

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 817**

51 Int. Cl.:

C08F 14/26 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2011 PCT/NL2011/050905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO2012091569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2011 E 11817428 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2635611**

54 Título: **Reactivo de liberación para vitamina D**

30 Prioridad:

28.12.2010 EP 10197208

09.06.2011 EP 11169314

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

02.06.2017

73 Titular/es:

FUTURE DIAGNOSTICS B.V. (100.0%)

Nieuweweg 279

6603 BN Wijchen, NL

72 Inventor/es:

SWINKELS, LEON MARIA JACOBUS

WILHELMUS;

MAAS, ANTONIUS FRANCISCUS;

MARTENS, MICHAËL FRANCISCUS WILHELMUS

CORNELIS y

ROSMALLEN, FRANCISCUS MARIA ANNA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 614 817 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reactivo de liberación para vitamina D

5 Campo de la invención

10 La presente invención pertenece a un método de inmunoensayo, que incluye pruebas de punto de cuidado, para ensayar una muestra de sangre o componentes sanguíneos para detectar vitamina D total o metabolitos de vitamina D, en particular vitamina D 25-hidroxi utilizando un agente para liberación de vitamina D a partir de proteínas de unión endógenas.

Antecedente de la invención

15 Las sustancias denominadas como "vitamina D" abarcan un grupo de prohormonas solubles en grasa, así como metabolitos y análogos del mismo. Las formas principales en las que la vitamina D se presenta en el cuerpo son vitamina D₂ (ergocalciferol) y vitamina D₃ (colecalfiferol). La última es la forma endógena de la vitamina D, que los humanos pueden formar en la piel bajo la influencia de la luz solar. La anterior es una forma exógena de vitamina D, captada con alimentos. En los Estados Unidos, la vitamina D₂ se utiliza como el complemento farmacéutico de vitamina D.

20 Mientras la vitamina D₂ y D₃ difieren en la estructura molecular de sus cadenas laterales, comparten la misma actividad biológica en que son prohormonas, metabolizadas en dos etapas, finalmente, la 1,25 dihidroxi vitamina D (calcitriol o 1,25 dihidroxi colecalfiferol). El metabolito precedente, 25-hidroxi vitamina D o calcidiol, resulta de la conversión en el hígado, y se considera la forma de almacenamiento de la vitamina D en el cuerpo.

25 La circulación de la vitamina D consiste principalmente de 25 (OH) vitamina D₃ y 25 (OH) vitamina D₂. Biológicamente, la 25 (OH) vitamina D₂ es tan efectiva como la 25 (OH) vitamina D₃. La vida media de la 25 (OH) vitamina D₂ en la circulación es más corta. Para la práctica clínica se recomienda el uso de un ensayo de 25 (OH) vitamina D que mide tanto la 25 (OH) vitamina D₃, así como la 25 (OH) vitamina D₂ (1).

30 La vitamina D ha sido reconocida hace bastante tiempo como una sustancia importante, cuya forma activa tiene una función en la formación y conservación de los huesos, así como en otros procesos en el cuerpo humano o animal. De esta manera, sirve para aumentar la concentración de calcio en el torrente sanguíneo, al promover la absorción de calcio y fósforo de los alimentos en los intestinos y la reabsorción de calcio en los riñones; permitiendo la mineralización normal del hueso y evitando la tetania hipocalcémica. También es necesaria para el crecimiento de los huesos y remodelamiento óseo mediante osteoblastos y osteoclastos.

35 La deficiencia de vitamina D resulta en deterioro de la mineralización ósea y conduce a enfermedades de ablandamiento óseo, raquitismo en niños y osteomalacia en adultos y posiblemente contribuye a la osteoporosis.

40 En años recientes se ha reconocido que la vitamina D cumple una serie de funciones adicionales en la salud humana. Esta puede modular la función inmunitaria y reduce la inflamación. También se ha sugerido que la vitamina D puede evitar cáncer de colon, de mama y de ovario.

45 De esta manera, es esencial para la salud de una persona o animal o tener un nivel adecuado de vitamina D.

Aún, el exceso de vitamina D (que puede ocurrir como resultado de sobredosis) es tóxico. Algunos síntomas de toxicidad por vitamina D son hipercalcemia (un nivel elevado de calcio en sangre) provocado por aumento de absorción intestinal de calcio. Se sabe que la toxicidad por vitamina D es una causa de la alta presión sanguínea. Los síntomas gastrointestinales de la toxicidad por vitamina D pueden incluir anorexia, náusea y vómito. Estos síntomas están seguidos frecuentemente de poliuria (producción excesiva de orina), polidipsia (aumento de sed), debilidad, nerviosismo, prurito (rasquiña) y eventualmente falla renal.

50 Claramente, es importante ser capaz de diagnosticar sujetos para detectar una posible deficiencia de vitamina D. También es importante, particularmente para sujetos que están en complemento de vitamina D, ser capaces de probar sujetos para detectar un posible exceso de vitamina D. En la práctica clínica, el nivel de suero de 25-hidroxi-vitamina D se considera que es el indicador principal del estatus de vitamina D. (2).

55 Casi toda la 25 (OH)-vitamina D en circulación en suero está vinculada por la proteína de unión de vitamina D (88%) y albúmina (12%). La proteína de unión a vitamina D (DBP) es una proteína abundante, con una concentración de 250 a 400 mg/L de suero. La vitamina D se une al DBP con una relativamente alta afinidad cerca a aquella de los anticuerpos, ($5 \times 10^8 M^{-1}$).

60 Una medición exacta de la concentración de vitamina D en suero requiere la liberación de vitamina D unida desde el DBP.

65

Los métodos tempranos para la determinación de vitamina D incluían una etapa de extracción utilizando disolventes orgánicos tal como acetonitrilo. Otros métodos se han basado en la disociación del complejo de vitamina D-dbp utilizando un pH alto o bajo (WO2004/063704). Otros métodos se basan en el desplazamiento competitivo de vitamina D de proteínas de unión endógenas utilizando ANS (US 7.482.162). Recientemente los métodos incluyen digestión proteolítica del DBP que ha sido publicado (WO 2008/092917 A1). Armbruster ha publicado un método para dirigir la medición de la vitamina D utilizando el desplazamiento mediante ácido carboxílico aromático hidroxilado (WO 2003/023391). El método descrito por Kyriatsoulis se basa en la liberación de vitamina D de la proteína de unión de vitamina D al utilizar un reactivo con un pH de 3.8 a 4.8 y 5 a 30% de DMSO, una amida orgánica líquida y opcionalmente 0.5 a 5% de un alcohol de cadena corta. Kobold presentó un método para la liberación basado en una sal con un catión que tiene un ion de nitrógeno cuaternario. EP2007/140962. El documento 2008/0182341 menciona agentes estabilizantes y captura ligandos para uso en ensayos que miden las concentraciones de analitos. Estos agentes estabilizantes se divulgan contra el antecedente de determinados fluoro surfactantes alquil amino. Los inventores sugieren que este surfactante facilita la medición del analito no unido libre versus el analito unido al estabilizar el equilibrio. El ácido fluorocarbono octanoico se menciona como una sustancia potencialmente peligrosa.

Las referencias antecedentes sobre ensayo de vitamina D incluyen Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. Am J Clin Nutr. 2008 Aug;88(2):507S-510S; Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Jun;39(2):381-400.

Resumen de la invención

Esta invención, en un aspecto, presenta un método de inmunoensayo para ensayar una muestra de sangre o componentes sanguíneos para 25-hidroxi vitamina D utilizando un agente para liberar vitamina D a partir de proteínas de unión endógena, en el que el agente es un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12 comprendida en un regulador de ensayo en una concentración de 0.5 a 3%, el método comprende determinar la concentración total de 25-hidroxi vitamina D con referencia a una concentración de calibrador para el total 25-OH vitamina D.

En una realización, la invención proporciona un método in vitro para el ensayo cualitativo de sangre o componentes sanguíneos para detectar la presencia de 25-hidroxi vitamina D, que comprende:

- (a) agregar a la muestra un ácido perfluoroalquilo con una longitud de cadena de carbono de entre 4 a 12 átomos de carbono, o una sal del mismo, con el fin de permitir la liberación de vitamina D de una proteína de unión de vitamina D;
- (b) opcionalmente, diluir la muestra con un diluyente;
- (c) someter la mezcla a incubación con una proteína de unión inmovilizada, notablemente un anticuerpo anti-vitamina D;
- (d) poner en contacto la muestra con un conjugado de vitamina D y una etiqueta funcional que se une al anticuerpo anti-vitamina D en una forma competitiva
- (e) determinar la concentración de compuesto de vitamina D etiquetado unido a la proteína de unión.

En otro aspecto, la invención reside en un kit para realizar el método anterior. El kit comprende un anticuerpo específico para 25-OH vitamina D inmovilizado sobre una fase sólida, un conjugado de vitamina D y una etiqueta funcional, en el que la etiqueta funcional se selecciona del grupo que consiste de radioetiquetas, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas biotina, etiquetas doradas y etiquetas de enzimas; y un regulador de ensayo que comprende de 0.5 a 3% de un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12.

En aun otro aspecto, el método se puede utilizar para probar "punto de cuidado". Este último se refiere a probar en o cerca del sitio de cuidado del paciente, es decir, a diferencia de extraer muestras de sangre y envía estas a un laboratorio de diagnóstico, se puede introducir inmediatamente una muestra en un dispositivo portátil, preferiblemente de mano que sea capaz de realizar el ensayo en un número limitado de etapas tanto como sea posible y con un número limitado de operaciones manuales tanto como sea posible.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 describe una curva de calibración de 25 (OH) vitamina D.

La figura 2 presenta una gráfica que compara los resultados obtenidos con ácido perfluorohexanoico (PFHxA) y con liberación de ácido perfluorooctanoico (PFOA).

Descripción detallada de la invención

En un amplio sentido, la invención se relaciona con la determinación de vitamina D en la sangre o componentes sanguíneos, notablemente suero o plasma, mediante un inmunoensayo utilizando un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12 para liberación de vitamina D de proteínas de unión endógena.

5 En forma concebible, en la invención se puede hacer uso de ácido perfluoroalquil carboxílico o ácido perfluoro sulfónico o sales del mismo. En particular se pueden utilizar ácido perfluorohexanoico (PFHxA) o ácido perfluorooctanoico (PFOA).

El ensayo implica generalmente

10 (a) agregar un diluyente/regulador de ensayo de muestra

(b) agregar partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-vitamina D

15 (c) incubar la muestra durante una cantidad de tiempo

(d) agregar un conjugado de vitamina D y una etiqueta funcional;

(e) determinar la cantidad del conjugado de vitamina D y la etiqueta funcional unida al anticuerpo.

20 Dicha muestra se puede extraer, en cualquier forma conocida en la técnica, de un sujeto, particularmente un ser humano, en cuya sangre se desea evaluar la presencia de 25-OH vitamina D.

25 La muestra se diluye preferiblemente con un diluyente acuoso. Preferiblemente el diluyente es un regulador de ensayo. La dilución puede tener lugar antes, durante o después de la adición del anticuerpo. El diluyente de muestra o regulador de ensayo se puede basar en componentes acuosos, y preferiblemente será una solución reguladora. Preferiblemente, el pH regulado está en el rango de entre 6.0 a 8.0. Diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, regulador de citrato fosfato. La concentración de ácido perfluoro alquilo en el regulador debe ser 0.1% a 3%, preferiblemente 0.5%. Soluciones reguladoras adecuado son habituales en la técnica y no requieren aclaración aquí.

30 Se puede agregar ácido perfluoro alquilo en una forma separada, pero preferiblemente está comprendida en el diluyente de muestra, preferiblemente en el regulador de ensayo.

35 La muestra se pone en contacto con un anticuerpo anti-25 (OH) vitamina D este último se puede agregar a la muestra o la muestra se puede transferir a un recipiente de reacción que contiene la proteína de unión.

40 En la técnica se conocen anticuerpos para vitamina D y se utilizan ampliamente en los inmunoensayos existentes para detección de vitamina D. Estos mismos anticuerpos, también, así como otras proteínas de unión, se pueden utilizar en la presente invención. Por ejemplo, en el lugar de un anticuerpo para vitamina D se puede utilizar un fragmento de anticuerpo tal como el producido con tecnología de visualización de fago. Anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Se pueden obtener en forma conocida, por ejemplo, anti-vitamina D de cabra policlonal, anti-vitamina D de conejo policlonal, o cualquier otro anticuerpo adecuado para vitamina D como se conoce en la técnica a partir de la aplicación en inmunoensayos para detección de vitamina D. Se conocen anticuerpos adecuados, por ejemplo, a partir de las siguientes referencias: Hollis, Clin.Chem 31/11, 1815-1819 (1985); Hollis, Clin. Chem 39/3, 529-533 (1993).

45 Los anticuerpos como se utiliza preferiblemente se inmovilizan. Preferiblemente se utilizan en una forma particulada que comprende portadores sólidos. Normalmente, el anticuerpo se recubre sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtítulos. En una realización preferida, los anticuerpos se recubren sobre partículas magnéticas, que facilitan su separación en un campo magnético.

50 Después de la adición del anticuerpo, se deja incubar la muestra. El tiempo requerido dependerá de las circunstancias tales como la concentración de los reactivos, el tipo de proteína de unión y las condiciones durante incubación, por ejemplo, agitación y temperatura. En general, el tiempo de incubación estará en un rango de entre 10 segundos a varias horas, preferiblemente 1 minuto a 1 hora. Para plataformas automatizadas, se prefieren los tiempos de incubación cortos (10 segundos a 10 minutos, preferiblemente 30 segundos a 30 minutos).

55 Después del primer periodo de incubación, se agrega un conjugado de vitamina D con una etiqueta funcional. Se conocen numerosos compuestos etiquetados que son capaces de servir como agentes de unión competitivos en inmunoensayos para la determinación de vitamina D. Las etiquetas típicas son radioetiquetas, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas biotina, etiquetas doradas, etiquetas de enzima. El experto conoce ensayos de unión competitivos y no requiere aclaración, en razón a que notablemente esta parte del método de la invención se puede llevar a cabo utilizando cualquier etiqueta conocida que sea adecuada para la determinación de vitamina D. Las etiquetas que se pueden utilizar son, entre otras, aquellas divulgadas en las anteriores referencias sobre inmunoensayos de vitamina D existentes.

65

Con la etiqueta que permite medir una concentración, como resultado, se determina la concentración de vitamina D en la muestra. Se entenderá que la interpretación de los valores medidos, se determina mediante una medición de calibración, es decir mediante la respuesta, en el mismo ensayo, de calibradores.

5 La calibración para el ensayo de la invención se puede hacer al proporcionar calibradores que comprende una concentración determinada de 25-OH vitamina D. La concentración de vitamina D en los calibradores se determina preferiblemente utilizando un método LC-MS-MS.

10 La invención, en otro aspecto, presenta un producto en la forma de un inmunoensayo para la determinación de 25-OH vitamina D en sangre o componentes sanguíneos, en el que el ensayo hace uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes. Más particularmente, tal producto se proporcionará en la forma de un kit para realizar el inmunoensayo. Dicho kit puede comprender reactivos flojos involucrados, es decir, el anticuerpo, el compuesto de vitamina D etiquetado y los diluyentes/regulador de ensayo. Estos reactivos se pueden proporcionar por separado y forman de esta manera un kit sólo luego de su uso en el ensayo de la invención. Preferiblemente, los reactivos se proporcionan juntos, preferiblemente empaquetados juntos, como un kit de partes. El kit comprende opcionalmente un recipiente para una muestra de sangre o componentes sanguíneos, pero como es habitual esto también se puede proporcionar por separado. Normalmente un kit comprende un aglutinante inmovilizado sobre una fase sólida y vitamina D conjugada por separado. Otros componentes de kit dependerán, como es habitual en la técnica, en la etiqueta seleccionada, ya que diferentes etiquetas pueden requerir diferentes reactivos.

20 Se debe entender que la invención no se limita a las realizaciones y fórmulas como se describe aquí adelante. También se entiende que en las reivindicaciones la palabra "comprende" no excluye otros elementos o etapas. En donde se utiliza un artículo definido o indefinido cuando se refiere a un sustantivo singular por ejemplo "un" o "uno", "el", esto incluye un plural de este sustantivo a menos que algo más se indique específicamente.

25 La invención se ilustrará con referencia al siguiente ejemplo no limitante y las figuras no limitantes acompañantes.

Ejemplo

30 Medición de vitamina D

El ensayo se realiza utilizando una plataforma automatizada. A 15 µl de muestra se agrega 255 µl de diluyente de muestra/regulador de ensayo. Se trasfiere una alícuota de 100 µl de la muestra diluida a un segundo pozo de incubación. Un volumen de 50 µl de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal se agrega a la muestra diluida y se incuba durante 45 minutos a 37° C. Posteriormente se agrega 50 µl de una solución de vitamina D biotinilada y se incuba durante 7 minutos a 37° C. Luego 50 µl de una solución de éster de estreptavidina-acridinio se agrega y de nuevo se incuba durante 7 minutos a 37° C. Después de separación magnética de enlaces y vitamina D biotinilada D libre, se cuantificó el éster de acridinio unido.

40 Materiales

Partículas paramagnéticas. Se recubren partículas magnéticas (Invitrogen, M280 tosilactivadas, 2.8 µm) con un anticuerpo policlonal contra IgG de ratón (5 µg/mg de partículas magnéticas). Las partículas se recubren en un rodillo en una concentración de 0.5 mg/ml en PBS 0.01 M, NaCl 0.138 M de pH 7.4 durante 16 horas. Finalmente se bloquean las partículas con Tris 0.05 M/BSA al 0.05% que contiene Proclin 950 al 0.1%. Las partículas se recubren durante 16 horas a 37° C con una segunda capa de anticuerpo monoclonal anti-VitaminaD en una concentración de 0.4 µg/mg de partículas.

50 El diluyente de muestra consistió de regulador TRIS 0.1M de pH 8.0 que contiene BSA al 0.05% y PFOA al 0.5%.

El conjugado (es decir, el compuesto de vitamina D etiquetado) es una vitamina D biotinilada. El conjugado se presenta en una concentración de 0.5 ng/ml en un regulador Tris 0.1 M de pH 8.0 que contiene albúmina de suero bovino al 0.05%.

55 Protocolo

A 15 µl de muestra se agregó 255 µl de diluyente de muestra/regulador de ensayo. Se transfirió una alícuota de 100 µl de la muestra diluida a un segundo pozo de incubación. Se agregó un volumen de 50 µl de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal a la muestra diluida y se incubó durante 45 minutos a 37° C. Posteriormente se agregó 50 µl de una solución biotinilada de vitamina D y se incubó durante 7 minutos a 37° C. Luego se agregó 50 µl de una solución de estreptavidina-éster acridinio y se incubó de nuevo durante 7 minutos a 37° C. Después de separación magnética de unión y vitamina D biotinilada libre, se cuantificó el éster de acridinio unido. Se generó una señal quimioluminiscente mediante la adición de reactivo activador. La señal generada en la cubeta es inversamente proporcional a la concentración de 25 (OH) vitamina D en la muestra o calibrador. Se puede calcular la concentración de 25(OH) vitamina D en la muestra original al comparar la señal de desconocidos con la respuesta de calibradores.

Resultados

En la tabla adelante, y en la figura 1, se muestra una curva de calibración. Se preparan calibradores de 25 (OH) vitamina D3 en suero libre de vitamina D y varía de 0 a 136 ng/ml.

5

Se desplaza 25 (OH) vitamina D biotinilada a un nivel de 7% en 136 ng/ml.

Se mide un grupo de muestras utilizando ácido perfluorooctanoico liberado y con liberación ácido perfluorohexanoico. Los resultados se correlacionan muy bien ($r = 0.990$) indicando que se pueden utilizar ambos compuestos (Figura 2).

10

Tabla

Tabla 1. Curva de calibración de 25 (OH) vitamina D.

Dosis de curva estándar (ng/ml)	St 0 0	St A 4.1	St B 13.5	St C 24.9	St D 52.1	St E 136
RLU (1)	733227	618731	432378	254588	105251	41737
RLU (2)	754974	637612	422703	228484	106879	41870
Media RLU	744101	628172	427541	241536	106065	41804
RLU SD	15377	13351	6841	18458	1151	94
RLU %CV	2.1%	2.1%	1.6%	7.6%	1.1%	0.2%
% de unión	100.0%	84.4%	57.5%	32.5%	14.3%	5.6%

15

Reivindicaciones

- 5 1. Un método de inmunoensayo in vitro para evaluar una muestra de sangre o componentes sanguíneos para detectar 25-hidroxi vitamina D utilizando un agente para liberar vitamina D a partir de proteínas de unión endógena, en el que el agente es un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12, comprendida en un regulador de ensayo en una concentración de 0.5 a 3%, el método comprende determinar la concentración total de 25-hidroxi vitamina D con referencia a una concentración de calibrador para 25-OH vitamina D total.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido perfluoro alquilo se selecciona del grupo que consiste de ácido perfluoro hexanoico, ácido perfluoro octanoico y mezclas de los mismos.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, es un método para en el ensayo in vitro cualitativo de sangre o componentes sanguíneos para detectar la presencia de 25-hidroxi vitamina D, que comprende:
- 15 (a) agregar el regulador de ensayo a la muestra;
- (b) someter la mezcla de regulador de ensayo y la muestra a incubación con un anticuerpo anti-vitamina D;
- 20 (c) poner en contacto a muestra con un conjugado de vitamina D y una etiqueta funcional que se une al anticuerpo anti-vitamina D en una forma competitiva, dicha etiqueta funcional se selecciona del grupo que consiste de radioetiquetas, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas de biotina, etiquetas doradas, y etiquetas de enzima;
- (d) determinar la concentración de compuesto de vitamina D etiquetado unido al anticuerpo anti-vitamina D con referencia a una concentración de calibrador para 25-OH vitamina D total.
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra es suero humano o plasma.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el anticuerpo anti-vitamina D se proporciona en una forma recubierta sobre partículas magnéticas.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el ácido perfluoro octanoico o derivado del mismo, se selecciona del grupo que consiste de ácido perfluoro octanoico, sal de amonio de ácido perfluoro octanoico, y sulfonato de perfluoro octano.
- 35 7. Un kit para realizar un inmunoensayo utilizando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, el kit comprende un anticuerpo específico para 25-OH vitamina D inmovilizada sobre una fase sólida, un conjugado de vitamina D y una etiqueta funcional, en el que la etiqueta funcional se selecciona del grupo que consiste de radioetiquetas, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas de biotina, etiquetas doradas y etiquetas de enzima; y un regulador de ensayo que comprende 0.5 a 3% de un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12.
- 40 8. Uso en un inmunoensayo, de un ácido perfluoroalquilo o sal del mismo con una longitud de cadena de carbono de 4 a 12 para liberación de vitamina D de proteínas de unión endógena, con el propósito de determinar la concentración de vitamina D total en una muestra.
- 45

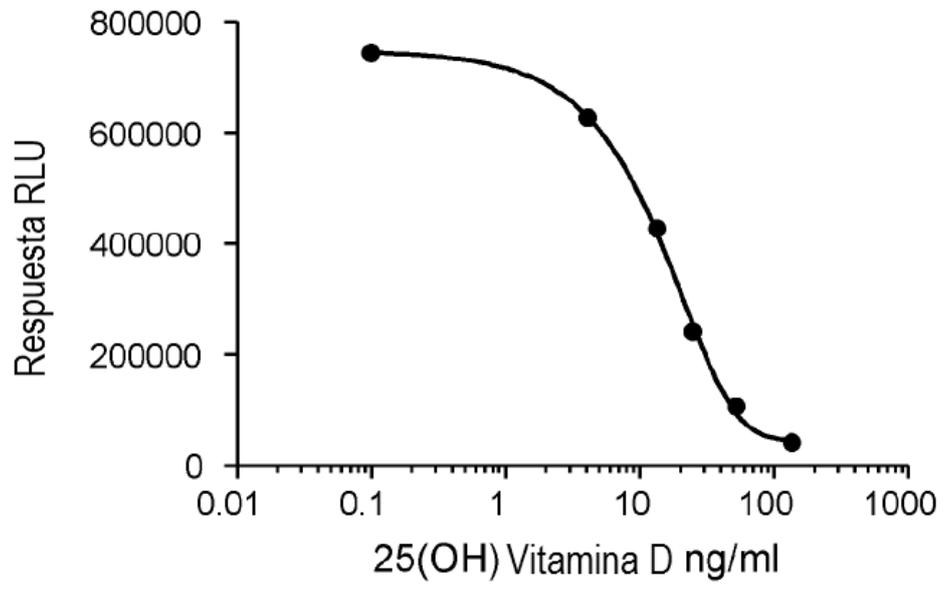


Fig. 1

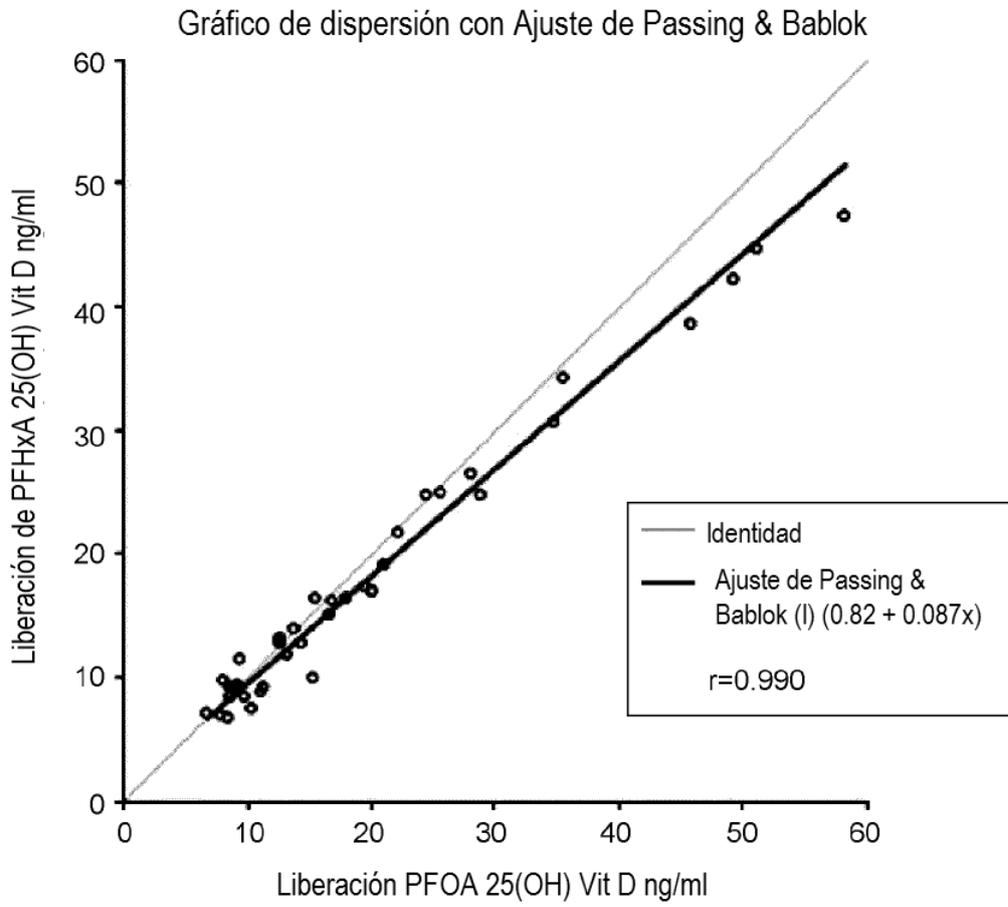


Fig. 2