

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 942**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06805885 .8**  
96 Fecha de presentación: **27.09.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1931999**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **REACTIVO DE LIBERACIÓN PARA COMPUESTOS DE VITAMINA D.**

30 Prioridad:  
**29.09.2005 EP 05021246**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.02.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**KYRIATSOULIS, Apostolos;  
FELDMANN, Susanne;  
HUBER, Erasmus;  
KOBOLD, Uwe;  
PUHLMANN, Angela;  
VON PROFF, Leopold y  
HORN, Nicole**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 374 942 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).

## DESCRIPCION

Reactivo de liberación para compuestos de vitamina D

5 **Antecedentes**

La presente invención se refiere a una composición reactivo para la liberación de los compuestos de vitamina D unidos a una proteína de unión de la vitamina D, un método para detectar un compuesto de 25-hidroxivitamina D, en el cual el compuesto 25-hidroxivitamina D, es liberado de la proteína de unión de la vitamina D, mediante el empleo de este reactivo, y la mezcla obtenida de esta manera se analiza. Se refiere también al empleo del reactivo para liberar los compuestos de vitamina D, así como también un kit para detectar la 25-hidroxivitamina D el cual contiene el reactivo para la liberación de los compuestos de vitamina D, además de reactivos inmunológicos comunes.

Un suministro adecuado de vitamina D es vital, como ya sugiere el mismo término de "vitamina". Una deficiencia de vitamina D conduce a graves enfermedades tales como el raquitismo o la osteoporosis. Así como la vitamina D se consideraba todavía como una sola sustancia al principio del último siglo, el sistema de la vitamina D ha cambiado en el curso de las últimas tres décadas en una compleja y múltiple red de metabolitos de la vitamina D. Actualmente se conocen más de 40 diferentes productos metabólicos de la vitamina D (Zerwekh, J.E., Ann. Clin. Biochem. 41 (2004) 272-281).

Los seres humanos pueden producir solamente vitaminas D<sub>3</sub> ó calciferoles mediante la acción de los rayos ultravioleta de la luz del sol sobre la piel. La vitamina D<sub>3</sub> que se produce en la piel se une a la llamada proteína de unión de la vitamina D, la cual la transporta al hígado en donde se convierte en la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> mediante la 25-hidroxilación. Se sabe actualmente que una multitud de otros tejidos están involucrados en el metabolismo de la vitamina D además de la piel y el hígado, los dos órganos que ya han sido mencionados (véase Schmidt-Gayk, H. et al. (editores), "Calcium regulating hormones, vitamina D metabolites and cyclic AMP" ("Hormonas reguladoras del calcio, metabolitos de la vitamina D y AMP cíclico"), Springer Verlag, Heidelberg (1990), páginas 24-47. La 25-hidroxivitamina D y más específicamente la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> son la forma central de almacenamiento de la vitamina D en el organismo humano con respecto a sus cantidades. Cuando es necesario, estos precursores pueden transformarse en los riñones para formar la 1 $\alpha$ ,25-hidroxivitamina D biológicamente activa, la llamada hormona D. La vitamina D biológicamente activa regula entre otras cosas la absorción del calcio a partir del intestino, la mineralización de los huesos e influye sobre un gran número de otras vías metabólicas como por ejemplo, el sistema de la insulina.

La medición del nivel de vitamina D es por sí misma poco significativa cuando se determina el estatus de la vitamina D de un paciente, debido a que las concentraciones de vitamina D (vitamina D<sub>2</sub> y vitamina D<sub>3</sub>) fluctúan en gran manera en función de la absorción de los alimentos. Además, la vitamina D tiene una relativamente corta semivida biológica en la circulación (24 horas) y por lo tanto no es tampoco por esta razón un parámetro adecuado para la determinación del estatus de la vitamina D de un paciente. Lo mismo sirve también para las formas fisiológicamente activas de vitamina D (1,25-hidroxivitamina D). Estas formas biológicamente activas tienen también lugar en concentraciones relativamente pequeñas y altamente fluctuantes, comparadas con la 25-hidroxivitamina D. Por todas estas razones la cuantificación de la 25-hidroxivitamina D en particular es un medio adecuado para analizar globalmente el estatus total de la vitamina D de un paciente.

La unión de la 25-hidroxivitamina D ó de otros compuestos de la vitamina D, a la proteína de unión a la vitamina D, complica enormemente la determinación de los compuestos de vitamina D. Todos los métodos conocidos necesitan que el compuesto de vitamina D que se va a analizar se libere o se separe del complejo que forma con la proteína de unión. En adelante esto recibe el nombre de liberación de un compuesto de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D, en aras de la simplificación, aunque por supuesto sólo puede liberarse a partir de un complejo de un compuesto de vitamina D y de la proteína de unión de la vitamina D, y no a partir de la proteína de unión de la vitamina D, sola.

Dado que la proteína de unión de la vitamina D tiene una alta tendencia a replegarse correctamente, es necesario a menudo liberar en primer lugar los compuestos de la vitamina D y a continuación separar la proteína de unión de la vitamina D, de los compuestos de vitamina D que se van a analizar.

Debido a la alta importancia clínica de la 25-hidroxivitamina D, se conocen un gran número de métodos a partir de la literatura que permiten que la 25-hidroxivitamina D sea determinada más o menos fiablemente.

Haddad, J.G. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 (1971) 992-995, y Eisman, J. A. et al., Anal Biochem. 80 (1977) 298-305, describen por ejemplo, la determinación de las concentraciones de la 25-hidroxivitamina D en muestras de sangre, empleando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Otros métodos para la determinación de la 25-hidroxivitamina D, se basan entre otras cosas en el empleo de las proteínas de unión con la vitamina D, como las que están presentes en la leche. Así, Holick, M.F. y Ray, R. (US 5. 981.779) y DeLuca et al., (EP 0 583 945) describen ensayos de vitamina D para la hidroxivitamina D y la

dihidroxivitamina D que se basan en la unión de estas sustancias con la proteína de unión de la vitamina D, en donde las concentraciones de estas sustancias se determinan por medio de un procedimiento de ensayo competitivo. Sin embargo, un requisito previo de este método, es que los metabolitos de la vitamina D que se determinen tienen que ser en primer lugar aislados de las muestras de sangre o suero originales, y tienen que ser purificados mediante por ejemplo, cromatografía.

Armbruster, F.P. et al., (WO 99/67211) describe que para la determinación de la vitamina D debe prepararse una muestra de suero o plasma, mediante precipitación con etanol. En este método el precipitado de proteína se separa por centrifugación y el sobrenadante etanólico contiene los metabolitos solubles de la vitamina D. Estos pueden medirse en un ensayo de unión competitiva.

Alternativamente, la patente EP 0 753 743 describe que las proteínas pueden separarse de las muestras de sangre o de suero, empleando una sal de peryodato. En este caso, los compuestos de vitamina D se determinan en el sobrenadante libre de proteína a partir de las muestras tratadas con peryodato. En algunos ensayos comerciales se recomienda el acetonitrilo para la extracción de la muestra de suero o de plasma (por ejemplo, en el ensayo radio inmunológico de DiaSorin o en el ensayo de la vitamina D a partir del "Immundiagnostick" Company).

En los últimos años se han propuesto un gran número de distintos reactivos de liberación, los cuales deberían ser en principio adecuados para la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión presente en la muestra. Sin embargo, esta liberación o desprendimiento, debe ser efectuada en condiciones relativamente suaves, permitiendo así un empleo directo de la muestra tratada con el reactivo de liberación en un ensayo de unión (ver por ejemplo la patente WO 02/57797 y US 2004/0132104). A pesar de los inmensos esfuerzos realizados los últimos años, todos los métodos disponibles para la determinación de la vitamina D, presentan desventajas, como por ejemplo la laboriosa preparación de la muestra, una pobre estandarización, una pobre concordancia entre los distintos procedimientos de ensayo o la mala recuperación de las puntas de vitamina D (ver en particular Zerwekh, J.E. más arriba).

La patente US 2004/0096900 A1 describe un agente de desplazamiento no competitivo para efectuar la separación de cualquier metabolito de la vitamina D en la muestra a partir de la proteína a la cual está unida.

Es particularmente difícil automatizar un ensayo para un compuesto de vitamina D. La automatización requiere la solución de un muy difícil problema, a saber, la supervivencia en una cuerda floja: por una parte es necesario liberar los compuestos de la vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D, con ayuda de un agente de liberación adecuado, y por otra parte las condiciones tienen que seleccionarse de forma que la muestra pueda ser además directamente analizada. Un requisito previo de este análisis directo adicional es que por una parte, la proteína de unión de la vitamina D, no se una, o ya no se una con una extensión significativa a los compuestos de vitamina D durante este análisis y así no interfiera con el análisis y por otra parte, que el reactivo de liberación empleado no interfiera con la unión de los reactivos de detección, como por ejemplo con los anticuerpos de la proteína de unión de la vitamina D que se va a examinar. Además, es sabido que en la población humana existen alelos diferentes de la proteína de unión de la vitamina D los cuales se comportan bioquímicamente de manera diferente. La liberación y medición de los compuestos de vitamina D debe ser comparable para varios alelos/fenotipos.

Así, el objeto de la presente invención es el de desarrollar un reactivo de liberación para los compuestos de la vitamina D y en particular para los compuestos de la hidroxivitamina D, el cual pueda por lo menos superar parcialmente los problemas de la técnica antigua. A continuación se describe una adecuada composición reactivo para la liberación de los compuestos de vitamina D, un método para la determinación de los compuestos de la 25-dihidroxivitamina D, el empleo de la composición reactivo y kits para la determinación de los compuestos de la 25-hidroxivitamina D, empleando esta composición reactivo, y están comprendidos en las reivindicaciones adjuntas.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición reactivo para la liberación de la vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D la cual tiene un valor del pH de 3,8 a 4,8 y contiene de un 15 a un 30 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,7 a un 8 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono), seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol, y el isopropanol.

Además, la invención se refiere a un método para la detección inmunológica del compuesto 25-dihidroxivitamina D, la cual comprende los pasos siguientes:

- a) mezclado de la muestra que se va a investigar con un reactivo que libera los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D para formar una mezcla que tiene un valor del pH de 3,8 a 4,8 y que contiene de un 5 a un 20 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos, seleccionados del

grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N, N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3 dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,5 a un 5 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono) seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol y el isopropanol.

b) análisis inmunológico de la mezcla de a).

Además se describe como la composición reactivo de la presente invención puede emplearse para la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D.

Además, se describe un kit para la detección de la 25-hidroxivitamina D, el cual contiene los reactivos necesarios para el procedimiento de ensayo y la composición reactivo de acuerdo con la invención para liberar los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D.

### **Descripción detallada**

En una primera versión preferida, la presente invención se refiere a una composición reactivo para la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D, la cual tiene un valor del pH de 3,8 a 4,8 y contiene de un 5 a un 30 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3 dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,7 a un 8 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono) seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol y el isopropanol.

Amidas orgánicas líquidas son todas aquellas amidas orgánicas que son líquidas a una temperatura de 20 °C. Son amidas orgánicas la dimetilformamida (DMF), la metiletilformamida, la N-metilpirrolidona (N-MP), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosforico, (HMPT).

El grupo de productos químicos que pueden emplearse de acuerdo con la invención para un reactivo de liberación de la vitamina D, tiene como característica común que son compuestos anfífilos. La composición del reactivo para la liberación de la vitamina D contiene con la mayor preferencia desde un 7 a un 20 por ciento de dichos reactivos anfífilos.

El reactivo de liberación contiene de preferencia DMSO, DMF, N-MP y/o DMPU.

En principio pueden estar presentes en una composición reactivo de acuerdo con la invención, mezclas de varios de los reactivos anfífilos especificados más arriba, que consisten por ejemplo, en varias amidas líquidas. De preferencia se emplean solamente tres, y con mayor preferencia solamente dos y también de preferencia solamente uno de los reactivos anfífilos mencionados más arriba.

También se prefiere que el pH de la composición reactivo de acuerdo con la invención, esté entre un pH de 3,8 y un pH de 4,6, con mayor preferencia entre un pH de 3,9 y un pH de 4,5 y también de preferencia entre un pH de 4,0 y un pH de 4,5.

Como se ha mencionado más arriba, el reactivo de liberación puede contener adicionalmente desde un 0,7 a un 7 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono). Se ha demostrado que es conveniente que dicho alcohol de cadena corta esté también presente en el reactivo de liberación. La proporción del alcohol de cadena corta es de preferencia de un 0,8 a un 5 por ciento en volumen.

Los alcoholes de cadena corta en el sentido de la presente invención son el metanol, el etanol, el propanol, y el isopropanol. El etanol se ha demostrado que es especialmente adecuado como alcohol de cadena corta y por lo tanto es el más preferido.

Con la excepción de la propia vitamina D, otros compuestos conocidos a partir del metabolismo de la vitamina D se unen a la proteína de unión de la vitamina D. El gen que codifica la proteína de unión de la vitamina D se encuentra en la población humana en forma de diferentes alelos. Es sabido que los polipéptidos codificados por estos alelos difieren bioquímicamente, es decir conducen a diferentes fenotipos. Estas diferencias bioquímicas influyen también sobre la unión y liberación de los compuestos de vitamina D. La composición reactivo de acuerdo con la invención, es adecuada para la liberación de los compuestos de vitamina D independientemente del fenotipo de la proteína de unión a la vitamina D. Así, una versión preferida de la presente invención es el empleo de una composición reactivo de acuerdo con la invención para liberar los compuestos de vitamina D de la proteína de unión de la vitamina D ó, como se ha explicado más arriba, para la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de complejos de la proteína de unión de la vitamina D y el compuesto de vitamina D.

La composición reactivo de acuerdo con la invención se emplea además preferentemente, para la liberación de los compuestos de vitamina D, en aquellas muestras que contienen o podrían contener diferentes fenotipos de la proteína de unión de la vitamina D.

5 Con la finalidad de la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D, la composición reactivo de acuerdo con la invención se mezcla con la muestra (de preferencia suero o plasma). El ratio de mezcla entre el reactivo de liberación y la muestra es de preferencia entre 10 : 1 y 1: 10.

Adicionalmente, se prefiere la mezcla aproximadamente de 1/3 a 3 partes por volumen, de preferencia 1/2 a 2 partes por volumen de reactivo de liberación con una parte en volumen de la muestra.

10 La invención se refiere también a una composición reactivo como se ha definido más arriba en la presente, mezclada con suero o plasma, para formar una mezcla con un valor del pH de 3,8 a 4,8 y que contiene desde un 5 a un 20 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3 dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2 (1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT),  
15 y de un 0,5 a un 5 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono) seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol y el isopropanol.

La composición y concentración del tampón se seleccionan por una persona especialista en la técnica de tal forma que el margen de pH especificado y las concentraciones deseadas del reactivo anfílico se ajustan durante la incubación con la substancia inmunológica para la vitamina D. La composición del reactivo de acuerdo con la invención contiene de preferencia 20 mM – 400 mM de porción de tampón. Esta porción de tampón es  
20 particularmente de preferencia entre 30 mM y 350 mM ó entre 50 mM y 300 mM.

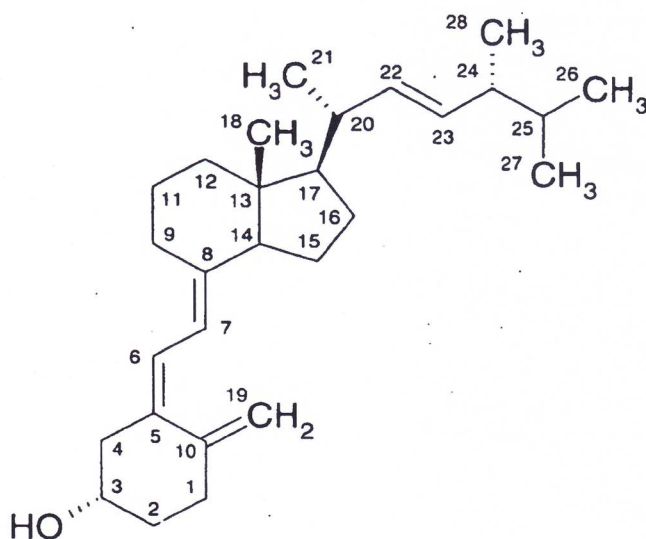
Adicionalmente, la invención se refiere a un método para la detección inmunológica de un compuesto de 25-hidroxitamina D, la cual comprende los pasos de:

- 25 a) mezclado de la muestra que se va a investigar con un reactivo que libera los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D para formar una mezcla que tiene un valor del pH de 3,8 a 4,8 y contiene de un 5 a un 20 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfílicos, seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3 dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,5 a un 5 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono) seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol y el isopropanol.  
30 b) análisis inmunológico de la mezcla de a).

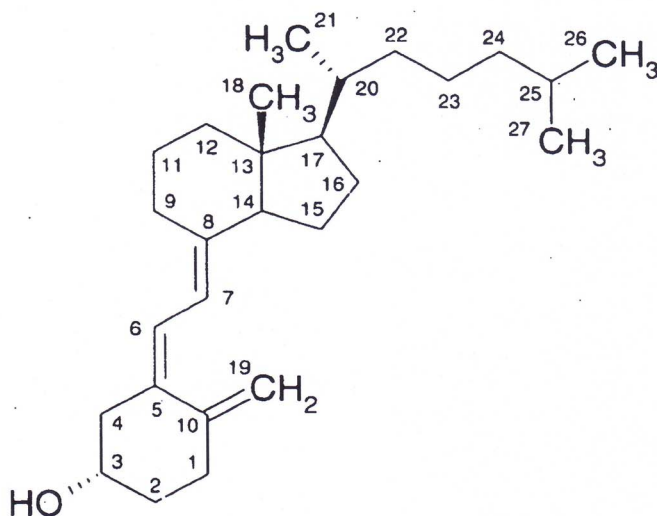
Es esencial para la detección inmunológica del compuesto de 25-hidroxitamina D, de acuerdo con la presente invención, que el compuesto de 25-hidroxitamina D (= analito) de la muestra se incuba con la substancia inmunológica bajo las condiciones establecidas más arriba para la mezcla. El pH es particularmente preferible entre un pH 4,0 y un pH 4,5 durante esta incubación. La concentración del reactivo anfílico seleccionado de acuerdo con la invención es de preferencia entre un 7 y un 15 por ciento en volumen y con más preferencia entre un 8 y un 12 por ciento en volumen durante la incubación del analito con el reactivo inmunológico. El alcohol de cadena corta está de preferencia presente a una concentración de un 0,7 a un 1,5 por ciento en volumen y con mayor preferencia de un 0,8 a un 1,2 por ciento en volumen durante dicha incubación con el reactivo inmunológico.

40 Si no se establece otra cosa, el término "compuesto de vitamina D" debe comprenderse como que incluye todos los compuestos que contienen la estructura de la vitamina D<sub>2</sub> ó la estructura de la vitamina D<sub>3</sub>, de acuerdo con las siguientes fórmulas estructurales I y II.

Formula I



Formula II



En las fórmulas estructurales I y II, las posiciones de la vitamina D están establecidas de acuerdo con la nomenclatura de los esteroides. La 25-hidroxitamina D significa los metabolitos de la vitamina D que están hidroxilados en la posición 25 de las fórmulas estructurales I y II, es decir la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, así como también la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. Los compuestos adicionales de la 25-hidroxi-vitamina D son las formas 1,25 y 24,25-dihidroxitamina D.

La 1,25-hidroxitamina D se refiere a las formas activas de la vitamina D (las llamadas hormonas D) tienen una hidroxilación en la posición 1 así como también en la posición 25 de las fórmulas estructurales I y II:

Otros metabolitos conocidos de la vitamina D son la 24-, 25-dihidroxitamina D<sub>2</sub> y la 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

La detección inmunológica de un compuesto de vitamina D se efectúa de preferencia de forma que por lo menos se detecte un compuesto de la 25-hidroxitamina D seleccionado del grupo formado por la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, la 1,25 dihidroxitamina D<sub>2</sub> y la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

Como ya se ha mencionado más arriba, la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> y la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> son formas particularmente relevantes de la vitamina D, para el diagnóstico. En el método de acuerdo con la invención, la

detección de la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> y/o la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> es la preferida.

En principio pueden emplearse como materiales inmunológicos todos los socios proteináceos, como por ejemplo los anticuerpos u otros polipéptidos específicamente de unión que unen uno o más compuestos de la 25-hidroxitamina D. Un requisito previo para emplear en el método descrito más arriba para la detección de un compuesto de la 25-hidroxitamina D es solamente que la unión al compuesto de la 25-hidroxitamina D que se va a examinar, tenga lugar bajo las condiciones de incubación seleccionadas.

El término anticuerpo significa anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígenos de estos anticuerpos como por ejemplo los fragmentos Fab, F(ab)<sub>2</sub>' ó anticuerpos de cadena única. Los polipéptidos que se unen específicamente son en particular socios de unión como aquellos que pueden obtenerse mediante el fago display McCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554, con tecnologías del ADN recombinante (patente US 4.816.567) o a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes (Larrick, J.W. y Fry, K.E. Hum. Antibod. Hybridomas, 2 (1991) 172-189). Es preferible el empleo de anticuerpos policlonales o monoclonales producidos de la manera convencional o fragmentos de unión a antígenos, de los mismos.

Todos los metabolitos conocidos de la vitamina D son como tales no inmunogénicos. La activación química de los componentes del metabolismo de la vitamina D así como su copulación a moléculas soporte o grupos informantes no es cualquier cosa. Así, para una exitosa inmunización es esencial preparar un conjugado el cual, por ejemplo, contiene la 25-hidroxitamina D como un hapteno. El término hapteno para una persona especializada en la técnica significa una substancia que por sí misma no es inmunogénica pero al copularse con una moléculas soporte grande se convierte en una forma contra la cual pueden generarse los anticuerpos. Los materiales de soporte adecuados para la producción de un conjugado de hapteno ya son conocidos por una persona especializada en la técnica. La albúmina de suero bovino, la β-galactosidasa o la llamada hemocianina del molusco "keyhole limpet" ("lapa de ojo de cerradura") (KLH), se emplean habitualmente como materiales de soporte.

Varias posiciones de las estructuras como se muestran en las fórmulas I y II son en principio adecuadas para la activación y la copulación con un material de soporte. La copulación vía posición 3 de la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> ó de la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> se ha comprobado por ejemplo, que es favorable para la generación de anticuerpos que se unen a la 25-hidroxitamina D de manera adecuada.

Un procedimiento para la producción de anticuerpos que se unen a la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> así, como también a la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, se describe en detalle en los ejemplos.

La composición reactivo de acuerdo con la invención se ha confirmado que es adecuada para emplear en un ensayo automatizado para los compuestos de la 25-hidroxitamina D. La presente invención se refiere de preferencia al empleo de una composición reactivo de acuerdo con la invención para la liberación de los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión de la vitamina D, especialmente en un ensayo inmunológico para la determinación de los compuestos de la 25-hidroxitamina D.

El ensayo para la 25-hidroxitamina D está de preferencia completamente automatizado. Completamente automatizado en este caso significa que el experimentador solamente tiene que colocar la muestra en un analizador automatizado y todos los demás pasos se efectúan automáticamente por el aparato analizador. El ensayo completamente automatizado es particularmente preferido efectuarlo con un analizador Elecsys® de la firma Roche Diagnóstics.

La composición reactivo de acuerdo con la invención se emplea de preferencia en un método para la detección de la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> y/o la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.

El ensayo se efectúa de preferencia como un ensayo inmunológico competitivo en el cual la composición reactivo de acuerdo con la invención se emplea como la llamada muestra tampón, es decir la muestra se mezcla con la composición reactivo de acuerdo con la invención. En dicho ensayo competitivo se añade un compuesto de vitamina D en una cantidad definida a los competidores del ensayo con el correspondiente compuesto de vitamina D a partir de la muestra para los sitios de unión del anticuerpo de detección. Cuanta más cantidad del compuesto de vitamina D está presente en la muestra, tanto más pequeña es la señal de detección.

El método para la detección inmunológica de un compuesto de la 25-hidroxitamina D puede efectuarse de diferentes maneras, tomando como base el conocimiento de la presente invención.

Por ejemplo y de manera preferida, la muestra se mezcla en primer lugar con una composición reactivo de acuerdo con la invención y se incuba antes de que se añadan los otros componentes del ensayo.

Adicionalmente, y de manera preferida, la muestra, la composición reactivo de acuerdo con la invención y una substancia inmunológica se mezclan juntas directamente y a continuación se efectúa una incubación.

También es posible y preferido que la composición reactivo de acuerdo con la invención ya contenga la substancia

inmunológica. Esto significa que en esta versión, la composición reactivo de acuerdo con la invención contiene adicionalmente de preferencia un anticuerpo policlonal o monoclonal para la 25-hidroxivitamina D.

Muchos sistemas de ensayo comerciales se basan en el empleo de fases sólidas recubiertas con avidina o estreptavidina (SA), por ejemplo placas de microtitulación revestidas de SA ó látex recubiertos con SA.

Un derivado biotinilado del analito se une por ejemplo a esta fase sólida de SA antes o durante el procedimiento de ensayo. Cuando se detecta la 25-hidroxivitamina D, ésta puede ser por ejemplo una 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> biotinilada y/o una 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> biotinilada. Cuando se emplea una fase sólida revestida de SA, es posible y preferible que la muestra, la composición reactivo de acuerdo con la invención, un derivado biotinilado de la 25-hidroxivitamina D y una sustancia inmunológica, se mezclen y se incuben conjuntamente.

De acuerdo con lo descrito en la presente invención, una persona experta en la técnica es capaz de utilizar un kit de ensayo que contiene todos los componentes que son necesarios para detectar los compuestos de la vitamina D. En particular un kit de ensayo preferido para la detección de un compuesto de vitamina D se caracteriza porque además de un anticuerpo contra el compuesto de vitamina D, dicho kit comprende una composición reactivo como se describe en la presente.

La invención se clarifica además mediante los ejemplos y figuras siguientes. El alcance real de protección es resultado de las reivindicaciones adjuntas a esta invención.

#### **Descripción de las figuras:**

Figura 1: Método de comparación: inmunoensayo (- DMSO) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante cromatografía líquida combinada con la espectroscopia de masas (LC-MS-MS) así como también por medio de un inmunoensayo (IA) en el cual se empleó tampón sin añadir DMSO (= - DMSO) para la incubación. Los resultados en ng/ml para un total de 53 muestras se representó sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 2: Método de comparación: inmunoensayo (+ DMSO) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón conteniendo DMSO (= +DMSO) para la incubación en el IA. Los resultados en ng/ml para un total de 48 muestras se representó sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 3: Método de comparación: inmunoensayo (- DMSO) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón sin DMSO para la incubación en el IA. Como muestras se emplearon 31 muestras a partir de personas de ascendencia africana. Los resultados en ng/ml para un total de 78 muestras se representaron sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 4: Método de comparación: inmunoensayo (+ DMSO) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón conteniendo DMSO para la incubación en el IA. Entre otras, se emplearon como muestras, 31 muestras de personas de ascendencia africana. Los resultados en ng/ml para un total de 79 muestras se representaron sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 5: Método de comparación: inmunoensayo (+ DMSO) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón conteniendo DMSO para la incubación en el IA. Entre otros, se emplearon 81 muestras de personas de ascendencia africana, como muestras. Los resultados en ng/ml para un total de 136 muestras se representó sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 6: Método de comparación: inmunoensayo (+ DMF) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón conteniendo dimetilformamida (= + DMF) para la incubación en el IA. Entre otras, se emplearon 81 muestras a partir de personas de ascendencia africana, como muestras. Los resultados en ng/ml para un total de 136 muestras se representaron sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

Figura 7: Método de comparación: inmunoensayo (+ N-MP) y LC-MS-MS

Se determinó la 25-hidroxivitamina D mediante LC-MS-MS así como también por medio de un IA en el cual se empleó un tampón conteniendo N-MP (= + N-MP) para la incubación en el IA. Entre otras, se emplearon como muestras, 81 muestras a partir de personas de ascendencia africana. Los resultados



en ng/ml para un total de 135 muestras se representaron sobre el eje de las X para la LC-MS-MS y sobre el eje de las Y para el IA.

### **Ejemplo 1**

Síntesis de la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> - 3-hemisuccinato KLH

Para esta síntesis se activó químicamente la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> a la posición 3 (véase fórmula II) y se copuló a la KLH como soporte inmunológico. Esta síntesis se efectuó mediante los pasos intermedios del 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> - 3-hemisuccinato y del 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>- 3-hemisuccinato-N-hidroxisuccinimida éster.

#### 1. 1 Preparación del 25 hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-hemisuccinato

10 mg (25 µmoles) de 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, nº H-4014) se disuelven en 1 ml de piridina absoluta y se agitan durante 4 días a temperatura ambiente en la obscuridad con 125 mg (1,25 mmoles) de anhídrido succínico. La mezcla de reacción se trata con 10 ml de acetato de etilo y en cada caso se lava con 2 x 10 ml de agua, ácido clorhídrico 0,1 M y a continuación de nuevo con agua. La fase orgánica se seca empleando aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro, se filtra y el disolvente se elimina al vacío. El sólido residual se seca al alto vacío, obteniéndose 10,5 mg (rendimiento: 84 %) de un sólido incoloro.

#### 1,2 Preparación del 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-1000 hemisuccinato-N-hidroxisuccinimida éster

Se disuelven 10,0 mg (20 µmoles) de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-hemisuccinato en 7 ml de diclorometano anhidro y se mezclan con 2,76 mg (24 µmoles) de N-hidroxisuccinimida y 3,72 mg (24 µmoles) de N(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). Se agita durante la noche en atmósfera de argón, a continuación la fase orgánica se lava dos veces con 10 ml de agua, se seca con aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro y se filtra. El disolvente se elimina al vacío y el producto de reacción residual se seca durante 3 horas al alto vacío. Se obtiene 11,3 mg (rendimiento: 94 %) de éster de N-hidroxisuccinimida, el cual se emplea para la conjugación sin una purificación adicional.

#### 1. 3 Síntesis del 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-hemisuccinato-KLH

Se disuelven 150 mg de hemocianina del molusco "keyhole limpet" (KLH; Sigma-Aldrich nº H 8283) en 25 ml de tampón de fosfato de potasio 0,1 M, de pH 8,0 y se añaden 11,3 mg del éster de N-hidroxi-succinimida en 2 ml de DMSO. Se agita durante la noche a temperatura ambiente, el producto se purifica a continuación mediante una columna de gel (AcA 202, volumen de la columna 0,5 litros; tampón de fosfato de potasio 0,1 M de pH 7,0). Las fracciones que contienen la proteína conjugada se detectan mediante absorción de UV ( $\lambda = 256 \text{ nm}$ ) y se reúnen. Se añade un 10 % de glicerina, y la solución opalescente de color gris se emplea para la inmunización.

### **Ejemplo 2**

Generación y aislamiento de anticuerpos contra la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>

#### 2. 1 Inmunización

Los anticuerpos se generan en una oveja. Para la inmunización se emplea el conjugado 25 – hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-hemisuccinato KLH del ejemplo 1. La dosis de inmunización es de 0,1 mg por animal. La primera inmunización se efectúa en adyuvante de Freud completo. Se efectúan inmunizaciones adicionales a intervalos de 4 semanas en adyuvante incompleto de Freud durante

un período de 10 meses. Se recoge el suero en el centro de cada intervalo de inmunización.

#### 2. 2 Purificación de los anticuerpos policlonales de oveja

Se eliminan los componentes que contienen lípidos del suero de la oveja inmunizada con conjugado de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>-3-hemisuccinato- KLH con ayuda de Aerosil® (1,5 %). A continuación se precipitan las inmunoglobulinas empleando sulfato de amonio (1,7 M). El precipitado se dializa contra tampón de fosfato de potasio 15 mM conteniendo 50 mM de NaCl, de pH 7,0, y a continuación se purifica mediante cromatografía de DEAE-sefaraosa. La fracción de IgG (=PAB < 25- hidroxitamina D<sub>3</sub> > S-IgG. La (DE) se obtiene a partir del flujo a través de esta columna cromatografica.

#### 2.3 Cromatografía de afinidad para purificar los anticuerpos específicos de la 25-hidroxitamina D

Se prepara un inmunoadsorbedor que contiene la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> conjugada, como el determinante específico, para la purificación inmunocromatográfica de los anticuerpos policlonales. El inmunoadsorbedor se obtiene mediante los siguientes pasos:

a) Síntesis del hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-2'-cianoetil éter

Se disuelven 20,6 mg (50 µmoles) de 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> (Fluka nº 17937) en un matraz de 25 ml, de fondo redondo, de tres bocas, con un termómetro interno, en 10 ml de acetonitrilo seco, en atmósfera de argón. Se añaden 1,5 ml de terc-butanol/acetonitrilo (9:1) a la solución y se enfría a 6 °C en un baño de hielo. A continuación se añaden 820 µl de una solución de acrilonitrilo (86 µl de acrilonitrilo en 1,0 ml de acetonitrilo) y se agita durante 15 minutos a 6°C. A continuación se añaden 205 µl de una solución de hidruro de potasio (25 mg de KH en 0,5 ml de terc.-butanol/acetonitrilo 9: 1). Tiene lugar una breve floculación, después de lo cual se obtiene una solución clara. La solución de reacción se agita durante 45 minutos adicionales a 6 °C y a continuación durante 60 minutos a 4 °C

A continuación se diluye la solución de reacción con 10 ml de metil-terc.-butil éter y se lava dos veces con 10 ml de H<sub>2</sub>O cada vez. La fase orgánica se seca con aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro, se filtra por una frita de vidrio G3 y se evapora en un evaporador rotativo. Se seca al alto vacío para formar un residuo claro viscoso con una masa de aproximadamente 55 mg.

b) Síntesis del hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-3-aminopropil éter

Todo el nitrilo obtenido más arriba se disuelve en 15 ml de dietiléter y se mezcla con una suspensión de 7,5 mg de hidruro de litio en 7,5 mililitros de dietiléter mientras se agita. La mezcla de reacción se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añade una suspensión de 38,4 de hidruro de litio y aluminio en 6,6 ml de dietiléter. Esto da como resultado una fuerte turbidez de la mezcla. La mezcla de reacción se agita durante una hora adicional a temperatura ambiente, a continuación la mezcla de reacción se enfría a 0-5 °C en un baño de hielo y se añaden cuidadosamente 35 ml de agua. El pH se convierte en fuertemente básico mediante la adición de 6,6 ml de solución 10 M de hidróxido de potasio.

Se extrae tres veces con 65 ml de metil-terc.-butil éter cada vez. Las fases orgánicas combinadas se secan empleando aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro, se filtran y se evaporan a temperatura ambiente en un evaporador rotativo. El residuo se seca hasta peso constante empleando una bomba de aceite. El producto crudo se disuelve en 5 ml de DMSO y 3,0 ml de acetonitrilo y se purifica por medio de HPLC preparativa.

Eluyente A = Millipore-H<sub>2</sub>O + 0,1 % de ácido trifluoroacético;

Eluyente B = 95 % de acetonitrilo + 5 % de Millipore-H<sub>2</sub>O + 0,1 % de TFA;  
Gradiente: del 50 % de B al 100 % de B en 100 minutos

Velocidad del flujo: 30 ml/minuto  
Temperatura: temperatura ambiente  
Dimensiones de la columna: Ø = 5,0 cm; L = 25 cm;  
Material de la columna: Vydac C18/300Å/15-20 µm  
Det. longitud de onda: 226 nm

Las fracciones cuyo contenido en producto es mayor del 85 por ciento de acuerdo con la HPLC analítica (Vydac C18 / 300Å / 5 µm; 4,6 x 250 mm) se reúnen en un matraz de fondo redondo y se liofilizan. Se obtienen 13,7 mg (rendimiento: 58 %) en forma de un liofilizado incoloro.

c) Síntesis del éster de la hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-3'-N-(hemisuberil) aminopropil-éter-N-hidroxi succinimida

11,7 mg (25 µmoles) del derivado amino, se disuelven en 5 ml de DMF recién destilado y se añaden 92 mg (250 µmoles) del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido subérico. Se añaden 3,5 µl de trietilamina y la solución se agita durante la noche en atmósfera de argón. El producto crudo se purifica mediante HPLC preparativa (las mismas condiciones de antes). Se obtienen 10,1 mg (rendimiento: 56 %) de éster de N-hidroxisuccinimida después de la liofilización.

d) Síntesis del inmuoadsorbedor de la hidroxivitamina D<sub>2</sub>

Se lavan 20 ml de EAH sefarosa (Amersham Biosciences nº 17-0569-03) con 200 ml de solución 0,5 M de cloruro de sodio sobre una frita de vidrio G3, y se equilibra con 200 ml de tampón 0,03 M de fosfato de potasio, de pH 7,1. Después de separar por filtración el exceso de líquido a través de la frita, la suspensión se trata con 200 ml del mismo tampón y se añaden 1,7 mg (2,3 µmoles) del éster de N-hidroxisuccinimida en 10 ml de de DMSO. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente en un agitador. Se transfiere de nuevo a una frita de vidrio en donde se filtra y se lava con 500 ml de tampón de fosfato de potasio 0,05 M/cloruro de sodio 0,15 M, de pH 7,0. Después de un completo filtrado, se resuspende en 25 ml del mismo tampón y se añaden 0,15 ml de una solución al 25 % de azida de sodio para la conservación.

## e ) Purificación de los anticuerpos

Se empaquetan 10 ml de la matriz de afinidad de d), en una columna, y se equilibran con un tampón formado por 50 mM de fosfato de potasio, 150 mM de NaCl, a un pH de 7,5 (PBS). Se cargan 3,6 g de PAB < 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> > S-IgG (DE), en la columna. La columna se lava en diferentes pasos con PBS, solución 0,5 M de NaCl que contiene 0,05 por ciento de Tween® 20 y cloruro de sodio 30 mM. La inmunoglobulina específicamente unida se desprende de la matriz de afinidad mediante una solución 3 mM de HCl. El eluato de HCl se dializa contra acetato de etilo 1 mM y a continuación se liofiliza. El liofilizado se disuelve en PBS, los agregados se eliminan mediante cromatografía en Superdex 200®, y los anticuerpos policlonales inmuoadsorbidos obtenidos de esta manera se emplean en un paso adicional. La matriz de inmuoafinidad se regenera con ácido propiónico 1 M y se conserva en una solución de PBS que contiene 0,9 % de azida de sodio.

**Ejemplo 3****Ensayos para la detección de la 25-hidroxitamina D**

Se efectúan ensayos comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las determinaciones de la 25-hidroxitamina D se efectúan por medio de HPLC (ensayo para la 25(OH)vitamina D<sub>3</sub>, de "Immundiagnostik" Company, Bensheim, orden n° KC 3400) o mediante LC-MS-MS (Vogesser, M. et al., Clin. Chem. 50 (2004). 1415-1417) como esta descrito en la literatura.

La preparación de los ingredientes y el procedimiento de ensayo general para un nuevo ensayo inmunológico se describe a continuación:

**3. 1 Síntesis del conjugado de hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3'-N-(hemisuberil) aminopropil-éter con biotina-(beta-Ala)-Glu-Glu-Lys (épsilon) (= Ag-Bi)**

Se disuelven 13,7 mg (25 µmoles) de hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3'-aminopropil éter en 3,5 ml de DMSO, 28,7 mg (30 µmoles) de éster de biotin-(beta-Ala)-Glu-Glu-Lys (epison)-hemi-suberato-N-hidroxisuccinimida (Roche Applied Science, n° 11866656), se añaden 12,5 µl de trietilamina y se agita durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se diluye con 4,5 ml de DMSO, se filtra a través de un microfiltro de 0,45 µm y a continuación se purifica mediante HPLC preparativa (ver condiciones en el ejemplo 2.3 b)). Las fracciones que contienen más del 85 % del producto de acuerdo con la HPLC analítica, se reúnen y se liofilizan. Se obtienen 9,8 (rendimiento: 30 %) del conjugado de biotina purificado.

**3. 2 Rutenilación de anticuerpos policlonales contra la 25-hidroxitamina D (= PAB-Ru) purificados mediante cromatografía de afinidad**

Los anticuerpos purificados por afinidad, de acuerdo con el ejemplo 2. 3 e) se transfieren a un tampón de fosfato de potasio 100 mM, de pH 8,5 y la concentración de la proteína se ajusta a 1 mg/ml. El reactivo de rutenilación (rutenio (II) tris (bipiridil)-N-hidroxisuccinimida éster) se disuelve en DMSO y se añade a la solución de anticuerpos con un ratio molar de 7,5 a 1. Después de un tiempo de reacción de 60 minutos, la reacción se paraliza mediante la adición de l-lisina y el exceso de reactivo marcador se separa mediante cromatografía de permeación sobre gel con Sephadex G25.

**3. 3 Procedimiento de ensayo en el inmunoensayo**

La muestra se mide empleando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se mezclan 25 µl de muestra con 30 µl de reactivo de liberación (A) y simultáneamente o secuencialmente con 15 µl de anticuerpo de detección rutenilado (B) y se incuba durante 9 minutos. En el próximo paso, se añade el antígeno de pared biotinilada (C) (50 µl) y el valor del pH se mantiene en el margen deseado mediante la adición posterior de reactivo de liberación (A) (50 µl). Después de 9 minutos adicionales de incubación se añaden partículas de poliestireno magnetizables (D) revestidas con estreptavidina (SA) (30 µl) y después de una incubación adicional durante 9 minutos, se determina como habitualmente, la cantidad de anticuerpo rutenilado unido.

El reactivo de liberación (A) contiene:

220 mM tampón de acetato, pH 4,0	
0,1 % oxipirion	
0,1 % MIT	
1 % EtOH	
0,1 % polidocanol	
0,2 % IgG de conejo	y un reactivo anfífilico cuando se especifica

La solución (B) con el conjugado rutenilado <25-OH-vitamina D > anticuerpo, contiene:

	20 mM	tampón de fosfato, de pH 6,5
	0,1 %	oxypirion
	0,1 %	MIT (N- metilisotiazolona HCl)
5	1 %	EtOH (etanol)
	0,1 %	polidocanol
	1 %	IgG de conejo (DET)
	2,0 µg/ml	PAB-Ru (del ejemplo 3. 2)
		así como también un reactivo anfifílico, cuando se especifica

10 la solución (C) con el antígeno de pared biotinilada contiene:

	20 mM	tampón de fosfato, de pH 6,5
	0,1 %	oxypirion
15	1 %	EtOH
	0,1 %	polidocanol
	0,2 %	IgG de conejo
	0,18 µg/ml	Ag-Bi (del ejemplo 3. 1)
		así como también un reactivo anfifílico, cuando se especifica

20 La suspensión con partículas (D) de látex revestido de SA contiene:

	0,72 mg/ml	partículas de poliestireno magnetizables revestidas de SA, que tienen una capacidad de unión de 470 ng/ml
--	------------	---

25 **Ejemplo 4**

Tampón de incubación de la muestra con/sin adición de un reactivo anfifílico

30 En los experimentos anteriores se ha observado que los sueros de los humanos de antecesores caucásicos y los sueros de humanos de antecesores africanos se comportan de manera distinta en algunos procedimientos de ensayos para la detección de la 25-hidroxivitamina D. Por lo tanto tienen que ser examinados específicamente los sueros normales de dadores de diferentes ascendencias étnicas.

35 4.1 Comparación de las condiciones de incubación con y sin DMSO

(Caucásicos)

Se emplearon las dos composiciones siguientes de tampón, como reactivo de liberación:

- 40
- a) reactivo de liberación (A), solución (B) y solución (C) (ver ejemplo 3.3) sin DMSO (=DMSO) y
  - b) reactivo de liberación (A), solución (B) y solución (C) que adicionalmente contiene 10 % de DMSO (= + DMSO).

45 Se examinaron un total de aproximadamente 50 sueros normales de humanos de ascendencia caucásica y se compararon con el método estándar LC-MS-MS cada vez. Como puede verse en la figura 1, los valores del ensayo inmunológico correlacionan con el LC-MS-MS (un valor r de 0,86 se determinó por medio de la regresión lineal). Sin embargo, la figura 1 muestra también claramente que la pendiente de la línea de regresión es muy baja (se calculó 0,44). Esto significa una recuperación muy alterada de las muestras.

50 En la figura 2 se muestra una comparación de métodos entre el LC-MS-MS y un ensayo inmunológico empleando DMSO. Se calculan una mayor correlación (r= 0,89) y una mayor pendiente (0,60) en comparación con la composición reactivo sin DMSO.

55 4.2 Comparación de las condiciones de incubación con/sin DMSO (caucásicos más africanos)

Un total de 80 sueros normales, de los cuales aproximadamente 50 procedían de individuos de ascendencia caucásica y 31 de individuos de ascendencia africana, fueron inmunológicamente analizados y comparados con el método estándar LC-MS-MS cada vez. Se emplearon los mismos tampones (a) y (b) que en el ejemplo 4.1. Como puede verse en la figura 3, los valores del ensayo inmunológico no correlacionan muy bien con la LC-MS-MS. Se determinó un valor r de 0,69 por medio de la regresión lineal. Sin embargo, la figura 3 muestra también con claridad que la pendiente de la línea de regresión es muy pequeña (se calculó 0,30). Esto indica una recuperación muy alterada de las muestras.

65 Una comparación del método entre la LC-MS-MS y un ensayo inmunológico empleando DMSO se muestra en la figura 4. Se encontró una correlación significativamente mayor (r= 0,93) así como también una pendiente mucho

mayor (0,70) comparadas con la composición reactivo sin DMSO.

### **Ejemplo 5**

#### **5 Comparación de varios reactivos anfífilicos**

Se emplearon las siguientes composiciones tampón:

- 10 (b) reactivo de liberación (A), solución (B) y solución (C) con un contenido adicional del 10 % de DMSO (= + DMSO),  
c) reactivo de liberación (A), solución (B) y solución (C) con un contenido adicional del 10 % de DMF (= + DMF), y  
15 (d) reactivo de liberación (A), solución (B) y solución (C) con un contenido adicional del 10 % de N-MP (= + N-MP).

15 Se han examinado aproximadamente 135 sueros normales de humanos de varias ascendencias, empleando diferentes composiciones reactivo para liberar los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión con la vitamina D, comparándolos con el método estándar LC-MS-MS cada vez. Como puede verse de las figuras números 5, 6 y 7, el DMF y el N-MP además del DMSO son también adecuados como aditivos para un reactivo de liberación de los compuestos de vitamina D. Los valores del ensayo inmunológico correlacionan muy bien con las LC-MS-MS para todos los tres aditivos. Se determinaron empleando la regresión lineal, los valores  $r = 0,91$  (tampón (b)),  $0,92$  (c) y  $0,92$  (tampón (d)) respectivamente. Así, las composiciones reactivo de acuerdo con la invención permiten una determinación de la 25-hidroxivitamina D que es independiente del fenotipo de la proteína de unión con la vitamina D.

25 Se determinaron en este ejemplo valores absolutos del ensayo inmunológico así como también en los ejemplos previos basados en valores de referencia preliminares, por lo que no tienen ningún valor informativo. Una estandarización de la referencia para determinar los valores absolutos, seguros, por medio de la LC-MS-MS, todavía tiene que efectuarse. Los valores relativos muestran aumentos significativos del ensayo logrados con las  
30 composiciones reactivo de acuerdo con la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Composición reactivo para la liberación de la vitamina D a partir de la proteína de unión con la vitamina D la cual tiene un valor del pH de 3,8 a 4,8 y contiene de un 5 a un 30 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,7 a un 8 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono), seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol, y el isopropanol.
2. Composición reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque, está presente del 7 al 20 por ciento en volumen de reactivo anfífilo.
3. Composición reactivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque, el etanol está presente como un alcohol de cadena corta.
4. Método para la detección inmunológica del compuesto de la 25-hidroxivitamina D la cual comprende los siguientes pasos:
  - a) mezclado de la muestra que se va a investigar, con un reactivo que libera los compuestos de la vitamina D a partir de la proteína de unión con la vitamina D, para formar una mezcla con un valor del pH de 3,8 a 4,8 y que contiene de un 5 a un 20 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos, seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3-trimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y de un 0,5 a un 5 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono), seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol, y el isopropanol
  - b) análisis inmunológico de la mezcla de a).
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el compuesto de la 25-hidroxivitamina D se selecciona de la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, la 1,25-dihidroxivitamina D<sub>2</sub>, y la 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se determinan los compuestos de la 25-hidroxivitamina D, la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.
7. Empleo de una composición reactivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, para liberar los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión con la vitamina D.
8. Empleo de una composición reactivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, para liberar los compuestos de vitamina D a partir de la proteína de unión con la vitamina D, en donde la liberación es independiente del fenotipo de la proteína de unión con la vitamina D.
9. Kit para la detección de la 25-hidroxivitamina D, el cual contiene los componentes para una detección inmunológica de por lo menos un compuesto de 25-hidroxivitamina D, caracterizado porque, este kit contiene adicionalmente una composición reactivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Composición reactivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, mezclada con suero o plasma, para formar una mezcla con un valor del pH de 3,8 a 4,8 y que contiene del 5 al 20 por ciento en volumen de uno o más reactivos anfífilos seleccionados del grupo formado por el sulfóxido de dimetilo (DMSO), la dimetilformamida (DMF), la N,N-dimetilacetamida, la tetrametilurea (TMU), la N-metilpirrolidona (N-MP), la 1,3-trimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidona (DMPU) y la triamida del ácido hexametilfosfórico (HMPT), y del 0,5 al 5 por ciento en volumen de un alcohol de cadena corta (de 1 a 3 átomos de carbono), seleccionado entre el metanol, el etanol, el propanol, y el isopropanol.

Fig. 1

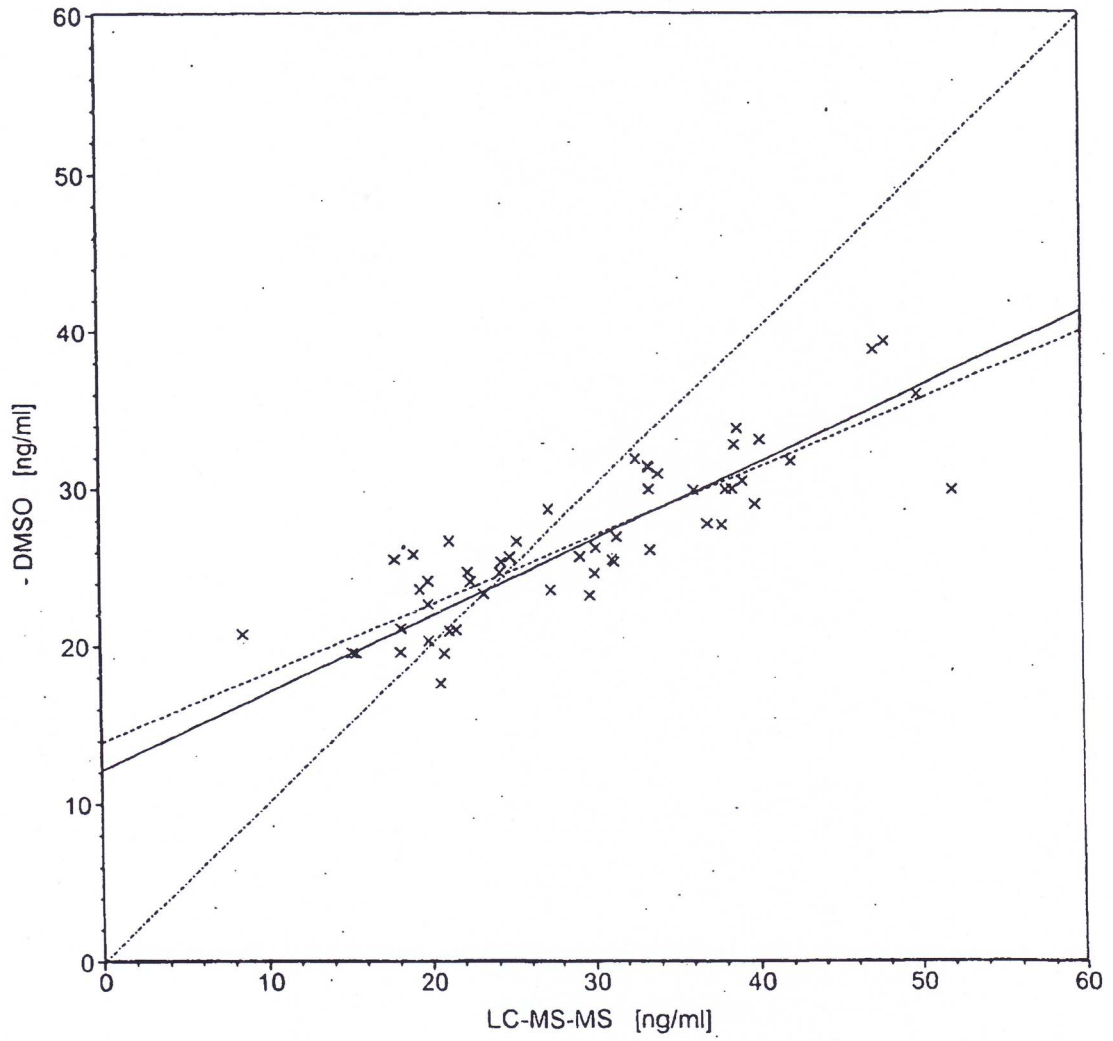


Fig. 2

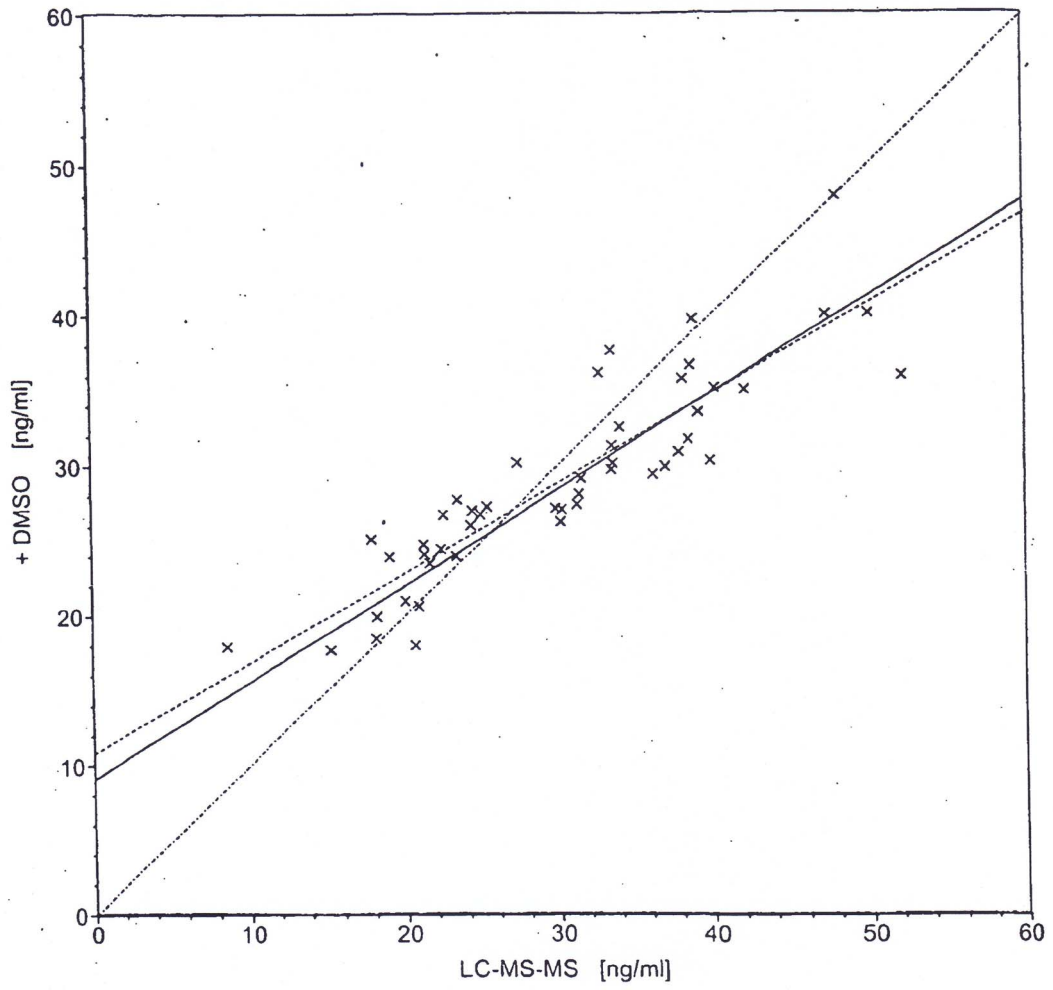




Fig. 3

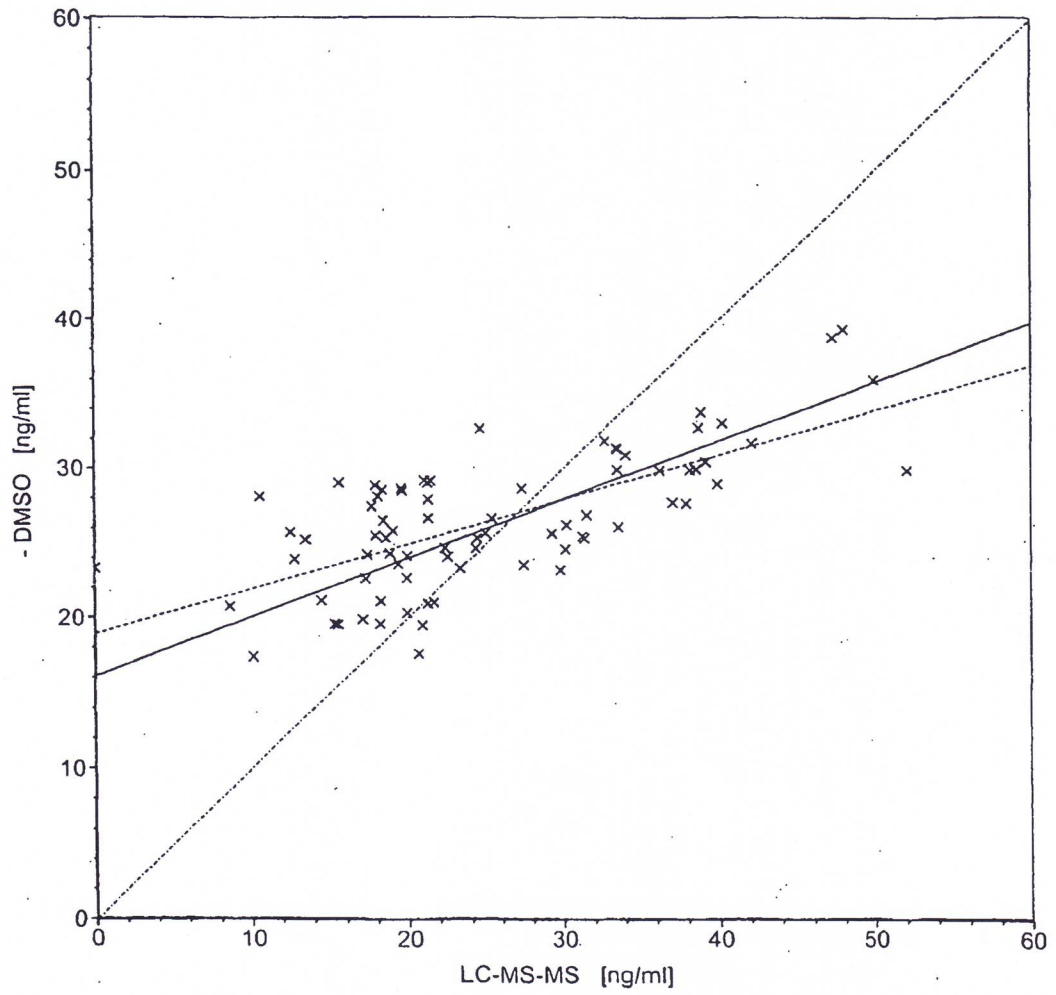


Fig. 4

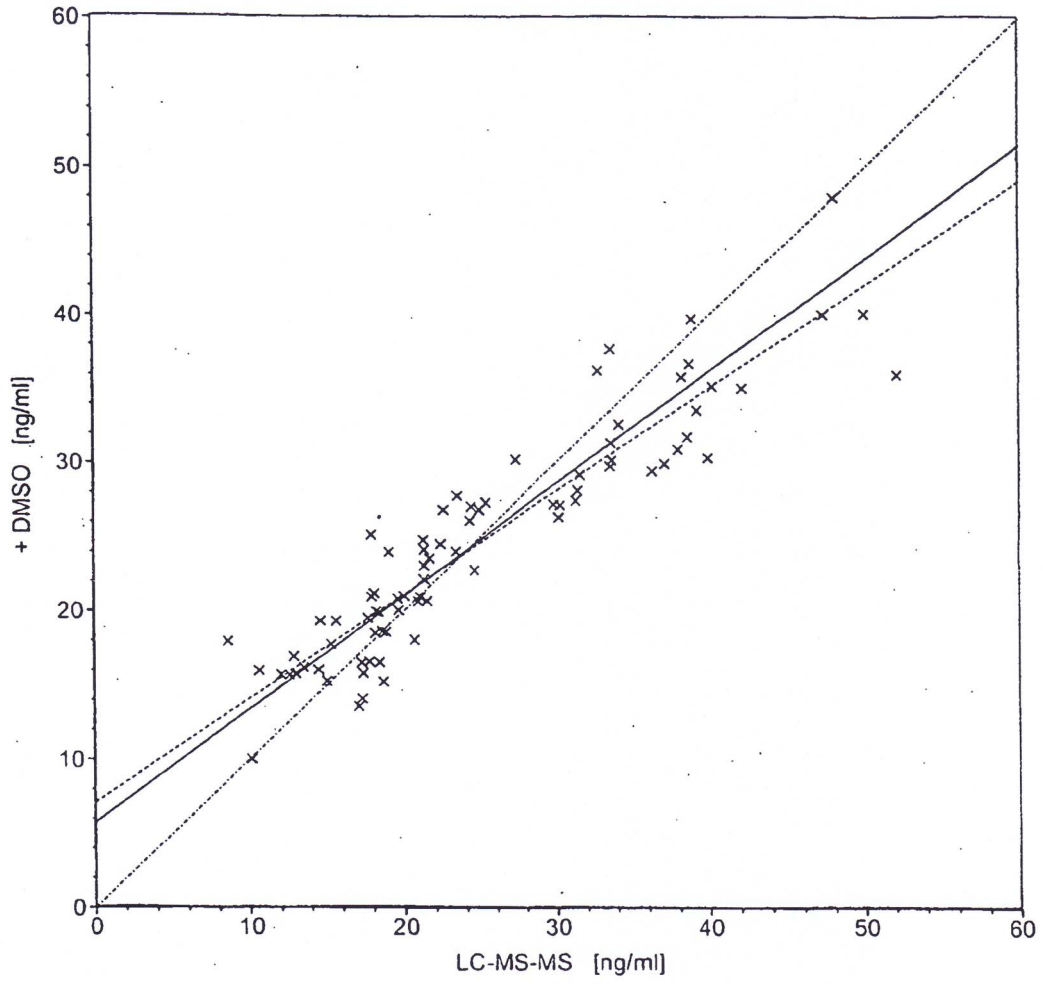


Fig. 5

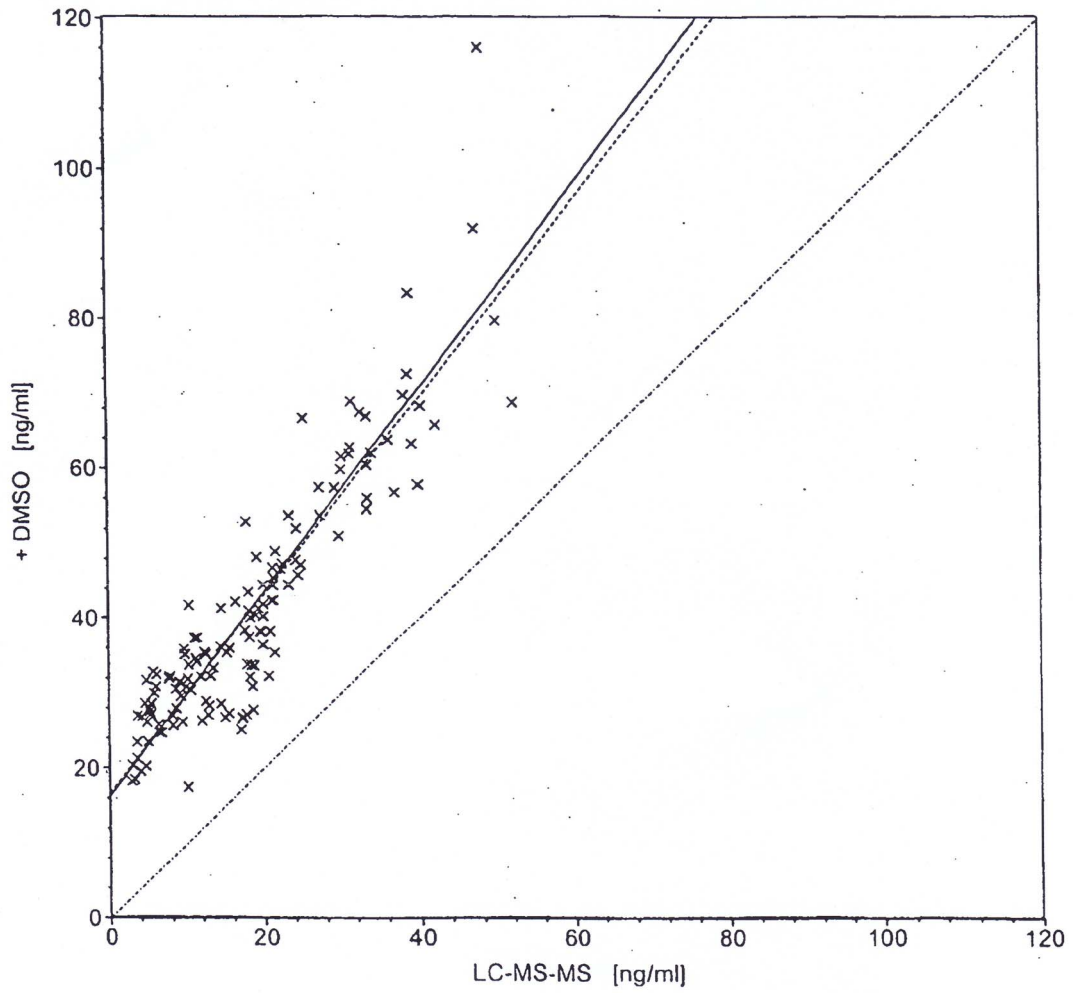


Fig. 6

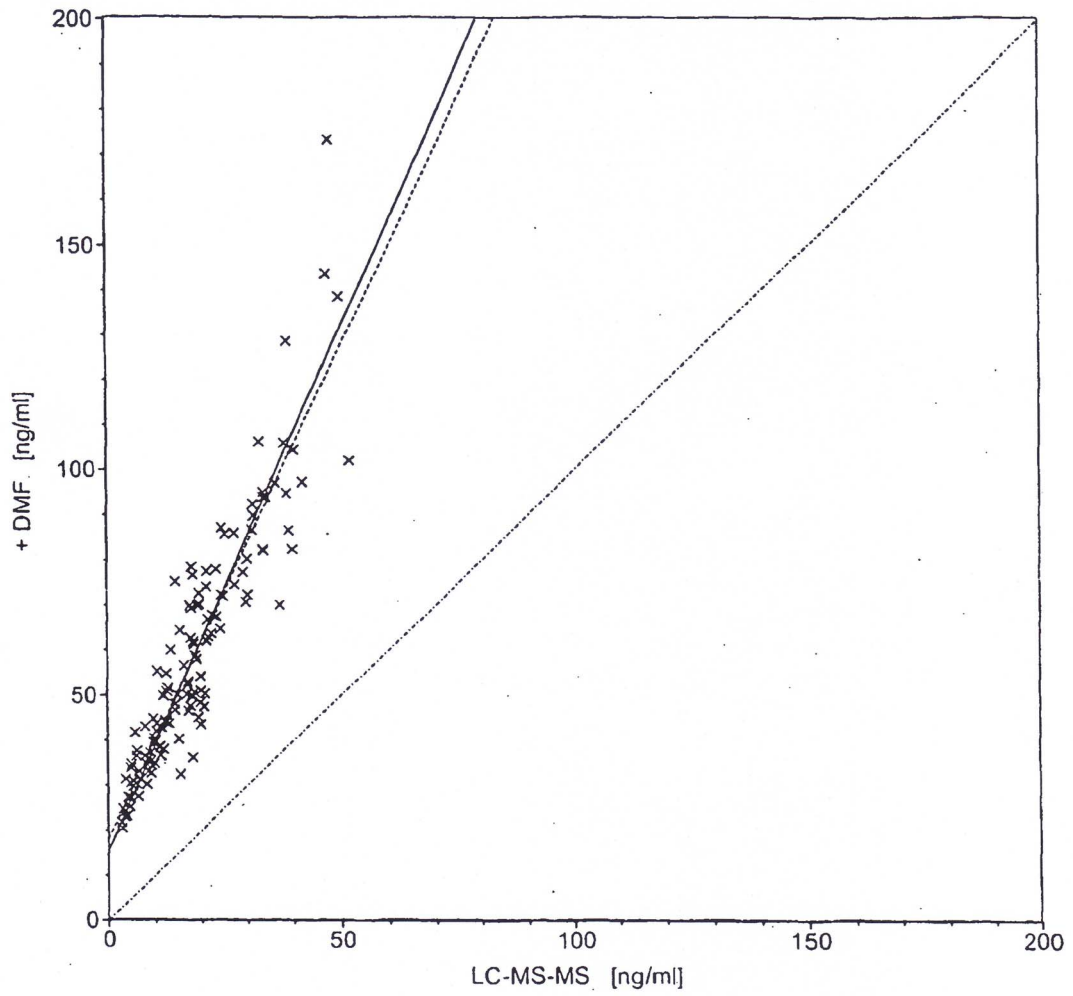


Fig. 7

