



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0722361-7 A2



(22) Data de Depósito: 19/12/2007
(43) Data da Publicação: 29/04/2014
(RPI 2260)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/53

(54) Título: REAGENTE DE EXTRAÇÃO DE FÁRMACO **(57) Resumo:**
IMUNOSSUPRESSOR PARA IMUNOENSAIOS

(73) Titular(es): ABBOTT LABORATORIES

(72) Inventor(es): Frank C. Grenier, Hina N. Syed, Ryan F.
Workman, Salman Ali

(74) Procurador(es): Diego Goulart de Oliveira Vieira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088056 de
19/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2009/078875 de
25/06/2009

“REAGENTE DE EXTRAÇÃO DE FÁRMACO IMUNOSSUPRESSOR PARA IMUNOENSAIOS”

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se aos imunoensaios de diagnóstico para determinar os níveis
5 de concentração de um fármaco imunossupressor em uma amostra de sangue de paciente, e em particular refere-se ao uso de uma composição melhorada de reagente de extração de fármaco imunossupressor.

ANTECEDENTES

Muitos analisados de interesse clínico são absorvidos por células ou se tornam
10 complexos com um ou mais outros componentes da amostra de teste. Consequentemente, para obter uma medição precisa da quantidade do analisado presente na amostra, é preferível tratar a amostra, e/ou conduzir o ensaio sob condições, tal que o analisado seja liberado das células ou outro componente(s) para detecção no ensaio.

Por exemplo, os fármacos imunossupressores tal como sirolimus (também conhecido como rapamicina), tacrolimus, everolimus, temsoralimus e ciclosporina são eficazes para o
15 tratamento de rejeição de órgão ou tecido em seguida à cirurgia de transplante, de doença de enxerto versus hospedeiro e de doenças autoimunes em humanos. Durante a terapia de fármaco imunossupressor, o monitoramento dos níveis de concentração de sangue do imunossupressor é um importante aspecto de cuidado clínico porque níveis de fármaco insuficientes levam a rejeição de enxerto (órgão ou tecido) e níveis excessivos levam aos efeitos
20 colaterais indesejados e toxicidades. Os níveis de sangue de imunossupressor são então medidos de modo que dosagens de fármaco possam ser ajustadas para manter o nível de fármaco na concentração apropriada. Os ensaios de diagnóstico para determinação de níveis de sangue de imunossupressor desse modo encontraram amplo uso clínico.

Inicialmente, o imunossupressor deve ser extraído e separado dos outros componentes da amostra de paciente. O volume do fármaco imunossupressor na amostra de paciente está presente em um complexo com várias moléculas "portadoras", tal como proteínas de ligação. Sirolimus, tacrolimus e ciclosporina são encontrados predominantemente nos
25 eritrócitos de espécimes de pacientes e são associados com proteínas de ligação específicas, FKBP para sirolimus e tacrolimus, e ciclofilina para ciclosporina. Para garantir uma medição precisa da concentração de fármaco total no espécime, o fármaco ligado às proteínas de ligação é liberado preferivelmente antes de quantificação. Em seguida à sua extração das proteínas de ligação, o fármaco pode ser medido de vários modos diferentes, incluindo por imunoensaio ou cromatografia com absorção ou detecção espectrofotométrica de massa.
35

A extração de sirolimus de suas proteínas de ligação em sangue é freqüentemente realizada por tratamento com solventes orgânicos, tal como, acetonitrila, metanol, ou éter de

dietila. Estes solventes desnaturam as proteínas de ligação e liberam o fármaco. O uso de solventes orgânicos pode ser problemático, porém, quando um imunoensaio é subsequentemente usado para detectar o fármaco liberado que porque a maioria dos solventes orgânicos que vão rapidamente e completamente desnaturar as proteínas de ligação não são compatíveis com os imunoensaios. Eles são muito severos ou eles criam uma amostra bifásica. O metanol foi tipicamente empregado para extrair sirolimus, tacrolimus ou ciclosporina de espécimes de sangue antes do imunoensaio. Porém, um equilíbrio cuidadoso deve ser alcançado tal que a concentração de metanol seja suficiente para liberar o fármaco da proteína de ligação, porém não tão grande quanto para interferir com o imunoensaio subsequente.

10 O uso de metanol e outros solventes orgânicos tipicamente usados, cria um problema adicional porque estes solventes têm pressão de vapor mais alta que água. Como resultado, o sobrenadante de extração que contém o fármaco imunossupressor evapora rapidamente o que causa inexatidão na medição da concentração de fármaco. Os solventes de metanol ou acetonitrila amplamente usados também criam questões de manipulação e disposição para os laboratórios.

Os imunoensaios para fármacos imunossupressores estão disponíveis em uma variedade de formatos, porém todos usam a ligação de um anticorpo ou proteína de ligação (por exemplo, FKBP) ao fármaco imunossupressor. Um imunoensaio geralmente usado é um ensaio que envolve a ligação de um primeiro anticorpo ao imunossupressor e a ligação do imunossupressor rotulado (por exemplo, acridínio-sirolimus) aos sítios de ligação de anticorpo livres restantes, seguido por quantificação por detecção do rótulo. A eficácia destes imunoensaios é afetada pela extração particular e desnaturação de solvente de para o imunossupressor que é usado.

É um objetivo da invenção fornecer uso com imunoensaios de uma composição melhorada de reagente de extração de fármaco imunossupressor que tenha uma baixa pressão de vapor, miscibilidade com água, força de desnaturação de imunossupressor suficiente e compatibilidade com reagentes de imunoensaio. Uma tal composição de reagente de extração seria vantajosa bem como para métodos de não imunoensaio (por exemplo, determinações cromatográficas) porque a pressão de vapor mais baixa, força de desnaturação suficiente e miscibilidade em água tornariam estes métodos mais fáceis de usar.

SUMÁRIO

A invenção fornece uma composição de reagente extrativo melhorada e método para extrair um fármaco imunossupressor, tal como sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsolorimus, zotarolimus, ciclosporina ou análogos dos mesmos, de amostras de sangue ao mesmo tempo em que produzindo um extrato de amostra de teste que tem baixa pressão de vapor e é compatível com componentes de imunoensaio. A composição de reagente inventiva compreende sulfóxido de dimetila (DMSO), pelo menos um sal de metal divalente e água.

A composição de reagente preferida da invenção compreende DMSO e pelo menos um de sulfato de zinco, acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio, sulfato de cobre e misturas de dois ou mais destes sais de metal. Uma composição de reagente mais preferida compreende DMSO, o sal de metal e pelo menos um glicol tendo de dois a

5 seis átomos de carbono, que é preferivelmente pelo menos um dentre etileno glicol (EG), propileno glicol (PG) ou misturas de EG e PG. Embora DMSO, EG e PG sejam solventes de pressão de vapor baixa que são miscíveis em água e estão em uso de laboratório rotineiro, eles não foram empregados como desnaturantes de proteína mas de preferência foram frequentemente adicionados a proteína e misturas de célula como agentes estabilizantes. Em

10 contraste, nós descobrimos que na presença de cátions de metal divalente, DMSO em concentrações mais altas pode servir como um desnaturante de proteína eficaz para liberar fármacos imunossuppressores. Além disso, na presença de cátions divalentes, as concentrações mais baixas de DMSO quando misturado com EG ou PG também podem servir como um desnaturante de proteína eficaz embora as concentrações dos solventes quando usados

15 independentemente não sejam desnaturantes. Os extratos de amostra de teste que são o resultado de uso de cada destas combinações têm baixa pressão de vapor e são compatíveis com ensaios de imunoquímica.

A invenção também compreende um método para detectar o nível de concentração de um fármaco imunossupressor em uma amostra de teste que compreende as etapas de:

20 (a) combinando uma composição de reagente extrativo que compreende DMSO, um sal de metal divalente e água com a amostra de teste para formar um extrato de amostra de teste; (b) combinar o extrato de amostra de teste com pelo menos um anticorpo ou proteína que seja imunologicamente reativo com um fármaco imunossupressor para formar uma mistura de ensaio; (c) incubar a mistura de ensaio sob condições adequadas para formação de

25 complexos entre o anticorpo e o fármaco imunossupressor, se algum, que esteja presente na amostra; e (d) detectar a presença de qualquer complexo formado. A detecção da presença de complexos na etapa (d) pode ser realizada usando um imunossupressor ao qual um composto de geração de sinal foi preso para se ligar aos sítios de ligação de anticorpo livres restantes no analisado. Uma modalidade adicional que fornece a detecção da presen-

30 ça de complexos na etapa (d) é realizada usando um anticorpo detectável que se liga aos complexos formados na etapa (c).

A invenção também compreende um equipamento de reagente para um ensaio para os níveis de sangue de um fármaco imunossupressor compreendendo um recipiente que contém a composição de reagente extrativo que compreende DMSO, pelo menos um sal de

35 metal divalente e água, e mais preferivelmente também compreendendo etileno glicol, propileno glicol, ou qualquer análogo de glicol adequado ou misturas dos mesmos. Preferivelmente, o equipamento de reagente compreende também um segundo recipiente com pelo

menos um anticorpo ou proteína específica para o fármaco imunossupressor. Mais preferi-
velmente, o equipamento de reagente contém um terceiro recipiente contendo uma compo-
sição de controle que compreende um fármaco imunossupressor, por exemplo, um imunos-
supressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotaroli-
mus, ciclosporina e análogos dos mesmos.

A invenção tem capacidade significativa para fornecer imunoensaios de sensibilidade
de mais elevada para determinar níveis de concentração de sangue de sirolimus, tacrolimus,
everolimus, temsorolimus, zotarolimus e ciclosporina. A concentração de reagente extrativo
inventiva permite a medição mais precisa dos níveis de fármaco, ao mesmo tempo em que
fornecendo melhor facilidade de uso pelo laboratório clínico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra os resultados experimentais em extração de sirolimus de amostras
de sangue usando DMSO e sulfato de zinco.

Figura 2 mostra resultados experimentais em extração de sirolimus de amostras de
sangue usando DMSO e quantidades variadas de sulfato de zinco.

Figura 3 mostra resultados experimentais em extração de sirolimus de amostras de
sangue usando DMSO, EG e sulfato de zinco.

Figura 4 mostra resultados experimentais no aquecimento da mistura de extração
de amostras de sangue e na composição de reagente extrativo da invenção.

Figura 5 mostra uma comparação das taxas de evaporação de extrato de amostra
resultando do uso de um desnaturante de metanol da técnica anterior e do uso da invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Geral

A invenção compreende composições de reagente extrativos úteis para a extração
e desnaturação de fármacos imunossupressores tal como sirolimus de uma amostra de
sangue; métodos para a quantificação de níveis de fármaco imunossupressor usando as
composições de reagente extrativos da invenção; e equipamentos diagnóstico que compre-
endem as composições de reagente extrativos da invenção. Os métodos preferidos da in-
venção compreendem imunoensaios que usam membros de ligação específicos imunorre-
ativos, tal como anticorpos monoclonais ou policlonais, ou proteínas de ligação (por exem-
plo, FKBP) para a formação de complexos com o analisado de fármaco imunossupressor.

Definições

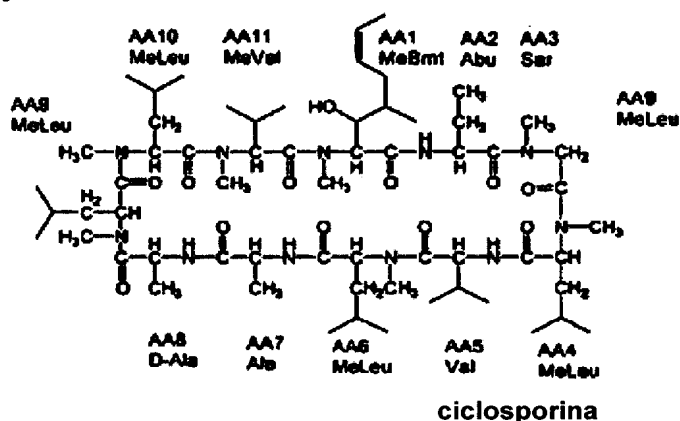
Os termos usados nas reivindicações e especificação são definidos como apresen-
tado abaixo a menos que de outro modo especificado.

Um "fármaco imunossupressor" ou "imunossupressor", como usado aqui, se refere
a um composto terapêutico, molécula pequena ou de base de anticorpos, que tenha a estru-
tura de substância química mesma ou similar a qualquer rapamicina (sirolimus), ou ciclospo-

rina, também conhecido como ciclosporina A. Qualquer análogo conhecido ou futuro desenvolvido de rapamicina ou ciclosporina é considerado um imunossupressor aqui. Os imunossuppressores preferidos incluem sirolimus, tacrolimus, everolimus, temsorolimus, zotarolimus e ciclosporina. Tacrolimus e ciclosporina são inibidores de calcineurina que suprimem a ativação inicial dos linfócitos T do sistema imune por inibição de citocinas tal como interleucina 2. Em contraste, o alvo primário de sirolimus, everolimus e zotarolimus é o alvo de mamífero de rapamicina (mTOR), uma proteína reguladora de ciclo de célula específica. A inibição de mTOR leva a supressão de proliferação de linfócito T regulada por citocina.

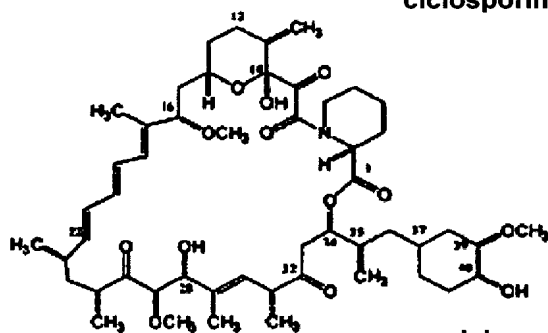
A fórmula química de ciclosporina está na Fórmula A. A fórmula química de sirolimus (rapamicina) está na Fórmula o B. A fórmula química da diferença estrutural de everolimus (RAD) de sirolimus está na Fórmula C.

A



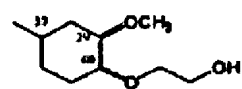
ciclosporina

B



rapamicina

C



RAD

Numerosos derivados ou análogos de ciclosporina foram preparados. A invenção compreende reagentes extrativos, métodos extrativos, ensaios e equipamentos de ensaio para ciclosporina ou qualquer de seus análogos. Os reagentes extrativos também são descritos na literatura como reagentes de lise.

Numerosos derivados ou análogos de rapamicina foram preparados. Por exemplo, estes incluem a preparação de derivados de éster mono e di-éster de rapamicina (Pedido

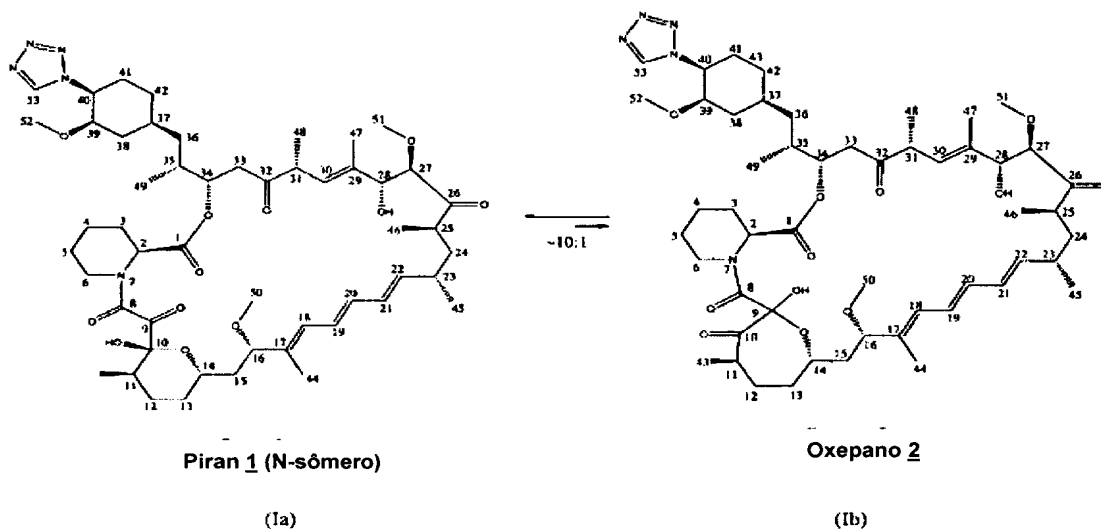
Internacional PCT WO 92/05179), 27-oximas de rapamicina (Patente Européia EP 0 467606); 42-oxo análogo de rapamicina (Patente U.S. No. 5.023.262); rapamicinas bicíclicas (Patente U.S. No. 5.120.725); dímeros de rapamicina (Patente U.S. No. 5.120.727); éteres de silila de rapamicina (Patente U.S. No. 5.120.842); e arilsulfonatos e sulfamatos (Patente U.S. No. 5.177.203). A rapamicina foi sintetizada recentemente em sua forma enantiomérica de ocorrência natural (K. C. Nicolaou e outros, J. Am. Chem. Soc, 1993, 775, 4419-4420; S. L. Schreiber, J., Am. Chem. Soc, 1993, 775, 7906-7907; S. J. Danishefsky, J., Am. Chem. Soc, 1993, 775, 9345-9346). A invenção compreende reagentes extrativos, métodos extrativos, ensaios e equipamentos de ensaio para rapamicina ou qualquer de seus análogos.

Outro análogo imunossupressor de rapamicina é FK-506, também conhecido como tacrolimus que foi isolado de uma cepa de *S. tsukubaensis*. A fórmula química de FK-506 é publicada na Patente Européia EP 0 293 892 B 1. Análogos de FK-506 incluem os produtos naturais relacionados FR-900520 e FR-900523, que diferem de FK-506 no seu substituinte de alquila em C-21, e foram isolados de *S. hygroscopicus yakushimnaensis*. Outro análogo, FR-900525, produzido por *S. tsukubaensis*, difere de FK-506 na substituição de uma fração de ácido pipecólico com um grupo de prolina. A invenção compreende reagentes extrativos, métodos extrativos, ensaios e equipamentos de ensaio para FK-506 ou qualquer de seus análogos. Temsorolimus é outro éster derivado de sirolimus que pode ser monitorado com a invenção.

ABT-578 [40-epi-(l-tetrazolil)-rapamicina], conhecido melhor hoje como zotarolimus, é um antibiótico de triene de macrolida semi-sintético derivado de rapamicina. A estrutura de Zotarolimus é mostrada na Fórmula D.

Fórmula D

Os isômeros de zotarolimus



A invenção compreende reagentes extrativos, métodos extrativos, ensaios e equipamentos de ensaio para zotarolimus ou qualquer de seus análogos. Como usado aqui com referência a um fármaco imunossupressor, o termo "estruturalmente similar" indica que os fármacos têm estruturas suficientemente similares àqueles fármacos que se ligam competitivamente a pelo menos um par de ligação comum (por exemplo, uma proteína de ligação).

Como usado aqui, um "anticorpo" se refere a uma proteína que consiste em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou fragmentos de genes de imunoglobulina. Este termo abrange anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, e fragmentos dos mesmos, como também moléculas criadas de sequências de gene de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes de regiões constantes capa, lambda, alfa, faixa, delta, epsilon e mu, como também genes de região variáveis de imunoglobulina miríade. As cadeias leves são classificadas como capa ou lambda. As cadeias pesadas são classificadas como faixa, mu, alfa, delta, ou epsilon que sucessivamente definem as classes de imunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE respectivamente.

Sabe-se que uma unidade estrutural de imunoglobulina típica (anticorpo) compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma "cadeia leve" (aproximadamente 25 kD) e uma "cadeia pesada" (aproximadamente 50 - 70 kD). O terminal de N de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsável para reconhecimento de antígeno. Os termos "cadeia leve variável (VL)" e "cadeia pesada variável (VH)" referem-se àquelas cadeias leves e pesadas respectivamente.

Os anticorpos existem como imunoglobulinas intactas ou como vários fragmentos bem caracterizados produzidos por digestão com várias peptidases. Desse modo, por exemplo, a pepsina digere um anticorpo abaixo das ligações de dissulfeto na região de articulação para produzir F(ab')₂, um dímero de Fab que sozinho é uma cadeia leve presa a VH-CHI por uma ligação de dissulfeto. O F(ab')₂ pode ser reduzido sob condições moderadas para quebrar a ligação de dissulfeto na região de articulação desse modo convertendo o dímero (Fab')₂ em um monômero de Fab. O monômero de Fab' é essencialmente um Fab com parte da região de articulação (veja, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N., Y. (1993), para uma descrição mais detalhada de outros fragmentos de anticorpo). Ao mesmo tempo em que vários fragmentos de anticorpo são definidos em termos da digestão de um anticorpo intacto, alguém de experiência apreciará que tais fragmentos de Fab' podem ser sintetizados de novo quimicamente ou utilizando metodologia de DNA recombinante.

Desse modo, o termo "anticorpo", como usado aqui, também inclui fragmentos de anticorpo produzidos pela modificação de anticorpos totais ou sintetizado de novo usando

metodologias de DNA recombinante. O termo "anticorpo" também abrange anticorpos de cadeia única (anticorpos que existem como uma cadeia de polipeptídeo única), mais preferivelmente anticorpos Fv de cadeia única (sFv ou scFv), nos quais uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável é unida uma a outra (diretamente ou por um ligador de peptídeo) para formar um polipeptídeo contínuo. O anticorpo Fv de cadeia única é um heterodímero VH-VL covalentemente ligado que pode ser expresso de um ácido nucléico incluindo sequências de codificação de VH e VL unidas diretamente ou unidas por um ligador de codificação de peptídeo (Huston, e outros (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. E.U.A., 85: 5879-5883). Ao mesmo tempo em que o VH e VL são conectados a cada um como uma cadeia de polipeptídeo única, os domínios de VH e VL se associam não covalentemente. Os anticorpos de scFv e várias outras estruturas que convertem as cadeias de polipeptídeo leves e pesadas, naturalmente agregadas, porém quimicamente separadas de uma região de anticorpo V em uma molécula que dobra em uma estrutura tri dimensional substancialmente similar a estrutura de um sítio de ligação de antígeno, são conhecidos por aqueles versados na técnica (veja por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.091.513, 5.132.405, e 4.956.778).

"Analisado", como usado aqui, se refere à substância a ser detectada, que pode ser suspeita de estar presente na amostra de teste. O analisado pode ser qualquer substância para qual exista um par de ligação específico de ocorrência natural ou para qual um par de ligação específico possa ser preparado. Desse modo, um analisado é uma substância que pode se ligar a um ou mais pares de ligação específicos em um ensaio.

Um "par de ligação", como usado aqui, é um membro de um par de ligação, isto é, um par de moléculas em que uma das moléculas se liga a segunda molécula. Os pares de ligação que se ligam especificamente são chamados "pares de ligação específicos". Além dos pares de ligação de antígeno e anticorpo geralmente usados em imunoenaios, outros pares de ligação específicos podem incluir biotina e avidina, carboidratos e lectinas, sequências de nucleotídeo complementares, moléculas efetoras e receptoras, cofatores e enzimas, inibidores de enzima e enzimas, e similares. Os pares de ligação imunorreativos específicos incluem antígenos, fragmentos de antígeno, anticorpos e fragmentos de anticorpo, ambos monoclonal e policlonal, e complexos dos mesmos, incluindo aqueles formados por métodos de DNA recombinante.

O termo "ligação específica" é aqui definido como a ligação preferencial de pares de ligação a outros (por exemplo, um polipeptídeo e um ligando (analisado), dois polipeptídeos, um polipeptídeo e molécula de ácido nucléico, ou duas moléculas de ácido nucléico) em sítios específicos. O termo "especificamente se ligam" indicam que a preferência de ligação (por exemplo, afinidade) para a moléculas/sequência alvo é pelo menos 2-vezes, mais preferivelmente pelo menos 5-vezes, e preferivelmente pelo menos 10 - ou 20-vezes além de uma molécula alvo não específica (por exemplo, uma molécula aleatoriamente gerada

que necessita do sítio(s) especificamente reconhecido).

Um anticorpo que especificamente liga um fármaco imunossupressor é dito ser "específico para" aquele fármaco imunossupressor.

5 O termo "agente de captura" é aqui usado para se referir a um par de ligação que se liga ao analisado, preferivelmente especificamente. Os agentes de captura podem ser presos a uma fase sólida. Como usado aqui, a ligação de um agente de captura fixado a fase sólida ao analisado forma um "complexo fixado a fase sólida".

10 O termo "agente de detecção rotulado" é aqui usado para se referir a um par de ligação que se liga ao analisado, preferivelmente especificamente, e é rotulado com um rótulo detectável ou é rotulado com um rótulo detectável durante uso em um ensaio.

Um "rótulo detectável" inclui uma fração que é detectável ou que pode se converter em detectável.

Como usado com referência a um agente de detecção rotulado, um "rótulo direto" é um rótulo detectável que é preso, por qualquer meio, ao agente de detecção.

15 Como usado com referência a um agente de detecção rotulado, um "rótulo indireto" é um rótulo detectável que especificamente se liga ao agente de detecção. Desse modo, um rótulo indireto inclui uma fração que é o par de ligação específico de uma fração do agente de detecção. A biotina e avidina são exemplos de tais frações que são empregadas, por exemplo, contatando-se um anticorpo biotinilado com avidina rotulada para produzir um anticorpo indiretamente rotulado.

20 Como usado aqui, o termo "reagente de indicador" refere a qualquer agente que é contatado com um rótulo para produzir um sinal detectável. Desse modo, por exemplo, em rotulação de enzima convencional, um anticorpo rotulado com uma enzima pode ser contatado com um substrato (o reagente indicador) para produzir um sinal de detectável, tal como um produto de reação colorido.

25 O termo "amostra de teste" se refere a um componente, tecido ou fluido do corpo de um animal que é a fonte do analisado de fármaco imunossupressor. Estes componentes, tecidos e fluidos incluem os fluidos corpóreos humanos e animais tal como sangue total, soro, plasma, fluido sinovial, fluido cérebro-espinhal, urina, fluidos de linfa, e várias secreções externas do trato respiratório, intestinal e geniturinário, lágrimas, saliva, leite, leucócitos, mielomas e similares; fluidos biológicos tais como sobrenadantes de cultura de célula; espécimes de tecidos fixos; e espécimes de célula fixa. Preferivelmente, a amostra de teste é uma amostra de sangue periférico humano.

II. Composições de Reagente extrativos

35 As composições de reagente extrativos melhoradas da invenção compreendem sulfoxido de dimetila (DMSO), pelo menos um sal de metal divalente e água. A composição de reagente preferida da invenção compreende DMSO e pelo menos um dentre sulfato de zin-

co, acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio e sulfato de cobre. Uma composição de reagente mais preferida compreende DMSO, pelo menos um dentre etileno glicol e propileno glicol, ou qualquer análogo de glicol adequado e o sal de metal. As composições preferidas da invenção têm menos pressões de vapor do que pressão de va-
5 por de água, como medido a 20 graus centígrado e uma pressão atmosférica, e são miscíveis com água.

Qualquer sal de metal divalente adequado que não precipita da composição de reagente da invenção pode ser usado e sais de zinco são preferidos. Os metais de divalentes adequados exemplares incluem zinco, cobre e cádmio. Os requerentes exaustivamente não
10 testaram todos possíveis cátions de metal divalentes, porém determinaram que sulfatos de estanho e manganês não fossem adequados nas concentrações testadas. O ânion do sal de metal pode ser qualquer ânion adequado, incluindo haletos, nitrato, sulfatos, sulfetos, fosfato e acetato. O sal de metal preferido é sulfato de zinco.

A concentração de DMSO, quando usado sem EG ou PG, na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 50%, e preferivelmente pelo menos cerca de 80%,
15 até cerca de 95% em volume da composição de reagente extrativo. A concentração de sal de metal é pelo menos cerca de 5 mM e concentrações até cerca de 400 mM podem ser usadas. Uma faixa de concentração preferida para o sal de zinco é de cerca de 30 a cerca de 75 mM. O uso de concentrações de sal elevadas, por exemplo, acima de cerca de 75
20 mM, pode requerer uso de um composto de quelação, tal como ácido tetraacético de diamina de etileno, em uma etapa de ensaio subsequente para remover o metal em excesso. As composições de reagente extrativos são feitas por qualquer método de mistura adequado para misturar o DMSO suficientemente com água e dissolver o sal de metal.

Os requerentes detectaram que quando EG ou PG é incluído na composição de reagente extrativo, então concentrações mais baixas de DMSO são mais eficazes. Nestas
25 composições preferidas, EG, PG ou misturas dos mesmos estão presentes em uma concentração de pelo menos cerca de 18%, e preferivelmente cerca de 25% a cerca de 33% em volume da composição de reagente extrativo, e DMSO está presente em pelo menos cerca de uma concentração de 50% em volume da composição de reagente extrativo.

30 II. Formação do Extrato de Amostra de Teste

Os métodos da invenção geralmente são realizados em amostras de teste derivadas de um animal, preferivelmente um mamífero, e mais preferivelmente um humano.

Os métodos da invenção podem ser realizados usando qualquer amostra que possa conter o analisado de interesse (por exemplo, um fármaco imunossupressor), como uma
35 amostra de sangue.

O extrato de amostra de teste é formado por qualquer técnica de mistura em qualquer temperatura desejável para contatar qualquer quantidade escolhida da amostra de

sangue com a composição de reagente extrativo. Geralmente cerca de 100 μ L a cerca de 600 μ L de amostra de sangue é misturado com cerca de 200 μ L a cerca de 1200 μ L da composição de reagente extrativo durante até cerca de cinco minutos. Preferivelmente, a extração do imunossupressor é realizada misturando-se 150 μ L de amostra de sangue com 300 μ L de composição e vortexando vigorosamente durante 5 - 10 segundos. Os requerentes preferem realizar a extração aquecendo-se a mistura de extração a uma temperatura acima da temperatura ambiente na faixa de cerca de 30 graus centígrado a cerca de 50 graus centígrado durante cerca de cinco minutos a cerca de sessenta minutos. Depois de misturar, a suspensão resultante é centrifugada durante um tempo adequado a uma taxa de revolução adequada para produzir uma fase de sobrenadante e uma fase de precipitante. Preferivelmente, a mistura é centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante. Após a centrifugação, o sobrenadante é separado usando qualquer método adequado. O sobrenadante é então analisado pelo imunossupressor que usa qualquer técnica adequada, incluindo cromatografia e imunoensaio.

III. Imunoensaios

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se aos imunoensaios que podem ser usados para a identificação qualitativo e/ou de a quantificação do fármaco imunossupressor em uma amostra de teste. A invenção desse modo compreende um método para detectar o nível de concentração de um fármaco imunossupressor em uma amostra de teste que compreende as etapas de: (a) combinar uma composição de reagente extrativo que compreende DMSO, pelo menos um sal de metal divalente com a amostra de teste e água para formar um extrato de amostra de teste; (b) combinar um pelo menos anticorpo ou proteína capaz de se ligar a um fármaco imunossupressor com o extrato de amostra de teste para formar uma mistura de teste; (c) incubar a mistura de teste sob condições adequadas para formação de complexos entre o anticorpo e o fármaco imunossupressor, se algum, que está presente na amostra e é imunologicamente reativo com o anticorpo; e (d) detectar a presença de qualquer complexo formado. Os imunoensaios da invenção podem ser administrados usando qualquer formato conhecido na técnica, tal como, porém não limitado a, um formato de sanduíche, um formato de inibição competitivo (incluindo ambos ensaios de inibição competitiva dianteiro ou reverso) ou em um formato de polarização de fluorescência. Os inventores detectaram que um excelente imunoensaio de inibição competitivo pode ser realizado depois de usar as composições de reagente extrativos da invenção.

Em imunoensaios para a detecção qualitativa ou quantitativa de um fármaco imunossupressor em uma amostra de teste, pelo menos um anticorpo ou proteína que se liga ao fármaco imunossupressor é contatado com pelo menos uma amostra de teste ou extrato de amostra de teste suspeito de conter ou que seja conhecido por conter o fármaco imunossupressor para formar um complexo imune de anticorpo-fármaco ou proteína-fármaco.

Qualquer anticorpo ou proteínas de ligação adequados (por exemplo, FKBP) que se liga ao imunossupressor particular pode ser usada nos imunoensaios inventivos. Os anticorpos para cada um dentre sirolimus, tacrolimus, zotarolimus, ciclosporina e everolimus são conhecidos na técnica e/ou são comercialmente disponíveis, e quaisquer destes pode ser usado. É preferido usar o anticorpo de monoclonal que é um componente de ensaio de IMx® Sirolimus comercialmente disponível de Abbott Laboratories para medir sirolimus (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), ou qualquer outro equipamento de ensaio de Sirolimus comercializado por Abbott Laboratories (por exemplo, para uso em uma plataforma automatizada comercial diferente).

Um protocolo exemplar para produzir um anticorpo específico para um fármaco imunossupressor tal como sirolimus pode ser produzido como segue. Camundongos RBf/Dnj fêmeas são administrados com 3 reforços mensais de um imunógeno sirolimus-27-CMO-tétano toxóide seguido por uma imunização com preparação de sirolimus-42-HS-tétano toxóide no 4º mês. Sete meses depois, um reforço de pré-fusão intraplênico é administrado ao animal usando o imunógeno de sirolimus-27-CMO-tétano toxóide 3 dias antes da fusão. As células B esplênicas são então isoladas e usadas em uma fusão de polietileno glicol padrão (PEG) com o mieloma SP2/0. As culturas confluentes são avaliadas quanto a atividade anti-sirolimus 10-14 dias depois em um microtítulo EIA e culturas positivas são então clonadas usando técnica de clonagem de diluição limitante. Os clones resultantes são isolados e graduados em meio de cultura de tecido IMDM w/FBS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) e o anticorpo segregado é purificado por afinidade usando Proteína A. O anticorpo de sirolimus preferido descrito acima também é eficaz para uso em imunoensaios para sirolimus, everolimus e zotarolimus.

Um anticorpo preferido exemplar para uso em imunoensaios para tacrolimus é descrito em M. Kobayashi e outros, "A Highly Sensitive Method to Assay FK-506 Levels in Plasma", em pp 23 -29 de "FK-506 A Potential Breakthrough in Immunosuppression", A Transplantation Proceedings Reprint, Supplement 6, Vol.

XIX, Outubro, 1987, Editors T. Starzl, L. Makowka e S. Todo, published by Grune & Stratton, Inc., Philadelphia, PA.

Um anticorpo preferido exemplar para uso em imunoensaios para ciclosporina é o anticorpo monoclonal que é um componente de ensaio de ciclosporina de AxSYM® comercialmente disponível de Abbott Laboratories para medir ciclosporina.

Os complexos imunes de anticorpo-fármaco podem então ser detectados usando qualquer técnica adequada. Por exemplo, o anticorpo pode ser rotulado com um rótulo detectável para detectar a presença do complexo anticorpo-fármaco. Qualquer rótulo adequado pode ser usado. A seleção de um rótulo particular não é crítica, porém o rótulo escolhido deve ser capaz de produzir um sinal detectável ou sozinho ou em conjunto com uma ou

mais substâncias adicionais.

Os rótulos detectáveis úteis, sua ligação aos anticorpos ou a outras proteínas de ligação e técnicas de detecção então são conhecidos na técnica. Qualquer rótulo detectável conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, o rótulo detectável pode ser um rótulo radioativo, tal como, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P ; um rótulo enzimático, tal como rábano picante peroxidase, peroxidase alcalina, 6-fosfato de glicose desidrogenase, etc.; um rótulo quimioluminescente, tal como, derivados de acridínio, luminol, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridínio, etc.; um rótulo fluorescente, tal como, fluoresceína (5-fluoresceína, 6 - carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-
 10 fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, pontos quânticos (seleneto de cádmio tamponado por sulfeto de zinco); um rótulo termométrico; ou um immuno-polymerase cadeia reação rótulo. Uma introdução para rótulos, procedimentos de rotulação e detecção de rótulos é encontrada em Polak e Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y.(1997)
 15 e em Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemi* (1996), que é um manual e catálogo combinado publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon cada dos quais está aqui incorporado por referência. Os rótulos preferidos para uso com a invenção são rótulos quimioluminescentes tal como acridínio-9 - carboxamida. Detalhe adicional pode ser encontrado em Mattingly, P. G., and Adamczyk, M. (2002) *Chemiluminescent N-sulfonylacridinium-9-carboxamidas and their application in clinical assays*, in *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications* (Dyke, K. V., Ed.) pp 77-105, CRC Press, Boca Raton.

O rótulo detectável pode ser ligado ao analisado, análogo de analisado, ou anticorpo ou diretamente ou por um agente de acoplamento. Um exemplo de um agente de acoplamento que pode ser usado é EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, cloridrato) que está comercialmente disponível de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Outros agentes de acoplamento que podem ser usados são conhecidos na técnica. Os métodos para ligar um rótulo detectável a um anticorpo são conhecidos na técnica. Adicionalmente, muitos rótulos detectáveis podem ser comprados ou sintetizados os quais já contêm grupos finais que facilitam o acoplamento do rótulo detectável ao anticorpo, tal como, N10-(3-sulfopropil)-N-(3-Carboxipropil)-acridínio-9-carboxamida, de outro modo conhecido como Éster de CPSP-Acridínio ou N10-(3 -sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridínio-9-carboxamida, de outro modo conhecido como Éster de SPSP-Acridínio.

Alternativamente, um segundo anticorpo que se liga ao imunossupressor e que contém um rótulo detectável pode ser adicionado à amostra de teste ou extrato de amostra de teste e usado para detectar a presença do complexo de anticorpo-fármaco. Qualquer rótulo detectável adequado pode ser usado nesta modalidade.

Os imunoenaios da invenção podem ser administrados usando qualquer formato conhecido na técnica, tal como, porém não limitado a, um formato de sanduíche, um formato de inibição competitivo (incluindo ambos ensaios de inibição competitivos diretos ou reversos) ou um formato de polarização de fluorescência. Os formatos exemplares descritos
5 abaixo são descritos em termos de ensaio de um fármaco imunossupressor. Porém, como aqueles de experiência na técnica apreciam, os formatos descritos são aplicáveis a qualquer analisado.

Em imunoenaios para a detecção quantitativa de um imunossupressor, tal como um formato de tipo de sanduíche preferido, pelo menos dois anticorpos são empregados
10 para separar e quantificar o fármaco na amostra de teste ou extrato de amostra de teste. Mais especificamente, os pelo menos dois anticorpos se ligam a partes diferentes do fármaco que forma um complexo imune que é referido como um "sanduíche". Geralmente, um ou mais anticorpos podem ser usados para capturar o imunossupressor na amostra de teste (estes anticorpos freqüentemente são referidos como um anticorpo de "captura" ou anticorpos de "captura") e um ou mais anticorpos são usados para ligar um rótulo detectável (isto é,
15 quantificável) ao sanduíche (estes anticorpos freqüentemente são referidos como o anticorpo de "detecção" ou anticorpos de "detecção"). Em um ensaio de sanduíche, é preferido que ambos os anticorpos de ligação ao fármaco não sejam diminuídos pela ligação de qualquer outro anticorpo no ensaio ao seu sítio de ligação respectivo. Em outras palavras, os anticorpos
20 devem ser selecionados de forma que um ou mais primeiros anticorpos entrem em contato com uma amostra de teste ou extrato de amostra de teste suspeito de conter um imunossupressor não se ligue a todo ou parte do sítio de ligação reconhecido pelo segundo ou anticorpos subsequentes, desse modo interferindo com a capacidade do um ou mais segundo anticorpos de detecção de ligar ao fármaco. Em um ensaio de sanduíche, os anticorpos,
25 preferivelmente, o pelo menos um anticorpo de captura, é usado em quantidades de excesso molar da quantidade máxima de fármaco esperada na amostra de teste ou extrato de amostra de teste. Por exemplo, de cerca de 5 µg/mL a cerca de 1 mg/mL de anticorpo por mL de solução contendo fase sólida podem ser usados.

Em uma modalidade, o pelo menos um primeiro anticorpo de captura pode ser ligado a um suporte sólido que facilita a separação do primeiro complexo de anticorpo-fármaco
30 da amostra de teste. O suporte sólido ou "fase sólida" usado no imunoenso inventivo não são críticos e podem ser selecionados por alguém versado na técnica. Uma fase sólida ou suporte de sólido, como usado aqui, se refere a qualquer material que seja insolúvel, ou que possa se tornar insolúvel por uma reação subsequente. As fases sólidas ou suportes sólidos
35 úteis são conhecidos por aqueles na técnica e incluem as paredes de poços de uma bandeja de reação, tubos de teste, contas de poliestireno, contas magnéticas, faixas de nitrocelulose, membranas, micropartículas tais como partículas de látex, eritrócitos de ovelha (ou

outro animal), e Duracytes® (uma marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, 111.), que são eritrócitos "fixos" por aldeído pirúvico e formaldeído, e outros. Os métodos adequados para imobilizar peptídeos em fases sólidas incluem interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes e similares. A fase sólida pode ser escolhida quanto a sua capacidade intrínseca de atrair e imobilizar o agente de captura. Alternativamente, a fase sólida pode compreender um receptor adicional que tem a capacidade de atrair e imobilizar o agente de captura. O receptor adicional pode incluir uma substância carregada que é opostamente carregada com respeito ao próprio agente de captura ou a uma substância carregada conjugada ao agente de captura. Como ainda outra alternativa, a molécula receptora pode ser qualquer par do membro de ligação específico que esteja imobilizada (preso a) na fase sólida e que tenha a capacidade de imobilizar o agente de captura por uma reação de ligação específica. A molécula receptora permite a ligação indireta do agente de captura a um material de fase sólido antes do desempenho do ensaio ou durante o desempenho do ensaio.

Qualquer suporte sólido conhecido na técnica pode ser usado, incluindo porém não limitado a, suportes sólidos feitos de materiais poliméricos nas formas de poços, tubos ou contas. O anticorpo (ou anticorpos) pode ser ligado ao suporte sólido por adsorção, ligação covalente usando um agente de acoplamento químico ou por outros meios conhecidos na técnica, contanto que tal ligação não interfira com a capacidade do anticorpo de se ligar ao fármaco. Além disso, se necessário, o suporte sólido pode ser derivado para permitir reatividade com vários grupos funcionais no anticorpo. Tal derivação requer o uso de certos agentes de acoplamento tais como, porém não limitado a, anidrido maléico, N-hidroxissuccinimida e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Está dentro do escopo da presente invenção que a fase sólida também pode compreender qualquer material poroso adequado com porosidade suficiente para permitir acesso por anticorpos de detecção e uma afinidade de superfície adequada para ligar os antígenos. A estrutura microporosa geralmente é preferida, porém materiais com estrutura de gel no estado hidratado podem ser usados também. Tais suportes sólidos úteis incluem, porém não estão limitados a nitrocelulose e fibra sintética. É contemplado que tais suportes sólidos porosos descritos aqui preferivelmente estejam na forma de folhas de densidades de cerca de 0,01 a 0,5 mm, preferivelmente cerca de 0.1 mm. O tamanho de poro pode variar dentro de amplos limites, e preferivelmente é de cerca de 0,025 a 15 microns, especialmente de cerca de 0,15 a 15 microns. A superfície de tais suportes pode ser ativada por processos químicos que causam a ligação covalente do antígeno ou anticorpo ao suporte. A ligação irreversível do antígeno ou anticorpo é obtida, porém, em geral, por adsorção no material poroso por forças hidrofóbicas.

Depois que o extrato de amostra de teste suspeito de conter ou contendo o imunossupressor é levada em contato com o pelo menos um primeiro anticorpo de captura, a

mistura resultante é incubada para permitir a formação de um primeiro complexo de anticorpo de captura (ou anticorpo múltiplo)-fármaco. A incubação pode ser realizada em qualquer pH adequado, incluindo um pH de cerca de 4,5 a cerca de 10,0, em qualquer temperatura adequada, incluindo de cerca de 2°C a cerca de 45°C, e durante um período de tempo adequado de pelo menos cerca de um (1) minuto a cerca de dezoito (18) horas, preferivelmente de cerca de 4-20 minutos, preferivelmente de cerca de 17-19 minutos.

Depois da adição de agente de detecção e da formação de um complexo rotulado, a quantidade de rótulo no complexo é quantificada usando técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, se um rótulo enzimático for usado, o complexo rotulado é reagido com um substrato para o rótulo que produz uma reação quantificável tal como o desenvolvimento de cor. Se o rótulo for um rótulo radioativo, o rótulo que usa um contador de cintilação é quantificado. Se o rótulo for um rótulo fluorescente, o rótulo é quantificado estimulando-se o rótulo com uma luz de uma cor (que é conhecido como o "comprimento de onda de excitação") e detectando-se outra cor (que é conhecido como o "comprimento de onda de emissão") que é emitido pelo rótulo com respeito à excitação. Se o rótulo for um rótulo quimioluminescente, o rótulo é quantificado detectando a luz emitida visualmente ou usando luminômetros, película de raios X, película fotográfico de alta velocidade, uma máquina fotográfica de CCD, etc. Uma vez que a quantidade do rótulo no complexo foi quantificada, a concentração de fármaco na amostra de teste pode ser determinada por uso de uma curva padrão que foi gerada, por exemplo, usando diluições em série de fármaco imunossupressor de concentração conhecida. Diferente de usando diluições em série do fármaco, a curva padrão pode ser gerada gravimetricamente, através de espectroscopia de massa e por outras técnicas conhecidas na técnica.

Em um formato competitivo dianteiro preferido, uma alíquota de fármaco rotulada ou análogo do mesmo, de uma concentração conhecida é usada para competir com o fármaco presente em uma amostra de teste para se ligar ao anticorpo. Em um ensaio de competição dianteiro, um anticorpo imobilizado pode ser ou consecutivamente ou simultaneamente contatado com a amostra de teste e um fármaco rotulado ou análogo de fármaco do mesmo. O fármaco ou análogo de fármaco podem ser rotulados com qualquer rótulo detectável adequado, incluindo aqueles rótulos detectáveis descritos acima. Neste ensaio, o anticorpo de captura da presente invenção pode ser imobilizado sobre um suporte sólido usando as técnicas descritas previamente aqui. Alternativamente, o anticorpo de captura pode ser acoplado a um anticorpo, tal como um anticorpo de antiespécies que foi imobilizado em um suporte sólido como uma micropartícula.

O fármaco rotulado ou análogo de fármaco, o extrato de amostra de teste e o anticorpo são incubados sob condições similares àsquelas descritas acima com relação ao formato de ensaio de sanduíche. Dois tipos diferentes de complexos de anticorpo-fármaco são

então gerados. Especificamente, um dos complexos de anticorpo-fármaco gerado contém um rótulo detectável ao mesmo tempo em que o outro complexo de anticorpo-fármaco não contém um rótulo detectável. O complexo de anticorpo-fármaco pode ser, porém não necessariamente tem que ser separado do resto do extrato de amostra de teste antes da quantifi-

5 cação do rótulo detectável. Independente se o complexo de anticorpo-fármaco está separado do resto da amostra de teste, a quantidade de rótulo detectável no complexo de anticorpo-fármaco é então quantificada. A concentração de fármaco na amostra de teste pode ser então determinada comparando-se a quantidade de rótulo detectável no complexo de anticorpo-fármaco com uma curva padrão. A curva padrão pode ser gerada usando diluições

10 em série do fármaco de concentração conhecida, através de espectroscopia de massa, gravimetricamente e por outras técnicas conhecidas na técnica.

O complexo de anticorpo-fármaco pode ser separado da amostra de teste ligando-se o anticorpo a um suporte sólido, tal como os suportes sólidos descritos acima com relação ao formato de ensaio de sanduíche, e em seguida removendo o resto da amostra de

15 teste de contato com o suporte sólido.

Em um ensaio de competição reverso, um fármaco imunossupressor imobilizado ou análogo do mesmo ou pode ser consecutivamente ou simultaneamente contatado com uma amostra de teste ou extrato de amostra de teste e pelo menos um anticorpo rotulado ou proteína rotulada. O anticorpo ou proteína podem ser rotulados com qualquer rótulo detectável

20 adequado, incluindo aqueles rótulos detectáveis descritos acima. O fármaco ou análogo de fármaco podem ser ligados a um suporte sólido, tal como os suportes sólidos descritos acima com relação ao formato de ensaio de sanduíche.

O fármaco imobilizado ou análogo de fármaco, amostra de teste ou extrato de amostra de teste, e pelo menos um anticorpo rotulado ou proteína rotulada são incubados

25 sob condições similares às aquelas descritas acima com relação ao formato de ensaio de sanduíche. Dois tipos diferentes de complexos de anticorpo-fármaco ou proteína-fármaco são então gerados. Especificamente, um dos complexos de anticorpo-fármaco (ou proteína-fármaco) gerados é imobilizado e contém um rótulo detectável ao mesmo tempo em que o outro complexo de anticorpo-fármaco (ou proteína-fármaco) não é imobilizado e contém um

30 rótulo detectável. O complexo de anticorpo-fármaco não imobilizado e o resto da amostra de teste ou extrato de amostra de teste são removidos da presença do complexo de anticorpo-fármaco imobilizado por técnicas conhecidas na técnica, tal como lavagem. Uma que vez o complexo de anticorpo-fármaco não imobilizado é removido, a quantidade de rótulo detectável no complexo de anticorpo-fármaco imobilizado é então quantificada. A concentração de

35 fármaco na amostra de teste pode ser então determinada comparando a quantidade de rótulo detectável no complexo de anticorpo-fármaco com uma curva padrão. A curva padrão pode ser gerada usando diluições em série do fármaco de concentração conhecida, através

de espectroscopia de massa, gravimetricamente e por outras técnicas conhecidas na técnica.

Em um ensaio de polarização de fluorescência, em uma modalidade, um anticorpo ou fragmento funcionalmente ativo do mesmo é contatado primeiro com uma amostra de teste não rotulada que contém o fármaco imunossupressor para formar um complexo de anticorpo-fármaco não rotulado. O complexo de anticorpo-fármaco não rotulado é contatado então com um fármaco fluorescentemente rotulado ou análogo do mesmo. O fármaco rotulado ou análogo de fármaco compete com qualquer fármaco não rotulado na amostra de teste para se ligar ao anticorpo ou funcionalmente ativar o fragmente do mesmo. A quantidade de complexo de anticorpo-fármaco rotulado formada é determinada e a quantidade de fármaco na amostra de teste determinada por uso de uma curva padrão.

Em um aspecto adicional da presente invenção, é descrito um método para detectar nível de concentração de um fármaco imunossupressor em uma amostra de teste que compreende as etapas de: (a) combinar uma composição de reagente extrativo que compreende DMSO, pelo menos um sal de metal divalente e água com a amostra de teste para formar um extrato de amostra de teste; (b) combinar pelo menos um anticorpo ou proteína capaz de se ligar a um fármaco imunossupressor com o extrato de amostra de teste para formar uma mistura; (c) incubar a mistura sob condições adequadas para formação de complexos entre o anticorpo e o fármaco imunossupressor, se algum, que esteja presente na amostra e que seja imunologicamente reativo com o anticorpo; e (d) detectar a presença de qualquer complexo de anticorpo- fármaco imunossupressor formado.

IV. Outros Ensaios Imunossupressores

Qualquer outro método de medição alternativo para a concentração de imunossupressor também pode ser usado com as composições de reagente extrativos inventivas. Por exemplo, o conteúdo de fármaco pode ser determinado por um método com base em espectrometria de massa, tal como a técnica de cromatografia líquida rápida-espectrometria de massa tandem descrita em N., Brown e outros, "Low Hematocrit and Serum Albumin Concentrations Underlie the Overestimation of Tacrolimus Concentrations by Microparticle Enzyme Immunoassay versus Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", Clinical Chemistry. 2005 ;51:586-592.

V. Instrumentação

Qualquer instrumentação ou automatização adequada pode ser usada no desempenho do contato da composição de reagente extrativo com a amostra de sangue e no desempenho do ensaio de nível de concentração de fármaco. É preferido realizar o ensaio de um modo automatizado, tal como no sistema ARCHITECT® (uma marca registrada de Abbott Laboratories, Abbott Park, 111.), que usa detecção de quimioluminescência de hibridização de sanduíche e imunoensaios competitivos. O ensaio também pode ser realizado em

um formato miniaturizado, tal como em um sistema e dispositivo de Laboratório-em-um-Chip.

VI. Equipamentos de Imunoensaio

Em outro aspecto, a invenção compreende equipamentos de imunoensaio para a
5 detecção de um fármaco imunossupressor da mesma ou estrutura similar de substância
química para sirolimus ou ciclosporina, preferivelmente selecionado do grupo que consiste
em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina e análogos dos mesmos, cu-
jos equipamentos compreendem uma composição de reagente extrativo da invenção. Estes
equipamentos também podem incluir agente de captura de anticorpo ou reagente indicador
10 de anticorpo úteis para realizar um imunoensaio de sanduíche. Os equipamentos preferidos
da invenção compreendem recipientes contendo, respectivamente, pelo menos um anticor-
po ou proteína capaz de especificamente se ligar a pelo menos uma fármaco imunossupres-
sor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus e
ciclosporina; uma composição de reagente extrativo que compreende 50% de DMSO em
15 volume da composição de reagente extrativo, 30% - 33% de EG, PG ou misturas do mesmo
em volume da composição de reagente extrativo, água e sulfato de zinco em uma concen-
tração de pelo menos 5 mM; e uma composição de controle que compreende pelo menos
um fármaco imunossupressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus,
everolimus, zotarolimus, ciclosporina ou análogos dos mesmos.

20 Qualquer composição de controle adequada para o ensaio de fármaco imunossu-
pressor particular pode ser incluída nos equipamentos da invenção. As composições de con-
trole geralmente compreendem o imunossupressor atual a ser ensaiado junto com qualquer
aditivo desejável. Por exemplo, a composição de controle para tacrolimus pode ser as com-
posições de controle descritas na Patente U.S. 5.338.684, Grenier e outros.

25 Os equipamentos de acordo com a invenção podem incluir uma fase sólida e um
agente de captura que são fixados à fase sólida ou que se tornam fixados a fase sólida du-
rante o ensaio. Em modalidades exemplares, a fase sólida inclui uma ou mais micropartícu-
las ou eletrodos. Onde tais equipamentos serão empregados para administrar os imunoen-
saio de sanduíche, os equipamentos podem adicionalmente incluir um agente de detecção
30 rotulado. Em certas modalidades, o equipamento de teste inclui pelo menos um rótulo direto,
tal como acridínio-9-carboxamida. Os equipamentos de teste de acordo com a invenção
também podem incluir pelo menos um rótulo indireto. Se o rótulo empregado geralmente
requer um reagente indicador para produzir um sinal detectável, o equipamento de teste
preferivelmente inclui um ou mais reagentes indicadores adequados.

35 Os equipamentos de teste de acordo com a invenção preferivelmente incluem ins-
truções para realizar um ou mais dos imunoensaios da invenção. As instruções incluídas
nos equipamentos da invenção podem ser anexadas em material de papel ou podem ser

incluídas como um suplemento de pacote. Ao mesmo tempo em que as instruções são tipicamente materiais escritos ou impressos elas não são limitadas a tais. Qualquer meio capaz de armazenar tais instruções e as comunicar a um usuário final, é contemplado por esta invenção. Tais meios incluem, porém não estão limitados a, meios de armazenamento eletrônico (por exemplo, discos magnéticos, fitas, cartuchos, chips), meios ópticos (por exemplo, CD ROM), e similares. Como usado aqui, o termo "instruções" pode incluir o endereço de um local de internet que fornece as instruções.

Certamente, vai sem dizer que quaisquer dos formatos exemplares aqui, e qualquer ensaio ou equipamento de acordo com a invenção pode ser adaptado ou pode ser aperfeiçoado para uso em sistemas automatizados e semi-automatizados (incluindo aqueles nos quais há uma fase sólida que compreenda uma micropartícula), como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.089.424 e 5.006.309, e como, por exemplo, comercialmente comercializado por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluindo, porém não limitado ao ARCHITECT® de Abbott Laboratories, AxSYM®, IMX®, ABBOTT PRISM®, e plataformas de Quantum II, como também outras plataformas.

Adicionalmente, os ensaios e equipamentos da presente invenção opcionalmente podem ser adaptados ou otimizados para ponto de sistemas de ensaio de cuidado, incluindo o sistema de imunoensaio eletroquímico de Ponto de Cuidado de Abbott Laboratories (i-STAT®). Os imunossensores e métodos de fabricar e os operar em dispositivos de teste de uso único são descritos, por exemplo, na Patente U.S. 5.063.081 e publicados nos Pedidos de Patente U.S. 20030170881, 20040018577, 20050054078, e 20060160164 (incorporado aqui por referência para seus ensinamentos considerando o mesmo).

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, porém não limitar, a invenção reivindicada.

EXEMPLO 1

Este exemplo ilustra o uso de DMSO em combinação com sulfato de zinco para extrair sirolimus de proteínas de ligação em amostras de sangue. O sirolimus extraído é medido com um imunoensaio.

A composição de reagente extrativo foi preparada a concentrações finais de 86% de DMSO, 14% de água e sulfato de zinco a 40 mM. A extração das amostras de sirolimus de sangue foi realizada misturando-se 100 µL de amostra de sangue com 200 µL da composição de reagente e vortexando vigorosamente durante 5 - 10 segundos. A suspensão resultante foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e o extrato de sobrenadante foi ensaiado para sirolimus como segue. O ensaio foi realizado em um analisador automatizado ARCHITECT® i2000® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) por:

1. Mistura de 10 – 40 µL do extrato de amostra com 50 µL de micropartículas revestidas com anticorpo de anti-camundongo de cabra (de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) e anticorpo anti-sirolimus de camundongo (preparado como descrito abaixo).

2. Incubação da mistura de reação durante cerca de 18 minutos a 33 - 38 graus C.

5 O sirolimus na amostra liga o anticorpo anti-sirolimus nas micropartículas.

3. Adição de 20 µL de conjugado de acridínio-sirolimus à mistura de reação.

4. Incubação da mistura de reação durante cerca de 4 minutos às 33 - 38 graus C.

O conjugado de acridínio-sirolimus liga sítios de ligação anti-sirolimus livres.

5. Lavagem das micropartículas com um tampão de fosfato.

10 6. Adição de pré-ativador (solução ácida) e Ativador (solução básica) para fazer com que o rótulo de acridínio-sirolimus capturado emita luz, que é medida pelo instrumento.

O anticorpo de ligação de sirolimus foi produzido como segue: Camundongos RBf/Dnj fêmeas foram administrados com 3 reforços mensalmente de um imunógeno de sirolimus-27-CMO-tétano toxóide seguido por uma imunização com preparação de sirolimus-42-HS-tétano toxóide no 4º mês. Sete meses depois, um reforço de pré-fusão intrasplênico foi administrado aos animais usando o imunógeno de sirolimus-27-CMO-tétano toxóide 3 dias antes da fusão. As células B esplênicas foram isoladas e usadas em uma fusão de PEG padrão com o mieloma de SP2/0. As culturas confluentes foram avaliadas quanto a atividade anti-sirolimus 10-14 dias depois em um microtítulo EIA, e culturas positivas foram clonadas usando técnica de clonagem de diluição limitante. Os clones isolados foram aumentados em meio de cultura de tecido w/FBS de IMDM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), e o anticorpo segregado foi purificado por afinidade usando a Proteína A.

25 Os dados de curva de resposta são mostrados na Tabela 1 e Figura 1 e demonstram que sirolimus foi liberado de proteínas de ligação com a composição de DMSO/sulfato de zinco.

Tabela 1

Sirolimus (ng/mL)	RLUs
0	573660
3	474794
6	387857
12	279516
20	191208
30	131426

30 As medições de sinal na Tabela 1 são em RLUs (Unidades de Luz Relativa). RLUs são a designação para a unidade óptica de medição utilizada nos sistemas de ARCHITECT®. O sistema ótico ARCHITCT é essencialmente um tubo fotomultiplicador (PMT) que realiza a contagem de fóton na luz emitida pela reação quimioluminescente. A

quantidade de luz gerada pela reação quimioluminescente é proporcional à quantidade de traçador de acridínio presente na mistura de reação, e desse modo permite a quantificação do analisado de amostra de paciente que também é proporcional à quantidade de acridínio que permanece na mistura de reação no momento em que a reação quimioluminescente ocorre.

O termo Unidades de Luz Relativa vem da relação da contagem de fóton para uma certa quantidade de acridínio. Cada módulo ótico é calibrado com um conjunto de padrões de acridínio. Quando a reação quimioluminescente ocorre, a luz é emitida e os fótons são medidos durante um período de tempo de 3 segundos. O PMT converte os fótons contados para sinal digital, que é então enviado para um quadro de circuito para processamento. O quadro de circuito ótico converte o sinal digital do PMT para um sinal análogo que é proporcional aos fótons contados, que é sucessivamente proporcional à quantidade de acridínio presente. Este sinal análogo é então também processado para produzir um valor de RLU. Esta relação foi estabelecida para produzir um padrão para calibração do módulo ótico, onde os padrões de acridínio diferentes têm valores de RLU designados para eles. Desse modo, enquanto a unidade de RLU sozinha for arbitrária, ela será proporcional (isto é, relativa) a certa quantidade de acridínio.

EXEMPLO 2

Este exemplo ilustra a utilidade de concentrações de zinco variadas na composição.

A composição foi preparada em concentrações finais variadas de sulfato de zinco (0, 10, 20, 40 e 80 mM) em 90% de DMSO e 10% de água. A extração das amostras de sirolimus de sangue foi realizada misturando-se 400 µL de amostra de sangue com 800 µL de composição e vortexando vigorosamente durante 5-10 segundos. A suspensão resultante foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e o sobrenadante foi analisado quanto ao teor de sirolimus. O ensaio de sirolimus foi realizado como no Exemplo 1. Os dados de teste são mostrados na Tabela 2 e Figura 2 e ilustra que a liberação de sirolimus de proteínas de ligação é melhorada pela adição do sal de zinco. Os requerentes também testaram e determinaram que o cloreto de zinco, nitrato de zinco, e acetato de zinco também são eficazes.

Tabela 2

Sirolimus (ng/mL)	RLU				
	Nenhum Zn	Zn a 10 mM	Zn a 20 mM	Zn a 40 mM	Zn a 80 mM
0	477005	509875	503822	517429	532760
3	464256	461995	435120	403487	414074
30	367821	214924	161065	99300	100777

EXEMPLO 3

Este exemplo ilustra a utilidade de cátions divalentes diferentes na composição.

A composição de extração foi preparada em concentrações finais diferentes de sais de metal (sulfato de zinco, sulfato de cádmio, sulfato de cobre, sulfato de estanho e sulfato de manganês) e DMSO como mostrado na tabela abaixo (volume restante foi água). A extração das amostras de sirolimus de sangue foi realizada misturando-se 200 µL de amostra de sangue com 400 µL de composição e vortexando vigorosamente durante 5-10 segundos. A suspensão resultante foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e o sobrenadante foi analisado quanto ao teor de sirolimus. O ensaio de sirolimus foi realizado como no Exemplo 1. Os dados do exemplo são mostrados na Tabela 3 e demonstram que os sais de metal exceto zinco também podem ser utilizados.

Tabela 3

DMSO	90%	90%	50%	90%	90%
Sal de Metal	Zn a 40 mM	Cd a 50 mM	Cu a 50 mM	Sn a 20 mM	Mn a 20 mM
Sirolimus (ng/mL)	RLUs	RLUs	RLUs	RLUs	RLUs
0	550492	536394	523472	517375	524178
3	441164	413887	430245	475927	469885
30	107957	89515	126515	222690	220562

EXEMPLO 4

Este exemplo ilustra a utilidade de relações variadas de DMSO e EG na composição de reagente extrativo.

A composição foi preparada em relações de concentração finais diferentes de DMSO e etileno glicol (porcentagem de DMSO e porcentagem de etileno glicol foram 80:18, 75:23, 70:28, 65:33 e 60:33, respectivamente). Todas as composições tiveram 2% de água e sulfato de zinco a 40 mM. A extração das amostras de sirolimus de sangue foi realizada misturando-se 150 µL de amostra de sangue com 300 µL de composição e vortexando vigorosamente durante 5-10 segundos. A suspensão resultante foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e o sobrenadante foi analisado quanto ao teor de sirolimus. O ensaio de sirolimus foi realizado como no Exemplo 1. Os dados de exemplo são mostrados na Tabela 4 e Figura 3 e demonstram que força de desnaturação suficiente pode ser mantida quando a concentração de DMSO é diminuída se a concentração de etileno glicol for aumentada.

Tabela 4

	RLUs com Relações de DMSO:EG variantes				
Sirolimus (ng/mL)	80:18	75:23	70:28	65:33	60:38
0	457694	454223	428721	450344	446482
3	340579	346026	330247	364041	363857

30	70582	78831	72669	95479	94442
----	-------	-------	-------	-------	-------

As concentrações de DMSO ou etileno glicol que são não totalmente ou somente marginalmente eficazes quando usadas sozinhas (por exemplo, 65% de DMSO ou 33% de etileno glicol) são altamente eficazes em combinação. Propileno glicol pode ser substituído para etileno glicol nas misturas de DMSO:etileno glicol (dados não mostrados). As misturas de DMSO:etileno glicol têm a vantagem adicional de solubilidade aumentada para sulfato de zinco.

EXEMPLO 5

Este exemplo ilustra a melhora na eficiência de extração de sirolimus obtida aquecendo-se a mistura de extração.

A composição com base em DMSO foi preparada em concentrações finais de 70% de DMSO, 28% de etileno glicol, 2% de água e sulfato de zinco a 46 mM. A extração das amostras de sirolimus de sangue foi realizada misturando-se 150 µL de amostra de sangue com 300 µL de composição, vortexando-se vigorosamente durante 5 - 10 segundos e incubando-se em temperaturas diferentes durante 15 minutos. A suspensão resultante foi centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e o sobrenadante foi analisado quanto ao teor de sirolimus. O ensaio de sirolimus foi realizado como no Exemplo 1.

Os dados de exemplo são mostrados na Tabela e Figura 4 e demonstram que a liberação mais eficiente de sirolimus ocorre quando a mistura de extração é aquecida (isto é a diferença entre o calibrador de 0 ng/mL e o calibrador de 3 ng/mL aumenta com o aumento da temperatura crescente).

Tabela 5

	RLUs como uma função de Temperatura				
	30 C	35 C	40 C	45 C	50 C
0 ng/mL de Sirolimus	397353	395993	396009	395694	395957
3 ng/mL de Sirolimus	281375	273856	264768	256660	254426

EXEMPLO 6

Este exemplo ilustra a evaporação mínima de uma composição de extração com base em DMSO comparada a uma composição de extração com base em metanol típica.

A composição com base em DMSO foi preparada em concentrações finais de 70% de DMSO, 28% de etileno glicol, 2% de água e sulfato de zinco a 46 mM. A composição com base em metanol foi preparada em concentrações finais de 80% de metanol, 18% de etileno glicol, 2% de água e sulfato de zinco a 50 mM. A extração das amostras de sirolimus de sangue com qualquer composição foi realizada misturando-se 125 µL de amostra de sangue com 250 µL de composição e vortexando-se vigorosamente durante 5 - 10 segundos. A mistura de extração de composição com base em DMSO foi incubada a 42° C duran-

te 10 minutos e a mistura de extração de composição com base em metanol foi incubada em temperatura ambiente durante 10 minutos. As misturas de extração foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletizar o precipitante e os sobrenadantes foram decantados nos copos de amostra usados no analisador ARCHITECT® i2000®. Um conjunto de amostras foi imediatamente para evaporação testado (zero de tempo) e em 1, 2 e 3 horas depois de decantar no copo de amostra (amostras permitidas manterem-se em temperatura ambiente, cerca de 22° C). Os dados de teste são mostrados na Tabela 6 e Figura 5 e ilustram a evaporação rápida de composições com base em metanol, que é manifestada como concentrações de sirolimus mais altas. Em menos de 2 horas, o erro na concentração de sirolimus excedeu 10% com a composição com base em metanol, porém essencialmente nenhuma mudança em concentração ocorreu com a composição de DMSO. O erro na concentração de sirolimus seria maior se a umidade fosse mais baixa ou se a temperatura de incubação fosse mais alta (alguns analisadores de ensaio imunológico incubam amostras em temperaturas próximas de 37° C).

15 Tabela 6

Horas	Sirolimus (ng/mL)	
	DMSO	MeOH
0	11,47	11,14
1	11,37	12,47
2	11,18	12,88
3	11,50	13,83

As modalidades exemplares descritas acima são pretendidas serem ilustrativas em todos os aspectos, exceto restritivo, da presente invenção. Desse modo, a presente invenção é capaz de implementação em muitas variações e modificações que podem ser derivadas da descrição por uma pessoa versada na técnica. Todas tais variações e modificações são consideradas estarem no escopo e espírito da presente invenção como definido pelas seguintes reivindicações.

Além disso, o Pedido Provisional U.S. de pedido de co-pendência, de propriedade comum Número de Série 60/882.732 depositado no dia 29 de dezembro de 2006 é explicitamente incorporada por referência em sua totalidade por seus ensinamentos relativos a um teste diagnóstico para a detecção de uma molécula ou fármaco em sangue total.

O Pedido Não Provisional U.S. de pedido de co-pendência, de propriedade comum Número de Série 60/878.017 depositado no dia 29 de dezembro de 2006 está explicitamente incorporado por referência em sua totalidade por seus ensinamentos relativos a um reagente de lise não desnaturado para uso com imunoenensaio de captura-em-solução.

O Pedido Não Provisional U.S. de pedido de co-pendência, de propriedade comum Número de Série 11/618.495 depositado no dia 29 de dezembro de 2006 está explicitamen-

te incorporado por referência em sua totalidade por seus ensinamentos relativos a um reagente de lise não desnaturado.

5 O Pedido Não Provisional U.S. de pedido de co-pendência, de propriedade comum Número de Série 11/490.624 depositado em 21 de julho de 2006 está explicitamente incorporado por referência em sua totalidade por seus ensinamentos relativos a uma composição de reagente extrativo.

10 O Pedido Provisional U.S. de pedido de co-pendência, de propriedade comum Número de Série 60/882.863 depositado no dia 29 de dezembro de 2006 está explicitamente incorporado por referência em sua totalidade por seus ensinamentos relativos a um ensaio melhorado para fármacos imunossupressores.

Além disso, todas as outras publicações, patentes, e pedidos patentes citados aqui são desse modo incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para avaliação de concentração de um fármaco imunossupressor em uma amostra de sangue humano, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende contatar uma amostra de sangue humana com uma composição de reagente extrativo que compre-
- 5 ende sulfóxido de dimetila, pelo menos um sal de metal de divalent e água.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo adicionalmente compreende etileno glicol, propileno glicol, análogos de glicol ou misturas dos mesmos.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que
- 10 adicionalmente compreende separar qualquer fase sólida sendo o resultado de contato da amostra de sangue humano com a composição de reagente extrativo de qualquer fase de sobrenadante resultante e analisando a fase de sobrenadante quanto a um fármaco imunossupressor.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
- 15 fármaco imunossupressor é selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina ou análogos dos mesmos.
5. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 50% em volume da composição de reagente desnaturante.
- 20 6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 30% em volume da composição de reagente desnaturante.
7. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sal de metal divalente compreende sulfato de zinco, acetato de zinco,
- 25 nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio, sulfato de cobre ou misturas de dois ou mais destes sais de metal.
8. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo tem uma pressão de vapor menor do que a pressão de vapor de água a 20 graus centígrado e pressão atmosférica normal.
- 30 9. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo é contatada com a amostra de sangue a uma temperatura de pelo menos cerca de 30 graus centígrado.
10. Composição de reagente extrativo para extração de um fármaco imunossupressor de uma amostra de sangue, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende sulfóxido
- 35 de dimetila, pelo menos um sal de metal divalente e água.
11. Composição de reagente extrativo, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente compreende etileno glicol, propileno

glicol, análogos de glicol ou misturas dos mesmos.

12. Composição de reagente extrativo, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 50% em volume da composição de reagente extrativo.

13. Composição de reagente extrativo, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 50% em volume da composição de reagente extrativo.

14. Composição de reagente extrativo, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 30% em volume da composição de reagente extrativo.

15. 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de reagente extrativo compreende um sal de metal divalente selecionado do grupo que consiste em sulfato de zinco, acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio, sulfato de cobre ou misturas de dois ou mais destes sais de metal.

16. Composição de reagente extrativo, de acordo com quaisquer das reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo compreende sulfato de zinco.

17. Composição de reagente extrativo, de acordo com quaisquer das reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição de reagente extrativo compreende acetato de zinco.

18. Método para avaliação de concentração de um fármaco imunossupressor uma amostra de sangue humano, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende contatar uma amostra de sangue humano com uma composição de reagente extrativo que compreende sulfóxido de dimetila, pelo menos um sal de metal divalente e água para produzir uma fase sólida e uma fase de sobrenadante, separando a fase de sobrenadante, e analisando a fase de sobrenadante através de imunoensaio para determinar a concentração de um fármaco imunossupressor.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo adicionalmente compreende etileno glicol, propileno glicol ou misturas dos mesmos.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fármaco imunossupressor é selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus, ciclosporina ou análogos dos mesmos.

21. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos 50% em volume da composição de reagente desnaturando.

5 22. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de sulfóxido de dimetila na composição de reagente extrativo é pelo menos cerca de 30% em volume da composição de reagente desnaturando.

23. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sal de metal divalente compreende sulfato de zinco, acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio, sulfato de cobre ou
10 misturas de dois ou mais destes sais de metal.

24. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo é contatada com a amostra de sangue a uma temperatura de pelo menos 30 grau de centigrado.

25. Equipamento de teste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende recipientes separados cada contendo um componente selecionado de (a) pelo menos um anticorpo ou proteína capaz de especificamente se ligar a pelo menos um fármaco imunossupressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus e ciclosporina; e (b) uma composição de reagente extrativo que compreende sulfóxido de dimetila, pelo menos um sal de metal divalente e água.
15

26. Equipamento de teste, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende um recipiente que contém uma composição de controle que compreende pelo menos um fármaco imunossupressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus e ciclosporina.
20

27. Equipamento de teste, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sal de metal divalente compreende sulfato de zinco, acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco, sulfato de cádmio ou sulfato de cobre.
25

28. Equipamento de teste, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição de reagente extrativo adicionalmente compreende etileno glicol, propileno glicol, análogos de glicol ou misturas dos mesmos.

29. Equipamento de teste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende recipientes separados cada contendo um componente selecionado de (a) pelo menos um anticorpo ou proteína capaz de especificamente se ligar a pelo menos uma fármaco imunossupressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus e ciclosporina; e (b) uma composição de reagente extrativo que compreende cerca de 50% de sulfóxido de dimetila em volume da composição de reagente extrativo, cerca de 30% - 33% de etileno glicol, propileno glicol ou misturas dos mesmos em volume da composição de reagente extrativo, água e sulfato de zinco a uma concentração de pelo menos 5 mM; e uma composi-
30
35

ção de controle que compreende um pelo menos fármaco imunossupressor selecionado do grupo que consiste em sirolimus, tacrolimus, everolimus, zotarolimus e ciclosporina.

30. Equipamento de teste, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o equipamento de teste compreende sirolimus.

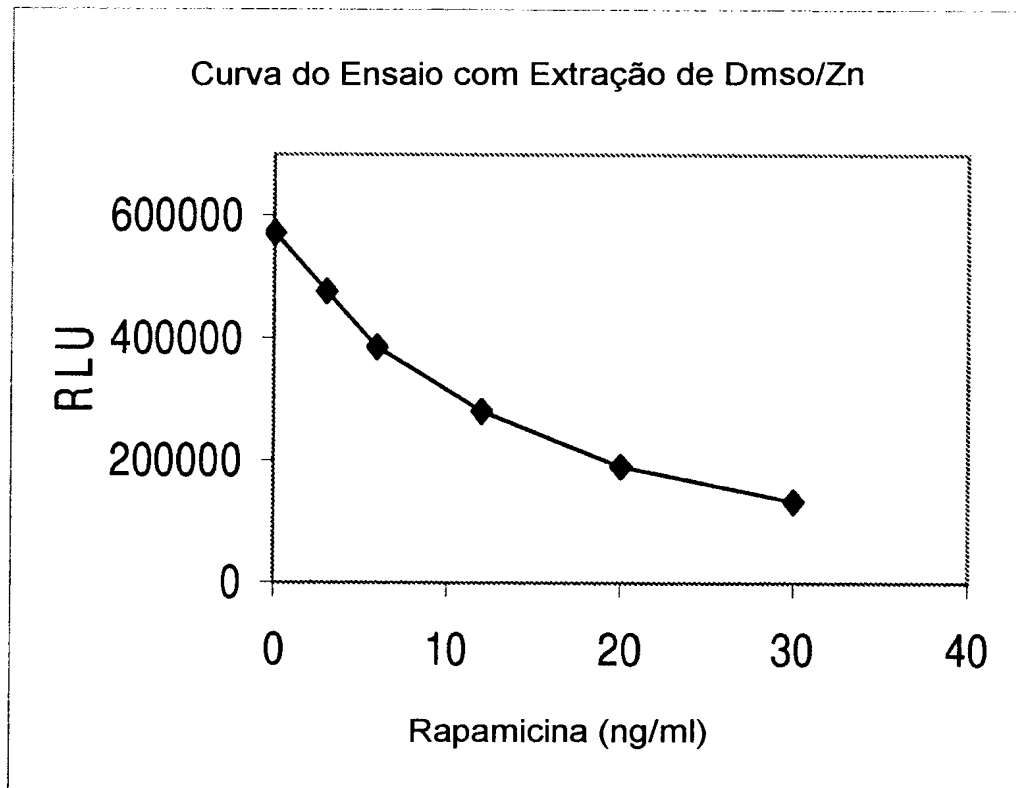


Figura 1

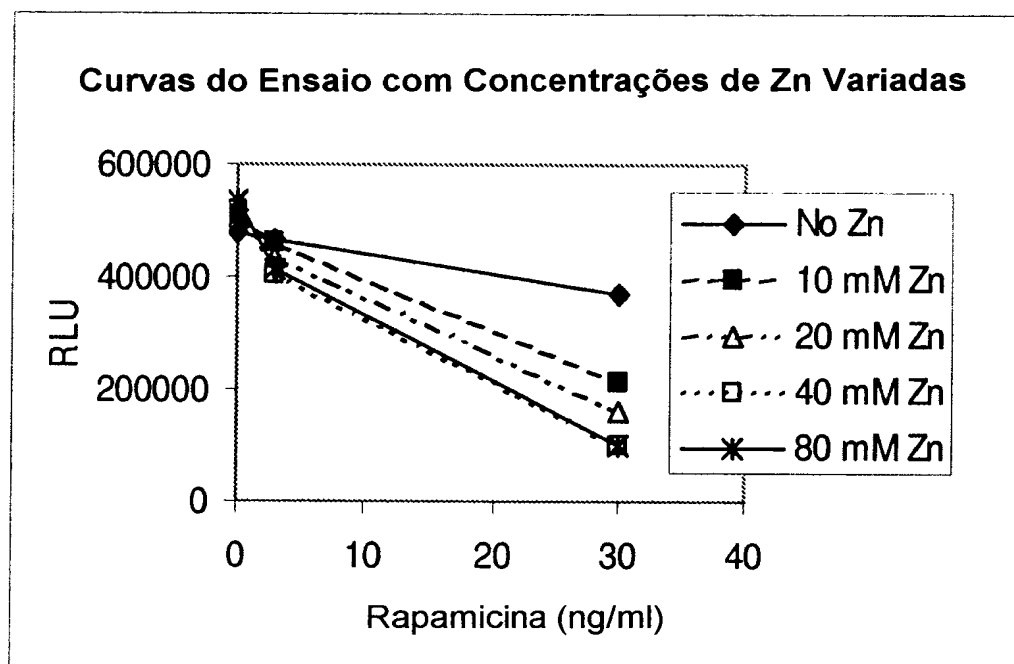


Figura 2

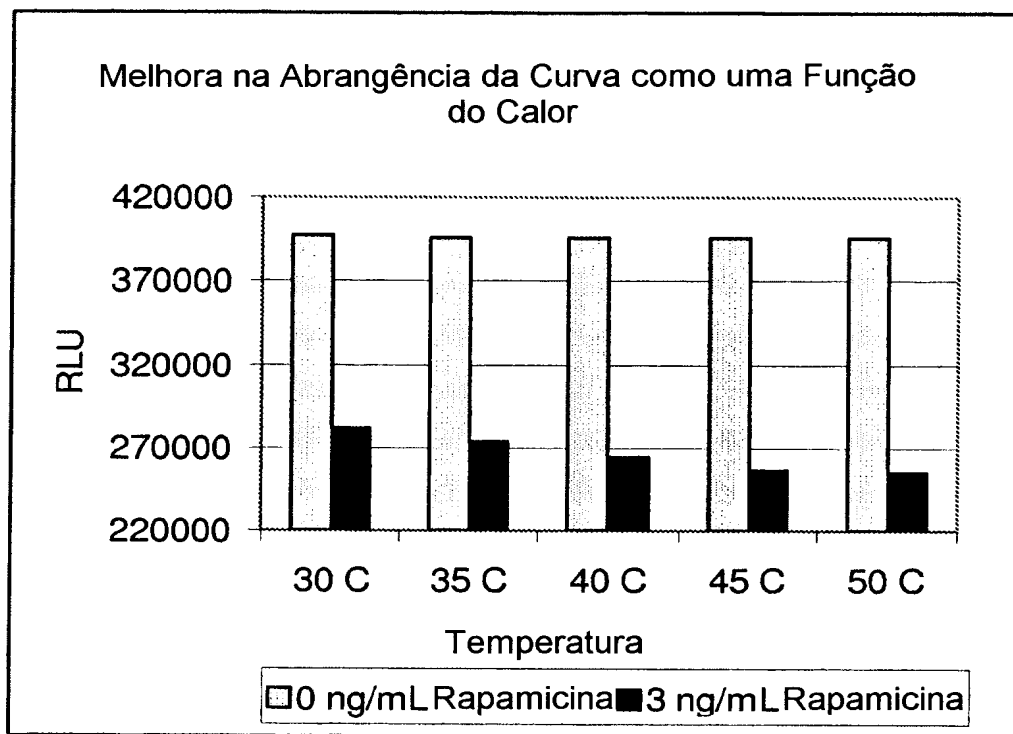


Figura 4

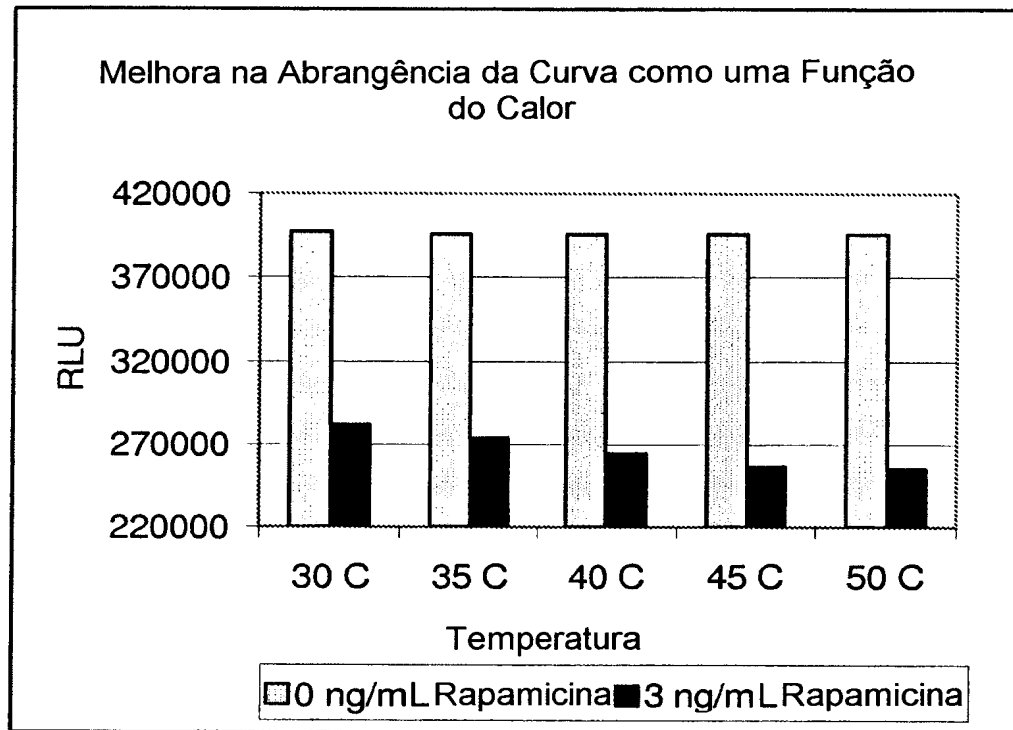
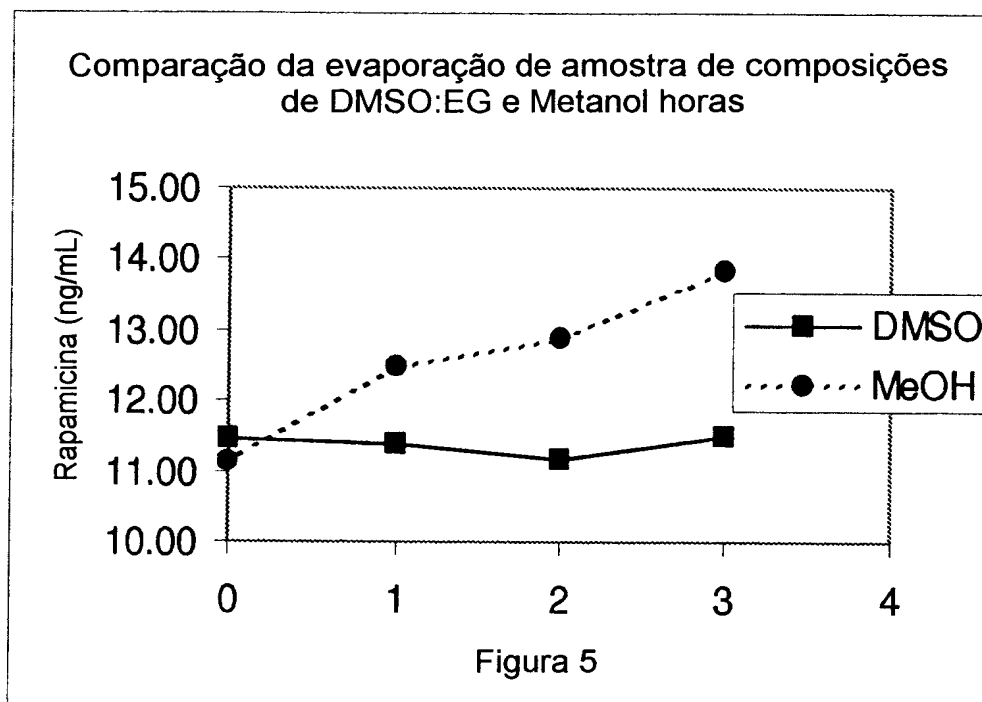


Figura 4



RESUMO

“REAGENTE DE EXTRAÇÃO DE FÁRMACO IMUNOSSUPRESSOR PARA IMUNOENSAIOS”

5 Uma composição melhorada de reagente extrativo e método para extrair um fármaco imunossupressor, tal como sirolimus, tacrolimus ou ciclosporina, de amostras de sangue ao mesmo tempo em que produzindo um extrato de amostra de teste que tenha baixa pressão de vapor e que seja compatível com componentes de imunoensaio. A composição de reagente inventiva compreende sulfóxido de dimetila (DMSO), pelo menos um sal de metal divalente e água. Os extratos da amostra resultantes do uso de cada destas combinações
10 têm baixa pressão de vapor e são compatíveis com os ensaios imunoquímicos.