuerpo biotinilado con avidina marcada para producir un anticuerpo indirectamente marcado.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "reactivo indicador" se refiere a cualquier agente que se pone en contacto con un marcaje para producir una señal detectable. Así, por ejemplo, en el marcaje enzimático convencional, se puede poner en contacto un anticuerpo marcado con una enzima con un sustrato (el reactivo indicador) para producir una señal detectable, tal como un producto de reacción coloreado.

40 Tal como se utiliza aquí, un "análogo de glicol" es cualquier glicol de dos a seis átomos de carbono.

45 Se dice que una mezcla de lisis es "homogénea" cuando está lo suficientemente libre de particulados de gran tamaño como para permitir un pipeteado preciso y fiable (ya sea manualmente o utilizando un sistema automatizado).

50 La expresión "sin ulteriores etapas de extracción", cuando se utiliza con respecto a una mezcla de ensayo, indica que la mezcla de ensayo está lista "tal cual está" para el inmunoensayo (como se describe aquí). Así, no se requiere ninguna centrifugación más antes del análisis. La mezcla puede estar lista para su aplicación a un analizador.

I. El uso de proteasas para reducir o eliminar el sesgo del ensayo.

55 La invención se relaciona con el uso de una proteasa o proteasas en preparaciones de muestras (v.g., para inmunoensayos) para resolver el sesgo en la concentración de un analito (v.g., fármaco) observado entre la utilización de sangre entera fresca no lisada (v.g., especímenes de pacientes) y sangre lisada congelada-descongelada (v.g., diluyente de calibrador). La(s) proteasa(s) es/son particularmente útiles en la preparación de muestras para ensayos diagnósticos en los que una proteína de unión se proteoliza a lo largo del tiempo, cambiando así la afinidad por su ligando (analito), lo que a su vez cambia la concentración del ligando detectado en el ensayo diagnóstico.

60 Las proteínas de unión intracelulares, tales como receptores hormonales, proteínas G, proteína kinasas, proteína fosfatasa, isomerasas y similares, se unen con frecuencia a un analito diana que ha de ser estudiado, por ejemplo, en un ensayo diagnóstico. Así, por ejemplo, las inmunofilinas se unen frecuentemente a fármacos inmunosupresores

tales como la rapamicina (sirolimus), el tacrolimus, el everolimus, el temsrolimus, el zotarolimus, la ciclosporina y similares. Las proteínas de unión intracelulares están típicamente protegidas del ambiente externo (v.g., matriz extracelular) por la membrana celular. Cuando se lisa esta membrana, las proteasas pueden acceder a estas proteínas de unión intracelulares y pueden alterar sus afinidades de unión por el analito diana asociado (v.g., fármaco, pequeña molécula, etc.).

Estos sucesos de lisis presentan un problema diagnóstico significativo, ya que con frecuencia se almacenan las muestras congeladas o durante períodos de tiempo prolongados, lo que conduce en ambos casos a lisis celular y proteolisis de las proteínas intracelulares. Así, se introduce un sesgo de ensayo en los ensayos para analitos unidos a dichas proteínas, ya que, en muestras frescas, las proteínas de unión intracelulares pueden estar relativamente intactas y tener una mayor afinidad por el/los analito(s) que las proteínas de unión intracelulares en muestras almacenadas.

En ciertas realizaciones, esta invención se relaciona con el descubrimiento de que, especialmente cuando el analito es una molécula no proteica, se pueden usar una o más proteasas en las preparaciones de las muestras para facilitar la liberación del analito de su proteína de unión y de este modo reducir o eliminar este sesgo. Esto permite mediciones más consistentes del analito.

Fue también un descubrimiento sorprendente el que las proteasas fueran efectivas para reducir o eliminar el sesgo del ensayo (v.g., debido a la unión del analito al/a los ligando(s) intracelular(es)) en las preparaciones de muestras sin el uso de detergentes (v.g., detergentes de lisis) y/o sin el uso de otras composiciones o métodos desnaturizantes (v.g., solventes orgánicos, bajo pH, alto pH, caotrópicos y similares). La eliminación del uso de dichos agentes facilita el uso de métodos de detección homogéneos que también reducen la varianza en la medición del analito.

Las proteasas son particularmente útiles en la preparación de muestras para ensayos diagnósticos en los que una proteína de unión se proteoliza a lo largo del tiempo, cambiando así la afinidad por su ligando (analito), lo que a su vez cambia la concentración del ligando detectado en el ensayo diagnóstico. El uso de una proteasa en la preparación de la muestra y/o, en ciertas realizaciones, el propio ensayo, acelera este proceso, de tal modo que el ligando interacciona siempre o primariamente con una forma proteolizada de la proteína de unión. Así, las concentraciones de ligando (analito) permanecen substancialmente constantes, reduciendo de este modo la varianza en el ensayo y/o reduciendo o eliminando el sesgo producido por el almacenamiento de una muestra con anterioridad al ensayo.

En ciertas realizaciones, las proteasas son utilizadas conjuntamente con un competidor que no presenta reacción cruzada para ayudar en la liberación del ligando (analito) de su proteína de unión, requiriéndose así un cambio en la proteína de unión menor de lo que sería de otro modo necesario si no se empleara ningún competidor.

Se hace notar que, aunque la discusión aquí facilitada se centra en fármacos inmunosupresores como analitos diana, los métodos son igualmente aplicables a otros analitos que se unen a proteínas de unión intracelulares, preferiblemente analitos no proteicos.

Como proteasas adecuadas, se incluyen, aunque sin limitación, serina proteasas (v.g., tripsina, quimotripsina, elastasa, etc.), metaloproteasas (v.g., dispasa, termolisina, etc.), tioproteasas (v.g., papaína, catepsinas, etc.), ácido aspártico proteasas (v.g., plasmepsinas), ácido glutámico proteasas y similares y sus combinaciones. La(s) proteasa(s) seleccionada(s) para uso en una preparación de ensayo particular es/son típicamente una(s) que pueda(n) degradar la proteína de unión, para liberar así el analito (v.g., fármaco inmunosupresor) para el ensayo. En ciertas realizaciones, se seleccionan proteasas que puedan inactivarse sin afectar de manera adversa a la sensibilidad y la precisión del ensayo que se ha de llevar a cabo. Las proteasas son preferiblemente aportadas en formas que están libres de otras enzimas contaminantes que podrían no resultar inactivadas por el método de inactivación utilizado. De otro modo, cualquier actividad proteolítica residual podría degradar un anticuerpo empleado en un inmunoensayo ulterior.

Se dispone de proteasas de una serie de proveedores comerciales, incluyendo, aunque sin limitación, Sigma, Aldrich, Boehringer Mannheim, Calbiochem y similares. En ciertas realizaciones, como proteasas ejemplares, se incluyen, aunque sin limitación, proteinasa K, subtilisina, pepsina, dispasa, termolisina, quimotripsina (incluyendo  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - o  $\pi$ -quimotripsina), tripsina, ficina, bromelaína y similares y sus combinaciones.

La proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) es una proteasa dependiente de Ca inespecífica que puede inactivarse por calor (65°C o superior) y por inhibidores de proteasas específicos, incluyendo, aunque sin limitación, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) o el fluorofosfato de diisopropilo (DFP, Calbiochem, La Jolla, Calif.). La subtilisina (Sigma) es también una proteasa dependiente de Ca inespecífica que puede inactivarse por calor (55°C o superior), aunque puede resultar inhibida por un pH ácido o un inhibidor de

proteasas específico, tal como PMSF, DFP o aprotinina.

5 La dispasa (Boehringer Mannheim o Sigma o Calbiochem) y la termolisina (Sigma o Boehringer Mannheim) son metaloproteasas dependientes de Ca que pueden inactivarse por el EDTA, a una concentración aproximadamente 5 mM, por ejemplo. En ciertas realizaciones, cuando se usan dispasa y termolisina combinadas como proteasa, se puede inactivar la proteólisis por adición de un quelante de metales divalentes, tal como el EDTA, a una concentración aproximadamente 5 mM, por ejemplo, en presencia de una sal de zinc, *v.g.*, ZnSO<sub>4</sub>, a una concentración aproximadamente 40 mM, por ejemplo.

10 La tripsina (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.) escinde proteínas específicamente en el lado del carboxilo de los residuos de lisina o arginina y puede ser inhibida por calor (90°C o superior) o específicamente inhibida por muchos agentes, incluyendo, aunque sin limitación, la aprotinina (inyección de aprotinina anteriormente comercializada como Trasylol® por Bayer, West Haven, CT; inhibidor aún disponible de Calbiochem, La Jolla, CA, y otros vendedores), la leupeptina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO o Boehringer Mannheim), el PMSF o inhibidores de tripsina específicos derivados de soja, lima o clara de huevo (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., o Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La ficina es una tiol proteasa que puede inactivarse mediante HgCl<sub>2</sub>, a una concentración aproximadamente 2 mM, por ejemplo. La bromelaína es también una tiol proteasa (tioproteasa) y puede inactivarse mediante un inhibidor de bromelaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

20 En realizaciones particulares, la concentración de proteasa(s) es lo suficientemente elevada como para degradar las proteínas de unión en aproximadamente 2-4 horas, preferiblemente en aproximadamente 1 hora, más preferiblemente en aproximadamente 30 minutos y aún más preferiblemente en aproximadamente 20 minutos o 10 minutos, pero lo suficientemente baja como para permitir una eficiente inactivación de la enzima. Por consiguiente, la concentración de proteasa varía preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 5,0 unidades/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 unidades/ml, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 2,0 unidades/ml, y es más preferiblemente de aproximadamente 1 unidad/ml.

30 Como se ha indicado anteriormente, el uso de una o más proteasas como aquí se describe puede obviar la necesidad de usar desnaturalizantes. Esto es ventajoso, ya que el uso de desnaturalizantes típicamente requiere etapas de centrifugación ulteriores para eliminar los constituyentes de la sangre precipitados, lo que reduce la eficiencia de este enfoque. Adicionalmente, el uso de solventes orgánicos a la(s) concentración(es) requerida(s) puede dar lugar a una evaporación de la muestra lo suficientemente significativa como para afectar a la concentración de analito.

35 En ciertas realizaciones, cuando el analito (*v.g.*, fármaco inmunosupresor) se une a una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo (*v.g.*, inmunofilinas), los métodos aquí descritos pueden eventualmente conllevar de manera adicional el contacto de la muestra con uno o más agentes (además de la(s) proteasa(s)) que liberen el analito de la(s) proteína(s) de unión. Por ejemplo, el/los agente(s) puede(n) incluir agentes que compitan (competidores) con el analito por la unión a la(s) proteína(s) de unión. El agente es generalmente seleccionado de tal modo que no afecte a los resultados del ensayo que se ha de llevar a cabo. Así, preferiblemente se selecciona un agente que no sea reactivo con (*v.g.*, que no se una a) el sistema de detección del analito (*v.g.*, agente de captura), o que sea substancialmente menos reactivo (*v.g.*, al menos 10 veces menos reactivo, preferiblemente al menos 100 veces menos reactivo, más preferiblemente al menos 1.000 veces o 10.000 veces menos reactivo) con el sistema de detección del analito (agente de captura).

45 Así, por ejemplo, si el ensayo es un inmunoensayo, el agente (competidores) es típicamente uno con el que el anticuerpo relevante substancialmente no tiene reacción cruzada. En ciertas realizaciones, cuando el analito es un fármaco inmunosupresor, el agente puede ser un análogo diferente, aunque estructuralmente similar, que puede ser o no un fármaco inmunosupresor. Por ejemplo, el sirolimus y el tacrolimus se unen ambos a FKBP y, por esta razón, se puede usar el sirolimus para liberar el tacrolimus de FKBP y viceversa. Típicamente, en tales casos, los inmunoensayos ulteriores generalmente emplearán un anticuerpo que distinga entre sirolimus y tacrolimus. La Patente EE.UU. 6.187.547 (concedida el 13 de Feb. de 2001 a Legay y Wenger) describe "competidores de unión" útiles para liberar fármacos inmunosupresores de proteínas de unión. Como ejemplos, se incluyen: [Thr<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, D-Hiv<sup>8</sup>, Leu<sup>10</sup>]ciclosporina, que puede liberar ciclosporina. Además, la solicitud de Patente EE.UU. 2005/112778 A1, publicada el 26 de Mayo de 2005, describe derivados de FK 506 que pueden actuar como competidor de unión para desplazar FK 506 o rapamicina de sus complejos con inmunofilina.

60 En ciertas realizaciones, los métodos aquí descritos implican el uso de reactivos de lisis libres de detergentes. El uso de detergentes puede resultar problemático en formatos particulares, porque la cantidad de detergente necesaria para lisar y fragmentar rápidamente las células puede causar espumación, lo cual es inaceptable para muestras que deben ser pipeteadas por la mayoría de los sistemas de pipeteado automatizados y puede interferir con la inmunoquímica en muestras que han de ser analizadas mediante inmunoensayos. El uso de un reactivo de lisis libre de detergente produce una muestra que no es susceptible de espumación y elimina la necesidad de detergentes,

evitando así las interferencias debidas al detergente en la inmunquímica del ensayo.

El uso de una o más proteasas, como aquí se describe, particularmente en combinación con un reactivo de lisis libre de detergente, produce una mezcla homogénea que resulta adecuada para uso en sistemas de pipeteado automatizados sin necesidad de una etapa de centrifugación y elimina el uso de concentraciones substanciales de solventes orgánicos volátiles.

## II. Recogida y procesado de las muestras

Los métodos de la invención son generalmente llevados a cabo sobre muestras de ensayo derivadas de un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un humano. En ciertos casos (cuando el analito consiste en uno o más inmunosupresores), la muestra de ensayo es una muestra de ensayo de un humano (o animal relacionado con la veterinaria) bajo tratamiento con un inmunosupresor (v.g., para prevenir o inhibir el rechazo de trasplantes de órganos o el rechazo de injertos o para el tratamiento de la enfermedad autoinmune).

Los métodos de la invención pueden ser llevados a cabo usando cualquier muestra que pueda contener el analito diana (v.g., fármaco inmunosupresor), tal como una muestra de sangre. En ciertas realizaciones, la muestra de ensayo puede consistir en sangre entera o en una fracción de sangre (v.g., suero).

Se recoge la muestra por cualquier técnica estándar. La muestra puede ser procesada inmediatamente o almacenada (v.g., secada, congelada, almacenada bajo gas inerte y similares) para su posterior procesado. Según se desee, se puede poner la muestra en contacto directamente con una o más proteasas, como aquí se describe, y un reactivo de lisis (o componentes del mismo). En diversas realizaciones, la muestra puede ser alternativamente procesada (v.g., reconstituida, diluida, tamponada, fraccionada y similares) antes del tratamiento con la(s) proteasa(s) y el/los reactivo(s) de lisis o sus componentes. En diversas realizaciones, se pone(n) en contacto la(s) proteasa(s) con la muestra antes, al mismo tiempo o después de poner en contacto la muestra con el/los reactivo(s) de lisis o sus componentes.

En la Figura 1 se ilustra un método simple, donde se pone en contacto la muestra (en este caso sangre entera) con un reactivo de lisis no detergente que contiene una o más proteasas (P) y uno o más competidores que no presentan reacción cruzada (C). Esto produce una mezcla homogénea consistente en sangre entera lisada, una o más proteasas, el/los competidor(es) que no presentan reacción cruzada, la(s) proteína(s) de unión endógena(s) y el analito de interés (v.g., un fármaco inmunosupresor). La mezcla está lista para el ensayo.

En ciertas realizaciones, se utiliza un reactivo de lisis libre de detergente. Ciertos reactivos de lisis adecuados incluyen al menos un glicol de dos a seis átomos de carbono y al menos un alcohol de diez o menos, preferiblemente ocho o menos, más preferiblemente cinco o menos, carbonos. Como glicoles adecuados para uso en el reactivo de lisis, se incluyen, por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol y sus análogos, así como mezclas de dichos glicoles. Como alcoholes adecuados para uso en el reactivo de lisis, se incluyen primariamente alcoholes que tienen un único grupo hidroxilo. Dichos alcoholes incluyen, aunque sin limitación, alcoholes primarios (v.g., metanol, etanol, alcohol isobutílico, etc.), alcoholes secundarios (v.g., isopropanol, ciclohexanol, etc.) y alcoholes terciarios (v.g., *terc*-butanol, alcohol *terc*-amílico, etc.). En ciertas realizaciones, los alcoholes incluyen, aunque sin limitación, metanol, etanol y alcoholes C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> (v.g., propanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol y similares) y sus mezclas. En realizaciones particulares, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4 (volumen:volumen). En realizaciones más particulares, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.

Se puede formar la mezcla de lisis por cualquier técnica de mezcla a cualquier temperatura deseable para poner en contacto cualquier cantidad escogida de la muestra con el reactivo de lisis. Se pone la muestra en contacto con un volumen suficiente de reactivo de lisis como para lisar las células en la muestra y producir una mezcla homogénea. Para un reactivo de lisis donde la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, como se ha descrito anteriormente, se puede añadir la muestra al reactivo de lisis en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, v.g., de aproximadamente 1:1 (volumen:volumen), dependiendo de la composición del reactivo de lisis. Por ejemplo, se pueden mezclar de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 600 µl de muestra de sangre con de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 1.200 µl del reactivo de lisis durante hasta aproximadamente cinco minutos. En ciertas realizaciones, se forma la mezcla de lisis mezclando 150 µl de muestra de sangre con 300 µl de reactivo de lisis y agitando vigorosamente en vórtice durante 5 - 10 segundos. En realizaciones preferidas, la lisis se completa en menos de un minuto a temperatura ambiente. Se estudia entonces la mezcla de lisis en cuanto al analito usando un ensayo adecuado. En realizaciones preferidas, se produce la mezcla de lisis, lista para el análisis, sin necesidad de centrifugar la muestra.

En diversas realizaciones, la muestra no necesita contactar con el reactivo de lisis "mixto", sino que se puede mezclar con un componente del reactivo de lisis (v.g., alcohol o glicol) y añadir luego el otro componente para

producir un reactivo de lisis completo como se ha descrito anteriormente.

El reactivo de lisis de la descripción puede ser empleado sin adición de detergente alguno. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se pueden añadir uno o más detergentes, si se desea. Los detergentes típicamente no forman espuma en presencia del reactivo de lisis descrito anteriormente y, por lo tanto, las mezclas de lisis preparadas según la descripción pueden ser sometidas a pipeteo automatizado, independientemente de si se incluye un detergente. Si se incluye en una mezcla de lisis destinada a inmunoensayo, el detergente está preferiblemente presente a una concentración que no interfiere con la inmunquímica. Preferiblemente, el detergente es un detergente no iónico, tal como saponina, y se emplea a una concentración de aproximadamente el 0,01% al 0,1%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,1%. La Patente EE.UU. N° 5.650.288 (concedida el 22 de Julio de 1997 a MacFarlane y Jensen describe el uso de detergentes en inmunoensayos.

Tras la lisis y liberación con respecto a las proteínas de unión, si es aplicable, se puede medir el analito usando cualquier técnica estándar para detectar ese analito, *v.g.*, inmunoensayo o cromatografía con absorbancia o detección espectrofotométrica de masas. Para la detección de fármacos inmunosupresores, se emplean convenientemente inmunoensayos.

### III. Inmunoensayos

#### A. En general

Se pueden usar inmunoensayos para la identificación cualitativa y/o la cuantificación de analito en una muestra de ensayo. Estos métodos son aplicables, por ejemplo, a inmunoensayos de fármacos inmunosupresores, tales como la rapamicina (sirolimus), el tacrolimus, el everolimus, el temsoralimus, el zotarolimus, la ciclosporina y análogos de cualquiera de estos compuestos.

Dichos inmunoensayos pueden ser llevados a cabo combinando una o más proteasas, como aquí se describe, y eventualmente un reactivo de lisis, o uno o más componentes del mismo, con la muestra de ensayo para formar una mezcla de lisis, como se ha descrito anteriormente. Se puede poner en contacto la mezcla de lisis con al menos un anticuerpo específico para el analito en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo al analito, si está presente, con objeto de formar una mezcla de ensayo, y se detecta entonces la unión del anticuerpo al analito.

En ciertas realizaciones, se puede conseguir una mayor sensibilidad del ensayo por contacto de la mezcla de lisis con el anticuerpo en presencia de una concentración de sal mayor de aproximadamente 0,4 M (*v.g.*, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 5,0 M). En realizaciones particulares, la concentración de sal es inferior o igual a aproximadamente 4,0 M (*v.g.*, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 4,0 M). En realizaciones ejemplares, la concentración de sal es de aproximadamente 2,0 M (*v.g.*, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M, en particular de aproximadamente 1,8 M, aproximadamente 1,9 M, aproximadamente 2,0 M, aproximadamente 2,1 M o aproximadamente 2,2 M). Como sales adecuadas, se pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes aniones: fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, acetato, citrato y bisulfato. En realizaciones particulares, la sal incluye un anión monovalente, tal como, por ejemplo: fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato y acetato. En realizaciones preferidas, la sal incluye cloruro, *v.g.*, una sal cloruro de un metal alcalino (*v.g.*, litio, sodio, potasio, rubidio, cesio). En general, la sal empleada es soluble en las condiciones de ensayo. El cloruro de sodio es altamente soluble en la mayoría de las condiciones y puede, por lo tanto, ser convenientemente utilizado para aumentar la sensibilidad del ensayo en una amplia variedad de inmunoensayos según la descripción.

La sal puede ser aportada a la mezcla de ensayo de cualquier manera conveniente y puede estar presente antes, o ser añadida después, del contacto entre la mezcla de lisis y el anticuerpo. En realizaciones particulares, la sal es aportada en un diluyente de ensayo, que puede también eventualmente incluir uno o más de otros componentes, además de agua (tales como, por ejemplo, un tampón). La concentración de sal en el diluyente de ensayo variará dependiendo de la concentración de sal final deseada y de la cantidad de diluyente añadido a la mezcla de ensayo. Por ejemplo, se podría añadir un diluyente de ensayo que tuviera una concentración de sal aproximadamente 4,0 M a igual volumen de mezcla de ensayo, para obtener una concentración final de sal aproximadamente 2,0 M.

#### B. Anticuerpos

En inmunoensayos para la detección cualitativa o cuantitativa de un analito en una muestra de ensayo, se pone en contacto al menos un anticuerpo que se une al analito con una mezcla de lisis sospechosa de contener el analito para formar un complejo inmune anticuerpo-analito. Para detectar fármacos inmunosupresores, se pueden usar cualesquiera anticuerpos adecuados que se unan al fármaco particular en un inmunoensayo según la descripción. Se conocen en la técnica y/o existe disponibilidad comercial de anticuerpos para cada uno de rapamicina (sirolimus), tacrolimus, zotarolimus, ciclosporina y everolimus, y se puede usar cualquiera de éstos. En ciertas realizaciones, se

prefiere usar el anticuerpo monoclonal que es un componente del ensayo Sirolimus IMx® comercializado por Abbott Laboratories (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) para medir sirolimus, o cualquier otro kit de ensayo Sirolimus comercializado por Abbott Laboratories (v.g., para uso en una plataforma automatizada comercial diferente).

5 Un protocolo ilustrativo para producir un anticuerpo específico para un fármaco inmunosupresor es como sigue. Se administran a ratones RbF/Dnj hembras 3 refuerzos mensuales de un inmunógeno fármaco-27-CMO-toxoide tetánico, seguidos de una inmunización con una preparación fármaco-42-HS-toxoide tetánico al 4º mes. Siete meses después, se administra un refuerzo prefusión intraesplénico al animal usando el inmunógeno fármaco-27-CMO-toxoide tetánico 3 días antes de la fusión. Se aíslan entonces las células B esplénicas y se utilizan en una fusión de polietileno (PEG) estándar con el mieloma SP2/0. Se criban los cultivos confluentes en cuanto a actividad antifármaco 10-14 días después en un EIA de microtitulación y se clonan entonces los cultivos positivos usando la técnica de clonación por dilución limitante. Se aíslan los clones resultantes y se amplían en medio de cultivo de tejidos IMDM c/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), y se purifica por afinidad el anticuerpo segregado usando Proteína A. Se puede usar un anticuerpo preferido ilustrativo generado usando sirolimus como fármaco en inmuoensayos para sirolimus, everolimus y zotarolimus.

Se describe un anticuerpo preferido ilustrativo para uso en inmuoensayos para tacrolimus en M. Kobayashi *et al.*, "A Highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma", en las pp. 23-29 de "FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression", A Transplantation Proceedings Reprint, Suplemento 6, Vol. XIX, Octubre de 1987, Editores T. Starzl, L. Makowka y S. Todo, publicado por Grune & Stratton, Inc., Philadelphia, PA.

Un anticuerpo preferido ilustrativo para uso en inmuoensayos para ciclosporina es el anticuerpo monoclonal que es un componente del ensayo AxSYM Cyclosporine comercializado por Abbott Laboratories para medir ciclosporina.

#### 25 C. Detección

Los complejos inmunes anticuerpo-analito pueden ser entonces detectados usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede marcar el anticuerpo con un marcaje detectable para detectar y/o cuantificar la presencia del complejo anticuerpo-analito. La selección de un marcaje particular no es crítica, pero el marcaje seleccionado debe ser capaz de producir una señal detectable, ya sea por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales.

Se conocen en la técnica marcajes detectables útiles, su unión a anticuerpos y técnicas de detección para los mismos. Se puede usar cualquier marcaje detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcaje detectable puede ser un marcaje radiactivo, tal como <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>31</sup>P o <sup>33</sup>P; un marcaje enzimático, tal como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.; un marcaje quimioluminiscente, tal como derivados de acridinio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc.; un marcaje fluorescente, tal como fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.); rodamina; ficobiliproteínas; R-ficoeritrina; puntos cuánticos (selenuro de cadmio rematado con sulfuro de zinc); un marcaje termométrico; o un marcaje de reacción en cadena de inmunopolimerasa. Se encuentra una introducción a marcajes, procedimientos de marcaje y detección de marcajes en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi.* (1996), que es una combinación de manual y catálogo publicada por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Como marcajes preferidos para uso en la invención, se incluyen marcajes quimioluminiscentes, tales como acridinio-9-carboxamida. Se pueden encontrar detalles adicionales en Mattingly, P. G. y Adamczyk, M. (2002), *Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamides and their application in clinical assays*, en *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications* (Dyke, K. V., Ed.), pp. 77-105, CRC Press, Boca Raton.

50 El marcaje detectable puede unirse al analito o al anticuerpo directamente o a través de un agente copulante. Un ejemplo de agente copulante que puede ser utilizado es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, clorhidrato), que está comercializado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se conocen en la técnica otros agentes copulantes que pueden ser utilizados. Los métodos para unir un marcaje detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicionalmente, se pueden comprar o sintetizar muchos marcajes detectables que ya contengan grupos terminales que faciliten la copulación del marcaje detectable al anticuerpo, tales como N10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)acridinio-9-carboxamida, también conocida como Éster de CPSP-Acridinio, o N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)acridinio-9-carboxamida, también conocida como Éster de SPSP-Acridinio.

60 Alternativamente, se puede añadir un segundo anticuerpo que se una al analito y que contenga un marcaje detectable a la mezcla de lisis y utilizarlo para detectar la presencia del complejo anticuerpo-analito. Se puede usar en esta realización cualquier marcaje detectable adecuado.

## D. Formatos ilustrativos

Los inmunoensayos pueden ser llevados a cabo usando cualquier formato conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, un formato en sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo ensayos de inhibición competitiva tanto hacia delante como inversos) o un formato de polarización de la fluorescencia y similares.

En inmunoensayos para la detección cuantitativa de un inmunosupresor, tales como un formato preferido de tipo sándwich, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el fármaco en la mezcla de lisis. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes partes del fármaco, para formar un complejo inmune al que se hace referencia como un "sándwich". En general, se pueden usar uno o más anticuerpos para capturar (v.g., unirse específicamente a) el analito (v.g., el inmunosupresor) en la muestra de ensayo (con frecuencia de hace referencia a estos anticuerpos como un anticuerpo "de captura" o anticuerpos "de captura") y se usan uno o más anticuerpos para unir un marcaje detectable (a saber, cuantificable) al sándwich (con frecuencia se hace referencia a estos anticuerpos como el anticuerpo "de detección" o los anticuerpos "de detección"). En un ensayo en sándwich, se prefiere que ambos anticuerpos que se unen al fármaco no resulten disminuidos por la unión de cualquier otro anticuerpo en el ensayo a su respectivo sitio de unión.

En otras palabras, habría que seleccionar los anticuerpos de tal forma que el uno o más primeros anticuerpos que han contactado con una mezcla de lisis sospechosa de contener un inmunosupresor no se unan a todo o parte del sitio de unión reconocido por los segundos o siguientes anticuerpos, interfiriendo así con la capacidad del uno o más segundos o siguientes anticuerpos para unirse al fármaco. En un ensayo en sándwich, los anticuerpos, y preferiblemente el al menos un anticuerpo de captura, son usados en cantidades en exceso molar en relación a la cantidad máxima de fármaco que se espera en la mezcla de lisis. Por ejemplo, se pueden usar de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de solución que contiene fase sólida.

En una realización, el al menos un primer anticuerpo de captura puede unirse a un soporte sólido que facilite la separación del complejo primer anticuerpo-fármaco de la muestra de ensayo. El soporte sólido o "fase sólida" utilizado en el inmunoensayo de la invención no es crítico y puede ser seleccionado por un experto en la técnica. Una fase sólida o soporte sólido, tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier material insoluble o que pueda hacerse insoluble por una reacción ulterior. Los expertos en la técnica conocen fases sólidas o soportes sólidos útiles, y estos últimos incluyen las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, eritrocitos de oveja (o de otros animales) y Duracytes® (una marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.), que son eritrocitos "fijados" por aldehído pirúvico y formaldehído, y otros. Como métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas, se incluyen interacciones iónicas, hidrofóbicas y covalentes y similares. La fase sólida puede ser seleccionada en cuanto a su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar el agente de captura. Alternativamente, la fase sólida puede incluir un receptor adicional que tenga la capacidad de atraer e inmovilizar el agente de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que tenga una carga opuesta con respecto al propio agente de captura o a una sustancia cargada conjugada al agente de captura. Como otra alternativa más, el receptor puede ser cualquier compañero de unión específica que esté inmovilizado sobre (unido a) la fase sólida y que tenga la capacidad de inmovilizar el agente de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula del receptor permite la unión indirecta del agente de captura a un material de fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo.

Se puede usar cualquier soporte sólido conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, soportes sólidos hechos de materiales poliméricos en forma de matrices, geles, pocillos, tubos o perlas. El anticuerpo (o anticuerpos) puede unirse al soporte sólido por adsorción, por unión covalente usando un agente copulante químico o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que dicha unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse al fármaco. Más aún, si es necesario, el soporte sólido puede ser derivatizado para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales sobre el anticuerpo. Dicha derivatización requiere típicamente el uso de ciertos agentes copulantes, tales como, aunque sin limitación, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Está dentro del alcance de la presente invención el hecho de que la fase sólida puede incluir también cualquier material poroso adecuado con suficiente porosidad como para permitir el acceso por los anticuerpos de detección y una afinidad superficial adecuada para unir antígenos. En general, se prefieren estructuras microporosas, pero también se pueden utilizar materiales con estructura de gel en el estado hidratado. Dichos soportes sólidos útiles incluyen, aunque sin limitación, nitrocelulosa y nilón. Se contempla que dichos soportes sólidos porosos aquí descritos estén preferiblemente en forma de láminas de un grosor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variar dentro de amplios límites, y preferiblemente es de aproximadamente 0,025 a 15 micras, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micras. La superficie de dichos soportes puede activarse por procesos químicos que provoquen la unión covalente del

antígeno o anticuerpo al soporte. Se obtiene la unión irreversible del antígeno o anticuerpo, sin embargo, en general, por adsorción sobre el material poroso por fuerzas hidrofóbicas.

Después de poner en contacto la mezcla de lisis sospechosa de contener o que contiene el inmunosupresor con el al menos un primer anticuerpo de captura, se incuba la mezcla de ensayo resultante para permitir la formación de un complejo primer anticuerpo (o múltiples anticuerpos) de captura-fármaco. Se puede realizar la incubación a cualquier pH adecuado, incluyendo un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a cualquier temperatura adecuada, incluyendo de aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C, y durante un período de tiempo adecuado de al menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 4-20 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 17-19 minutos.

Tras la formación del complejo marcado, se puede cuantificar la cantidad de marcaje en el complejo usando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, si se usa un marcaje enzimático, el complejo marcado reacciona con un sustrato para el marcaje que da una reacción cuantificable, tal como el desarrollo de color. Si el marcaje es un marcaje radiactivo, se cuantifica el marcaje usando un contador de centelleo. Si el marcaje es un marcaje fluorescente, se cuantifica el marcaje estimulando el marcaje con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que se conoce como la "longitud de onda de emisión") que resulta emitido por el marcaje en respuesta a la estimulación. Si el marcaje es un marcaje quimioluminiscente, se cuantifica el marcaje detectando la luz emitida ya sea visualmente o utilizando luminómetros, película de rayos x, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez cuantificada la cantidad del marcaje en el complejo, se puede determinar la concentración de fármaco en la muestra de ensayo mediante el uso de una curva estándar generada, por ejemplo, utilizando diluciones seriadas de fármaco inmunosupresor de concentración conocida. Aparte de mediante la utilización de diluciones seriadas del fármaco, se puede generar la curva estándar gravimétricamente, por espectroscopia de masas y por otras técnicas conocidas en este campo.

En un formato competitivo hacia delante preferido, se usa una alícuota de fármaco, o análogo del mismo, marcado de una concentración conocida para competir con el fármaco presente en una muestra de ensayo por la unión al anticuerpo. En un ensayo competitivo hacia delante, se puede poner en contacto secuencial o simultáneamente un anticuerpo inmovilizado con la muestra de ensayo y un fármaco o análogo del mismo marcado. Se puede marcar el fármaco o análogo del fármaco con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables discutidos anteriormente. En este ensayo, se puede inmovilizar el anticuerpo de captura sobre un soporte sólido usando las técnicas previamente aquí discutidas. Alternativamente, se puede copular el anticuerpo de captura con un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

Se incuban típicamente el fármaco o análogo de fármaco marcado, la mezcla de lisis y el anticuerpo en condiciones similares a las antes descritas en relación al formato de ensayo en sándwich. Se generan entonces dos tipos diferentes de complejos anticuerpo-fármaco. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-fármaco generados contiene un marcaje detectable, mientras que el otro complejo anticuerpo-fármaco no contiene un marcaje detectable. Se puede separar el complejo anticuerpo-fármaco, aunque no tiene por qué serlo, del resto de la mezcla de ensayo antes de la cuantificación del marcaje detectable. Independientemente de si se separa el complejo anticuerpo-fármaco del resto de la mezcla de ensayo, se cuantifica entonces la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco. Se puede determinar luego la concentración de fármaco en la muestra de ensayo comparando la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco con una curva estándar. Se puede generar la curva estándar usando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopia de masas, gravimétricamente y por otras técnicas conocidas en este campo.

Se puede separar el complejo anticuerpo-fármaco de la mezcla de ensayo uniendo el anticuerpo a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos antes discutidos en relación al formato de ensayo en sándwich, y retirando luego el resto de la mezcla de ensayo del contacto con el soporte sólido.

En un ensayo competitivo inverso, se puede poner en contacto secuencial o simultáneamente un fármaco inmunosupresor o análogo del mismo inmovilizado con una mezcla de lisis y al menos un anticuerpo marcado. Se puede marcar el anticuerpo con cualquier marcaje detectable adecuado, incluyendo los marcajes detectables discutidos anteriormente. El fármaco o análogo de fármaco puede unirse a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos discutidos anteriormente en relación al formato de ensayo en sándwich.

Se incuban el fármaco o análogo de fármaco inmovilizado, la mezcla de lisis y al menos un anticuerpo marcado en condiciones similares a las antes descritas en relación al formato de ensayo en sándwich. Se generan entonces dos tipos diferentes de complejos anticuerpo-fármaco. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-fármaco generados está inmovilizado y contiene un marcaje detectable, mientras que el otro complejo anticuerpo-fármaco no está inmovilizado y contiene un marcaje detectable. Se retiran el complejo anticuerpo-fármaco no inmovilizado y el resto de la mezcla de ensayo de la presencia del complejo anticuerpo-fármaco inmovilizado por técnicas conocidas



en este campo, tales como el lavado. Una vez retirado el complejo anticuerpo-fármaco no inmovilizado, se cuantifica entonces la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco inmovilizado. Se puede determinar luego la concentración de fármaco en la muestra de ensayo comparando la cantidad de marcaje detectable en el complejo anticuerpo-fármaco con una curva estándar. Se puede generar la curva estándar usando diluciones seriadas del fármaco de concentración conocida, por espectroscopia de masas, gravimétricamente y por otras técnicas conocidas en este campo.

En un ensayo de polarización de la fluorescencia, en una realización, se pone primeramente en contacto un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo con una mezcla de lisis no marcada que contiene el fármaco inmunosupresor para formar un complejo anticuerpo-fármaco no marcado. Se pone luego en contacto el complejo anticuerpo-fármaco no marcado con un fármaco o análogo del mismo fluorescentemente marcado. El fármaco o análogo del fármaco marcado compite con cualquier fármaco no marcado en la mezcla de ensayo por la unión al anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo. Se determina la cantidad de complejo anticuerpo-fármaco marcado formado y se determina la cantidad de fármaco en la muestra de ensayo utilizando una curva estándar.

El uso de microscopía con sonda de barrido (SPM) para inmunoensayos es también una tecnología a la que son fácilmente adaptables los métodos de inmunoensayo de la presente descripción. En la SPM, en particular en la microscopía de fuerza atómica, se fija un agente de captura a una fase sólida que tiene una superficie adecuada para el barrido. El agente de captura puede, por ejemplo, adsorberse en una superficie de plástico o de metal. Alternativamente, el agente de captura puede unirse covalentemente a, v.g., plástico derivatizado, metal, silicio o vidrio según métodos conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica. Tras la unión del agente de captura, se pone en contacto la mezcla de lisis con la fase sólida y se usa un microscopio con sonda de barrido para detectar y cuantificar complejos fijados a fase sólida. El uso de SPM elimina la necesidad de marcajes típicamente empleados en sistemas de inmunoensayo. Dicho sistema está descrito en la Solicitud EE.UU. N° 662.147.

Los inmunoensayos según la descripción pueden ser también llevados a cabo usando un Sistema MicroElectroMecánico (MEMS). Los MEMS son estructuras microscópicas integradas sobre silicio que combinan elementos mecánicos, ópticos y fluidos con la electrónica, con lo que permiten una conveniente detección de un analito de interés. Un ejemplo de dispositivo MEMS adecuado para uso en la invención es la matriz multisoporte de Protiveris. Esta matriz se basa en la actuación quimiomecánica de microsoportes de silicio especialmente diseñados y la posterior detección óptica de las deflexiones de los microsoportes. Cuando se le reviste por un lado con un compañero de unión, un microsoporte se inclinará cuando se le exponga a una solución que contenga la molécula complementaria. Esta inclinación está causada por el cambio en la energía superficial debido al suceso de unión. La detección óptica del grado de inclinación (deflexión) permite la medición de la cantidad de molécula complementaria unida al microsoporte.

En otras realizaciones, se llevan a cabo los inmunoensayos utilizando detección electroquímica. Heineman y colaboradores han descrito un procedimiento básico para la detección electroquímica. Éste conllevaba la inmovilización de un anticuerpo primario (Ab, IgG de rata antirratón), seguida de exposición a una secuencia de soluciones que contenían el antígeno (Ag, IgG de ratón), el anticuerpo secundario conjugado a un marcaje enzimático (AP-Ab, IgG de rata antirratón y fosfatasa alcalina) y fosfato de p-aminofenilo (PAPP). La AP convierte el PAPP en p-aminofenol (PAP<sub>R</sub>, la "R" es para distinguir la forma reducida de la forma oxidada, PAP<sub>O</sub>, la quinonimina), que es electroquímicamente reversible a potenciales que no interfieren con la reducción de oxígeno y agua a pH 9,0, donde la AP exhibe una actividad óptima. El PAP<sub>R</sub> no provoca ensuciamiento de los electrodos, a diferencia del fenol, cuyo precursor, el fosfato de fenilo, es frecuentemente utilizado como substrato enzimático. Aunque el PAP<sub>R</sub> sufre oxidación por el aire y la luz, se previene ésta fácilmente a pequeñas escalas y cortos marcos temporales. Se han descrito previamente límites de detección picomolares para el PAP<sub>R</sub> y límites de detección de femtogramos para la IgG conseguidos en inmunoensayos microelectroquímicos utilizando volúmenes de PAPP de 20 µl a 360 µl. En inmunoensayos capilares con detección electroquímica, el límite de detección más bajo descrito hasta la fecha es de 3.000 moléculas de IgG de ratón utilizando un volumen de 70 µL y un tiempo de ensayo de 30 minutos o de 25 minutos.

Se describen diversos sistemas de detección electroquímicos en las Patentes EE.UU. 7.045.364 (concedida el 16 de Mayo de 2006), 7.045.310 (concedida el 16 de Mayo de 2006), 6.887.714 (concedida el 3 de Mayo de 2005), 6.682.648 (concedida el 27 de Enero de 2004) y 6.670.115 (concedida el 30 de Diciembre de 2003). En realizaciones particulares, útiles, por ejemplo, para estudiar simultáneamente múltiples analitos en una muestra de ensayo, la fase sólida puede incluir una pluralidad de agentes de captura diferentes. Así, por ejemplo, la fase sólida puede tener fijados sobre sí misma una pluralidad de anticuerpos, donde cada uno está destinado a estudiar la presencia de diferentes analitos en la muestra. En una realización ejemplar, la fase sólida puede consistir en una pluralidad de diferentes regiones sobre una superficie, donde cada región tiene un anticuerpo particular fijado en la misma.

Los formatos múltiples pueden, aunque no tienen por qué, emplear una pluralidad de marcajes, donde se usa cada marcaje para la detección de un analito particular. Por ejemplo, se pueden detectar múltiples analitos diferentes sin usar una pluralidad de marcajes cuando hay una pluralidad de agentes de captura, tales como anticuerpos, fijados a la fase sólida en diferentes localizaciones conocidas, en base a la especificidad. Dado que se conoce la especificidad del agente de captura en cada localización, se puede asociar la detección de una señal en una localización particular a la presencia de analito unido en esa localización. Como ejemplos de este formato, se incluyen dispositivos microfluidos y matrices capilares, que contienen diferentes agentes de captura en diferentes localizaciones a lo largo de un canal o capilar, respectivamente, y micromatrices, que típicamente contienen diferentes agentes de captura dispuestos en una matriz de manchas ("elementos diana") sobre una superficie de un soporte sólido. En realizaciones particulares, cada diferente agente de captura puede estar fijado a un electrodo diferente, que puede, por ejemplo, estar formado sobre una superficie de un soporte sólido, en un canal de un dispositivo microfluidado o en un capilar.

### III. Kits de ensayo

La invención también proporciona kits de ensayo para estudiar muestras de ensayo en cuanto a un analito según se define en las reivindicaciones. Los kits de ensayo según la descripción incluyen uno o más reactivos útiles para la práctica de uno o más inmunoensayos según la descripción. Un kit de ensayo generalmente incluye un envase con uno o más recipientes que mantienen los reactivos, como una o más composiciones independientes o, eventualmente, como mezcla cuando la compatibilidad de los reactivos lo permita. El kit de ensayo puede incluir también otro(s) material(es) que puedan ser deseables desde el punto de vista de un usuario, tales como un tampón(es), un diluyente(s), un patrón(es) y/o cualquier otro material útil en el procesado de muestras, el lavado o la realización de cualquier otra etapa del ensayo.

En ciertas realizaciones, los kits de ensayo pueden incluir: (a) al menos un anticuerpo u otro ligando (v.g., proteína de unión) capaz de unirse específicamente a al menos un analito y (b) una o más proteasas como aquí se describe. Como proteasas ilustrativas, se incluyen, aunque sin limitación, proteinasa K, subtilisina, dispasa, termolisina, tripsina, ficina, bromelaína y sus combinaciones. El kit eventualmente incluye además (c) un reactivo de lisis consistente en: un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un análogo del mismo, y al menos un alcohol como aquí se describe (v.g., un alcohol de cinco o menos carbonos), o los componentes de dicho reactivo de lisis. En realizaciones ilustrativas, útiles para llevar a cabo inmunoensayos para fármacos inmunosupresores, el anticuerpo puede ser específico para rapamicina (sirolimus), tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus, ciclosporina o análogos de cualquiera de estos compuestos.

En ciertas realizaciones, el reactivo de lisis incluye metanol, etanol, propanol o una mezcla de cualquiera de estos alcoholes. En realizaciones ilustrativas, la razón de glicol a alcohol es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, más particularmente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2.

Si se desea, el kit de ensayo puede adicionalmente incluir una composición de control que incluya el fármaco inmunosupresor que se esté estudiando.

En realizaciones particulares, los kits de ensayo pueden incluir uno o más detergentes y/o agentes que liberen el analito de una o más proteínas de unión en la muestra de ensayo. Como detergentes o combinaciones de detergentes adecuados, se incluyen detergentes no iónicos, tales como saponina, como se ha descrito anteriormente. Como agentes de liberación adecuados, se incluyen agentes que compiten con el analito por la unión a una o más proteínas de unión, como se ha descrito anteriormente. Cualesquiera detergentes o proteasas provistos en kits deben ser proporcionados de un modo que facilite la producción de una mezcla de lisis que contenga los componentes en una concentración adecuada, como se ha descrito anteriormente.

Los kits pueden incluir una fase sólida y un agente de captura fijado a la fase sólida o que se fije a la fase sólida durante el ensayo. En realizaciones ejemplares, la fase sólida incluye una o más micropartículas o electrodos. Cuando dichos kits han de ser empleados para realizar inmunoensayos en sándwich, los kits pueden incluir adicionalmente un agente de detección marcado. En ciertas realizaciones, el kit de ensayo incluye al menos un marcaje directo, tal como acridinio-9-carboxamida. Los kits de ensayo pueden incluir también al menos un marcaje indirecto. Si el marcaje empleado requiere, en general, un reactivo indicador para producir una señal detectable, el kit de ensayo preferiblemente incluye uno o más reactivos indicadores adecuados.

Los kits de ensayo preferiblemente incluyen instrucciones para llevar a cabo uno o más de los inmunoensayos de la descripción. Las instrucciones incluidas en los kits pueden ir fijadas al material del envase o pueden ser incluidas como prospecto del envase. Aunque las instrucciones son típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a éstos. Se contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, por ejemplo, medios informáticos, incluyendo, aunque sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (v.g., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (v.g., CD ROM) y

similares. Tal como se utiliza aquí, el término "instrucciones" puede incluir la dirección de un sitio de internet que proporcione las instrucciones.

Por supuesto, no es necesario decir que cualquiera de los formatos ejemplares aquí presentados, y cualquier ensayo o kit según la invención, pueden ser adaptados u optimizados para uso en sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquéllos en los cuales hay una fase sólida que comprende una micropartícula), como se describe, *v.g.*, en las Patentes EE.UU. Nº 5.089.424 y 5.006.309, y como, *v.g.*, comercializa Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), incluyendo, aunque sin limitación, las plataformas ARCHITECT®, AxSYM®, IMX®, ABBOTT PRISM® y Quantum II de Abbott Laboratories, así como otras plataformas.

Adicionalmente, los ensayos y kits de la presente invención pueden ser eventualmente adaptados u optimizados para sistemas de ensayo en el punto de atención, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico Point of Care (i-STAT™) de Abbott Laboratories. Se describen inmunosensores y métodos de fabricación y de operación de los mismos en dispositivos de ensayo de un solo uso, por ejemplo, en la Patente EE.UU. 5.063.081 y en las Solicitudes de Patente EE.UU. publicadas 20030170881, 20040018577, 20050054078 y 20060160164.

## Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

### Ejemplo 1 - Comparación de proteasas

Se estudiaron las siguientes proteasas en mezclas de ensayo como aquí se describe, constituidas o bien por diluyente de sangre entera lisada (es decir, "Diluyente de Calibrador"), o bien por un espécimen de sangre entera fresca no lisada (es decir, especímenes de pacientes, o "Sangre Fresca"): alfa-quimotripsina (CH); PE = pepsina (PE); proteinasa K (PK) y termolisina (TH).

Se empleó para estos estudios el ensayo ARCHITECT® Sirolimus (ensayo de fase de concepto homogéneo posteriormente comercializado por Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Se prepararon patrones calibrados de sirolimus en un diluyente de sangre entera lisada (IMx® Tacrolimus II Blood Diluent, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), a saber, CAL A y F CAL, que contenía 0 y 30 ng/ml de sirolimus (Wyeth-Pharma GmbH, Münster, Alemania), respectivamente.

En el ensayo ARCHITECT® Sirolimus, se mide la cantidad de luz (o señal) producida por una muestra (típicamente después del ensayo) como unidades de luz relativas (ULR). ULR es la denominación para la unidad de medición óptica empleada en el sistema ARCHITECT®, así como en otros instrumentos. El término ULR viene de la relación del recuento de fotones con una cierta cantidad de patrón productor de señal, tal como el acridinio. Se calibra cada módulo óptico con un conjunto de patrones (*v.g.*, patrones de acridinio). Cuando se produce la reacción quimioluminiscente, se emite luz y se miden los fotones a lo largo de un período de tiempo (*v.g.*, un período de tiempo de 3 segundos). El tubo fotomultiplicador (TFM) convierte los fotones contados en señal digital, la cual es entonces enviada a una tabla de circuitos para su procesamiento. La tabla de circuitos ópticos convierte la señal digital del TFM en una señal análoga proporcional a los fotones contados, lo que a su vez es proporcional a la cantidad de molécula productora de señal (*v.g.*, acridinio) presente. Esta señal análoga es entonces además procesada para producir un valor de ULR. Se estableció esta relación para producir un patrón para la calibración del módulo óptico, donde se asignan valores de ULR a los diferentes patrones. Así, aunque la propia unidad ULR es arbitraria, es proporcional (es decir, relativa) a una cierta cantidad de patrón (*v.g.*, acridinio).

En estos estudios, se calculó el "sesgo" como el % de diferencia en la señal (ULR) de las muestras de Sangre Fresca a las que se añadió una concentración de sirolimus (*v.g.*, 30 ng/ml o 0 ng/ml) (es decir, "Muestras de Sangre Fresca") equivalente a la concentración de sirolimus de los calibradores preparados con Diluyente de Ensayo (es decir, "Muestras de Diluyente de Ensayo"). En otras palabras, se calculó el sesgo como la diferencia en la señal exhibida por los calibradores de especímenes de sangre fresca (*v.g.*, no lisados) en comparación con calibradores de sangre entera lisada (congelados-descongelados, aprox. 80% de sangre entera, > 1 mes de edad). Dicho valor presumiblemente representa el sesgo que se observaría en especímenes de pacientes a concentraciones similares, y explica la gran (*v.g.* > 50%) desviación en los especímenes de los pacientes observada cuando se almacenan a temperatura ambiente y se estudian mediante un ensayo de sirolimus homogéneo (*v.g.*, ensayo comercial ARCHITECT® Sirolimus de Abbott) a lo largo del tiempo.

Aunque parece que todas las proteasas tenían algún efecto sobre el sesgo, la Proteinasa K y la Termolisina claramente tenían el mayor impacto (datos no mostrados). La termolisina aumentó los valores de ULR de F CAL en las Muestras de Diluyente de Ensayo y las Muestras de Sangre Fresca, y, a 500 µg/ml (cantidad en el espécimen/muestra homogéneo pretratado, antes de ser muestreado por el ARCHITECT® para la medición del Sirolimus libre), el sesgo de F CAL se redujo a aproximadamente el 30%. El CAL A a 500 µg/ml (cantidad en el

especímen/muestra homogéneo pretratado), sin embargo, se movió en la dirección opuesta, creando un sesgo del -24%.

5 La Proteinasa K también aumentó los valores de ULR F CAL en las Muestras de Diluyente de Ensayo; sin embargo, redujo los valores de ULR en las Muestras de Sangre Fresca. El sesgo de CAL A era algo peor a 50 µg/ml (~15%); sin embargo, a 500 µg/ml el sesgo mejoró a un 6-7%.

10 Las proteasas tienen, por lo tanto, un efecto sobre el sesgo de las Muestras de Sangre Fresca vs. las Muestras de Diluyente de Ensayo. El sesgo observado era dependiente de la concentración de Sirolimus. Cuanto menor era la concentración de Sirolimus, menos sesgo se observó, y no se observó esencialmente ningún sesgo al nivel de CAL A (0 ng/ml). Este hallazgo sería inesperado si el problema fuese una unión interferente o no específica. Dado que se realizó el ensayo en un formato competitivo, el CAL A tiene la señal de ULR más alta. Es inusual no tener sesgo al nivel más alto de señal, pero tener entonces un mayor sesgo con una señal inferior (v.g., mayores niveles de Sirolimus), a menos que haya una diferencia en afinidad (v.g., la afinidad de FKBP12 por el Sirolimus en sangre entera fresca vs. sangre entera lisada almacenada). Si el mecanismo es el corte de la proteasa FKBP 12, entonces esto explicaría la dificultad para encontrar un agente no específico (v.g., ligante de HSA o Lipoproteína) que afectara al sesgo de un modo dependiente del Sirolimus. Un cambio en la afinidad de unión de FKBP12 sería muy difícil de equiparar por otros medios. Tomados en conjunto, estos datos, es decir, los datos de estabilidad de las Muestras de Sangre Fresca y la dependencia de la concentración del Sirolimus, refrendan la escisión proteolítica como mecanismo para el sesgo.

### Ejemplo 2 - Comparación de proteinasa K o termolisina en el ensayo de sirolimus

25 En este experimento, se prepararon los calibradores de sirolimus TA y FA en sangre entera lisada (por congelación-descongelación) con conservantes y que había sido almacenada a 4°C durante más de un mes (es decir, "Diluyente de Calibrador"). Estas así llamadas Muestras de Diluyente de Ensayo, TA y FA, contenían 0 y 30 ng/ml de sirolimus, respectivamente. Los calibradores de especímenes de sangre entera fresca no lisada (es decir, los especímenes de los pacientes, o "Sangre Fresca") WA y WF (así llamados Muestras de Sangre Fresca) contenían 0 y 30 ng/ml de sirolimus, respectivamente.

30 Se trataron las Muestras de Diluyente de Ensayo y las Muestras de Sangre Fresca con niveles crecientes de Proteinasa K o de Termolisina a concentraciones de 50, 250 ó 500 µg/ml. Los controles eran muestras idénticas a las Muestras de Diluyente de Ensayo y las Muestras de Sangre Fresca en todos los demás sentidos, pero se habían dejado sin tratar. Se añadió proteasa a todas las muestras en una solución de propilenglicol 5%/etanol 5% a una razón en volumen de 2 partes de solución orgánica:1 parte de muestra (es decir, siendo las muestras la Muestra de Diluyente de Ensayo, la Muestra de Sangre Fresca o los controles de contrapartida). Se agitaron entonces las muestras vorticialmente y se pusieron inmediatamente en el instrumento ARCHITECT® para su estudio en un formato competitivo de 1 etapa retardado.

40 Clave para las abreviaturas de las Tablas 1 - 3 siguientes:

A: calibrador A, 0 ng/ml  
 F: calibrador F, 30 ng/ml  
 T: diluyente de sangre entera lisada almacenada  
 45 W: sangre entera fresca  
 PK (número): Proteinasa K añadida a concentraciones de 50, 250 ó 500 µg/ml  
 TH (número): Termolisina añadida a concentraciones de 50, 250 ó 500 µg/ml

Tabla 1: Controles

50

Muestras	ULR	% Diferencia
TA	747610	
TF	54112	
WA	675721	-9,6
WF	100334	85,4

Tabla 2: Muestras que contienen proteinasa K

Muestras	ULR	% Diferencia
PK50TA	831449	
PK50TF	64774	
PK50WA	708890	-14,7

PK50WF	111464	72,1
PK250TA	881927	
PK250TF	77396	
PK250WA	749423	-15
PK250WF	85159,5	10
PK500TA	862392	
PK500TF	80400	
PK500WA	807796	-6,3
PK500WF	85000	5,7

Tabla 3: Muestras que contienen termolisina

Muestras	ULR	% Diferencia
TH50TA	751667	
TH50TF	67714	
TH50WA	679040	-9,7
TH50WF	105856	56,3
TH250TA	776427	
TH250TF	67910	
TH250WA	663988	-14,5
TH250WF	110980	63,4
TH500TA	901042	
TH500TF	89824	
TH500WA	690567	-23,4
TH500WF	116174,5	29,3

- 5 Como puede verse por la Tabla 1, existe un sesgo del -10% entre los calibradores de sangre fresca (Muestras de Sangre Fresca WA y WF) y los calibradores de sangre lisada almacenada (Muestras de Diluyente de Ensayo TA y TF) en la señal generada con 0 ng/ml de sirolimus presentes. Como puede verse por la Tabla 2, a 500 µg/ml de proteinasa K este sesgo se reduce a aproximadamente el -6%.
- 10 Existe un sesgo del 85% entre los calibradores de sangre fresca (WA y WF) y los calibradores de sangre lisada almacenada (Muestras de Diluyente de Ensayo TA y TF) en la señal generada con 30 ng/ml de sirolimus presentes (Tabla 1). A 500 µg/ml de proteinasa K, este sesgo se reduce a aproximadamente el 6% (Tabla 2), y a 500 µg/ml de termolisina, este sesgo se reduce a aproximadamente el 29% (Tabla 3).
- 15 En base a los datos anteriores, las proteasas tienen un impacto directo sobre el sesgo en la señal generada entre los calibradores de sangre fresca y de sangre entera lisada en un ensayo de sirolimus, en formato competitivo, lo que, en el caso del calibrador F, indica una normalización de las concentraciones mensurables de sirolimus libre.
- 20 La Solicitud Provisional EE.UU. copendiente y de propiedad común Número de Serie 60/878.017, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra un reactivo de lisis no desnaturalizante para uso en un inmunoensayo de captura en solución.
- 25 La Solicitud No Provisional EE.UU. copendiente y de propiedad común Número de Serie 11/618.495, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra un reactivo de lisis no desnaturalizante.
- 30 La Solicitud Provisional EE.UU. copendiente y de propiedad común Número de Serie 60/882.863, depositada el 29 de Diciembre de 2006, muestra un ensayo mejorado para fármacos inmunosupresores.
- La Solicitud No Provisional EE.UU. copendiente y de propiedad común Número de Serie 11/490.624, depositada el 21 de Julio de 2006, muestra una composición de reactivos extractivos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para preparar una muestra de ensayo para uso en un ensayo para detectar un analito no proteico unido a un ligando intracelular, cuyo método consiste en poner en contacto dicha muestra de ensayo con un reactivo de ensayo consistente en:
- 10 un reactivo de lisis libre de detergentes, donde dicho reactivo de lisis consiste en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos, donde la razón de glicol a alcohol está en el rango seleccionado entre el grupo consistente en 4:1 a 1:4 y 4:1 a 1:2; y  
una proteasa que tiene actividad proteolítica para dicho ligando intracelular;
- 15 para formar una mezcla homogénea, donde no se usa un detergente para lisar o solubilizar la muestra de ensayo y la mezcla de lisis es compatible para uso en un inmunoensayo sin ulteriores etapas de extracción.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, donde dicha muestra de ensayo es seleccionada entre el grupo consistente en una muestra de ensayo que incluye sangre entera, una muestra de ensayo que incluye una fracción de la sangre, una muestra de ensayo que incluye una fracción constitutiva de la sangre y una muestra de ensayo que incluye sangre humana.
- 25 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en una serina proteasa, una metaloproteasa, una cisteína proteasa, una ácido aspártico proteasa, una ácido glutámico proteasa, pepsina, proteinasa K, termolisina, dispasa, tripsina y quimotripsina.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, donde la muestra de ensayo es añadida al reactivo de lisis en una proporción en el rango seleccionado entre el grupo consistente en 2:1 a 1:10 y 2:1 a 1:2.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, donde el método no incluye la centrifugación de la muestra.
- 45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho reactivo de ensayo incluye además un competidor que compite con el analito por la unión al ligando intracelular, pero que no presenta reacción cruzada con el agente de captura en el sistema de detección del ensayo.
- 50 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 7, donde dicho ligando intracelular es una inmunofilina.
- 55 9. El método de la reivindicación 8, donde el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en un análogo diferente, aunque estructuralmente similar.
- 60 10. El método de la reivindicación 8, donde dicho ligando intracelular se une a un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.
11. Un método para determinar la concentración de un fármaco inmunosupresor en una muestra de ensayo, cuyo método consiste en:
- poner en contacto una muestra de ensayo con un reactivo de ensayo para producir una mezcla de ensayo homogénea, donde el reactivo de ensayo consiste en:
- un reactivo de lisis libre de detergentes, donde dicho reactivo de lisis consiste en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos, donde la razón de glicol a alcohol está en el rango seleccionado entre el grupo consistente en 4:1 a 1:4 y 4:1 a 1:2; y  
una proteasa que tiene actividad proteolítica para un ligando intracelular que se une a dicho fármaco inmunosupresor; y
- estudiar la mezcla de lisis en cuanto a un fármaco inmunosupresor, donde el método no incluye el contacto de la muestra de ensayo con un detergente y la mezcla de lisis es compatible para uso en un inmunoensayo sin ulteriores etapas de extracción.
12. El método de la reivindicación 11, donde el fármaco inmunosupresor es seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina.

13. El método de la reivindicación 11, donde la muestra de ensayo es seleccionada entre el grupo consistente en una muestra de ensayo que incluye una muestra de sangre humana, una muestra de ensayo que incluye sangre entera y una muestra de ensayo que incluye una fracción de la sangre.
- 5 14. El método de la reivindicación 11, donde el método no incluye la centrifugación de la mezcla de lisis.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde dicha proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en una serina proteasa, una metaloproteasa, una cisteína proteasa, una ácido aspártico proteasa, una ácido glutámico proteasa, pepsina, proteinasa K, termolisina, dispasa, tripsina y quimotripsina.
- 10 16. El método de la reivindicación 11, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
- 15 17. El método de la reivindicación 16, donde la muestra de ensayo es añadida al reactivo de lisis en una proporción en el rango seleccionado entre el grupo consistente en 2:1 a 1:10 y 2:1 a 1:2.
18. El método de la reivindicación 16, donde el método no incluye la centrifugación de la muestra.
19. El método de la reivindicación 11, donde dicho reactivo de ensayo incluye además un competidor que compite con el analito por la unión al ligando intracelular, pero que no presenta reacción cruzada con un agente de captura en el sistema de detección del ensayo.
- 20 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 19, donde el analito consiste en un fármaco inmunosupresor y el competidor consiste en un fármaco inmunosupresor diferente, aunque estructuralmente similar.
- 25 21. Un kit de ensayo consistente en:
- (a) al menos un anticuerpo o proteína capaz de unirse específicamente a al menos un fármaco inmunosupresor seleccionado entre el grupo consistente en sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus y ciclosporina; y
- 30 (b) un reactivo de ensayo consistente en:
- un reactivo de lisis no detergente, donde dicho reactivo de lisis consiste en un glicol seleccionado entre el grupo consistente en etilenglicol, propilenglicol y un glicol de dos a seis átomos de carbono, y al menos un alcohol de cinco o menos carbonos, donde la razón de glicol a alcohol está en el rango seleccionado entre el grupo consistente en 4:1 a 1:4 y 4:1 a 1:2; y
- 35 una proteasa que degrada una inmunofilina,
- donde la mezcla del reactivo de lisis es compatible para uso en un inmunoensayo sin ulteriores etapas de extracción y el reactivo de lisis, cuando se mezcla con una muestra de ensayo, forma una mezcla de reactivo de lisis que es una mezcla homogénea.
- 40 22. El kit de la reivindicación 21, donde dicha proteasa es seleccionada entre el grupo consistente en pepsina, proteinasa K, termolisina, dispasa, tripsina y quimotripsina.
- 45 23. El kit de ensayo de la reivindicación 21, que adicionalmente incluye una composición de control que contiene el al menos un fármaco inmunosupresor de (a).
- 50 24. El kit de ensayo de la reivindicación 21, donde el alcohol es seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol y propanol.
25. El kit de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, donde el kit incluye además un competidor que compite con el analito por la unión a un ligando intracelular, pero que no presenta reacción cruzada con el analito en el sistema de detección del ensayo.
- 55

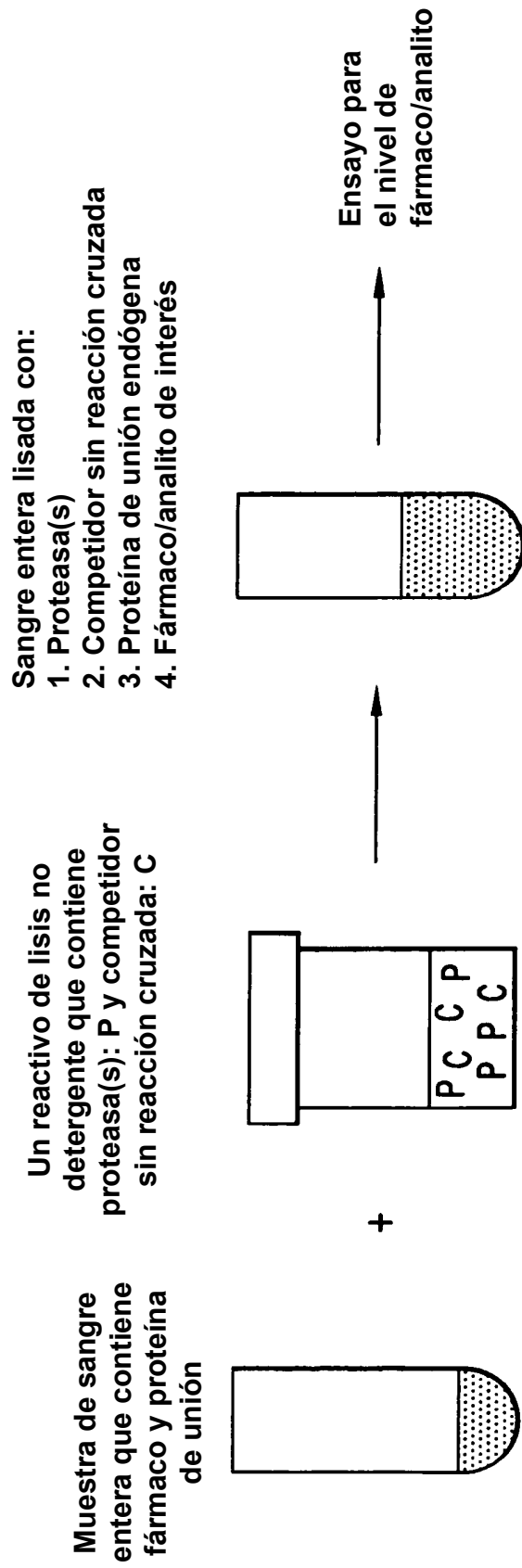


FIG.1